



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE MEDICINA
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA
EJE TERMINAL: MICROBIOLOGÍA



Instituto de Ciencias

Centro de Investigaciones en
Ciencias Microbiológicas

Laboratorio Interacción Bacteria-Planta

**ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LAS MUTANTES EN EL GEN *dgcD::Km^R* QUE
CODIFICAN PARA UNA DIGUANILATO CICLASA PUTATIVA EN CEPAS Sp7 Y
Sp245 DE *Azospirillum brasilense***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADA EN BIOMEDICINA

PRESENTA:

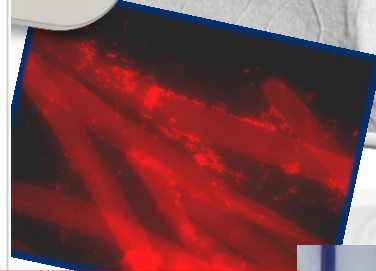
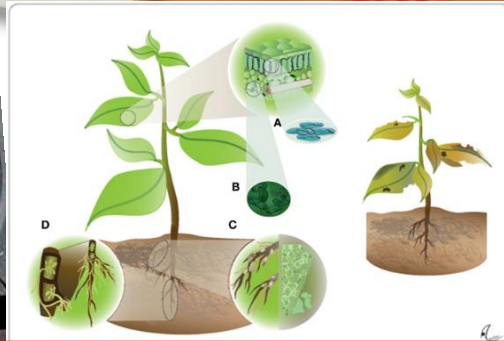
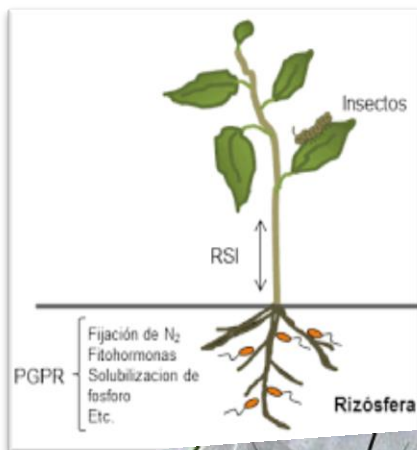
DENISSE RAMÍREZ MENDOZA.

DIRECTORA DE TESIS:

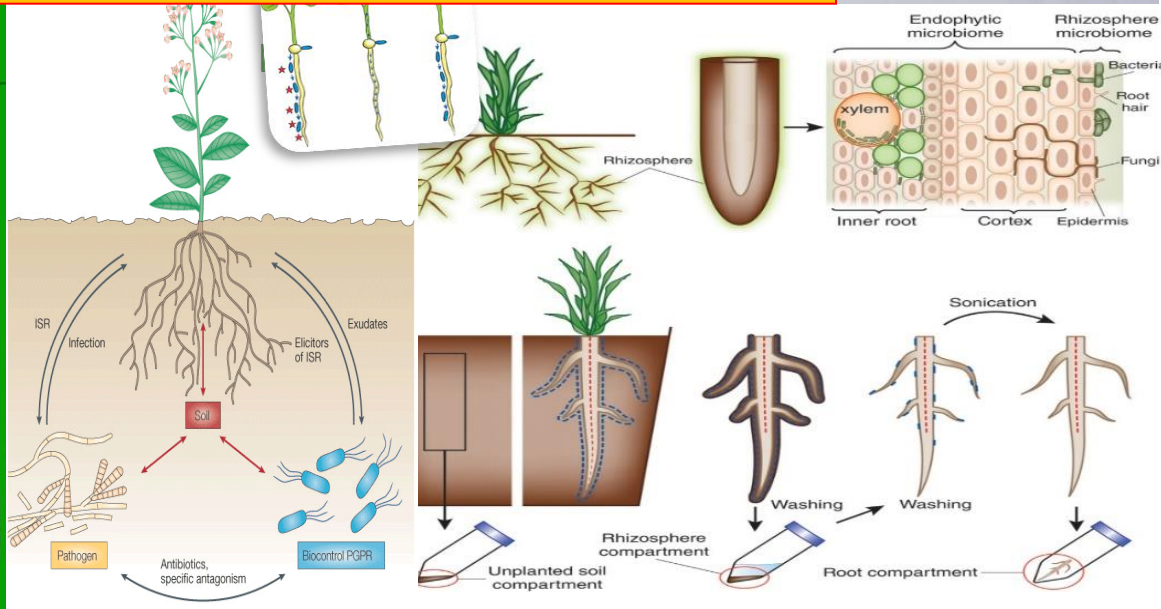
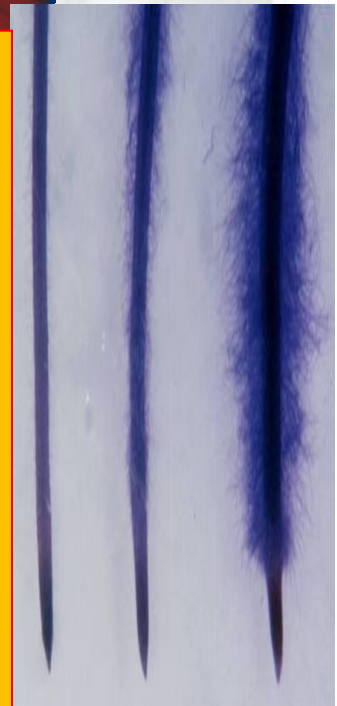
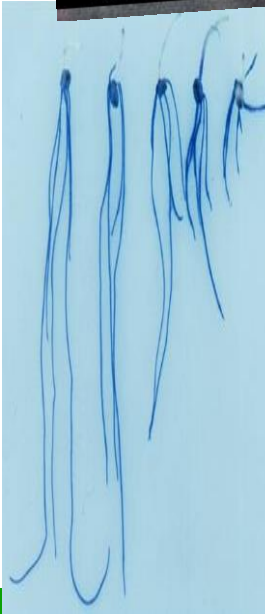
DRA. BEATRIZ EUGENIA BACA

PUEBLA, PUE.

Agosto, 2016.



Análisis fenotípico de las mutantes en el gen *dgcD::Km^R* que codifican para una diguamilato ciclasa putativa en cepas Sp7 y Sp245 de *Azospirillum brasilense*



*A mi mamá, mi papá y a mi hermana, gracias por
todos sus consejos, confianza, apoyo incondicional
e incentivarme para que luche por toda meta
propuesta.*



AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de Tesis, la Dra. Beatriz Eugenia Baca, por haberme aceptado y darme la oportunidad de realizar el proyecto.

Al Dr. Alberto Ramírez Mata, por su apoyo y aportación de ideas a este trabajo.

A la Maestra María Luisa Xiqui Vázquez, por todo su apoyo, consejos y guía en la realización de este trabajo. Sin ella el Laboratorio no sería lo mismo.

Al Maestro José Joaquín Aguilar Piedras, por su enseñanza, paciencia y dedicación para que aprendiera las primeras técnicas de laboratorio.

A todos mis compañeros del laboratorio que a lo largo de este trabajo he conocido, por los momentos y horas de trabajo que hemos compartido, por hacer más ameno el ambiente del laboratorio, por sus consejos, amistad, apoyo y ayudarme a resolver dudas.

A todos mis profesores, por todo su conocimiento brindado ya que me ha ayudado en mi formación académica.

Agradezco a mis amigos y compañeros de carrera, por su amistad brindada, los momentos compartidos y porque siempre han tenido un trato amable conmigo.

Agradezco en especial a Iván por alentarme, por toda su ayuda, consejos, compañía, amistad, por el cariño y apoyo constante en todo momento.



Lo bueno de las bacterias es que tienes una sorpresa cada día esperando por ti, porque son tan rápidas, que crecen durante la noche.

Bonnie Bassler



ÍNDICE

I. Introducción	1
II. Antecedentes	1
II.1 Rizosfera	1
II.2 Género <i>Azospirillum</i>	3
II.3 <i>Azospirillum</i> como PGPR	3
II.4 Fijación de nitrógeno	5
II.5 <i>Azospirillum</i> secreta diversas hormonas que estimulan el crecimiento de las plantas	6
II.6 Absorción de minerales, actividad de membrana y relación planta-agua por <i>Azospirillum</i>	8
II.7 Inducción de resistencia en plantas a patógenos	8
II.8 Colonización de diversos cultivos con <i>Azospirillum</i>	10
II.9 Efectos de la colonización radicular	11
II.10 Floculación	13
III. La movilidad, la quimiotaxis y su papel crucial en la ecología microbiana	14
III.1 Taxis a receptores de electrones alternativos	17
III.2 Redox Taxis	18
III.3 Taxis de energía como el modo dominante de detección del medio ambiente	18
III.4 Tipos de Movilidad	19
III.5 Movimiento en superficie (swarming)	20
III.6 Quimiotaxis en <i>Azospirillum</i> spp.	20
IV. Formación de Biopelícula	21
IV.1 Etapas de la biopelícula	23
IV.2 Comunicación célula-célula durante la formación de la biopelícula	25
IV.3 Quorum sensing (QS)	26
IV.4 Comunicación de corto alcance	27
IV.5 Dispersión de biopelícula	27
IV.6 Arquitectura de la biopelícula	29
V. Exopolisacáridos (EPS) componente principal de la Biopelícula	30
V.1 Composición de los EPS	31
V.2 El di-GMPc regula la producción de EPS	33

V.3 EPS en <i>A. brasilense</i>	34
VI. Sistema de señalización en bacterias mediado por el (3'5') guanosín-monofosfato-cíclico (di-GMPc)	36
VI.1 Efectores de di-GMPc.....	39
VI.2 Riboswitches- di-GMPc	40
VI.3 Dominios sensores de los genes que codifican a las enzimas que sintetizan el di-GMPc.....	40
VII. Proteínas Híbridas con Motivos: GGDEF Y EAL	43
VIII. ANTECEDENTES DIRECTOS	44
IX. JUSTIFICACIÓN	45
X. HIPÓTESIS	45
XI. OBJETIVOS	45
XI.1 Objetivo General.....	45
XI.2 Objetivos Particulares	45
XII. Esquema experimental.....	46
XIII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
XIII.1 Material Biológico	47
XIII.2 Gen de interés a estudiar <i>dgcD</i>	47
XIII.3 Métodos.....	48
XIII.3.1 Condiciones de cultivo.....	48
XIII.3.2 Extracción de DNA genómico (Sambrook <i>et al.</i> 1989)	49
XIII.3.3 CONDICIONES PARA LA OBTENCIÓN DEL PRODUCTO DE PCR PARA EL GEN <i>dgcD</i>	50
XIII.3.4 Ensayo de biopelícula	50
XIII.3.5 Unidades Formadoras de Colonias (UFCs) para estandarización del ensayo de Movilidad	51
XIII.3.6 Ensayo de Movilidad	52
XIII.3.7 Ensayo de EPS	53
XIII.3.8 Determinación de proteínas totales para el Ensayo de EPS.....	53
XIV. RESULTADOS.....	54
XIV.1 Análisis <i>in silico</i>	54
XIV.1.1 Análisis de la secuencia de DgcD	54
XIV.1.2 Análisis de los dominios de la proteína	55
XIV.1.3 Predicción de regiones TMD.	57

XIV.1.4 Alineamientos	59
XIV. 1.5 Modelo de la Proteína DgcD	65
XIV.2 Análisis de las cepas a estudiar por PCR.....	66
XIV.3 Análisis cuantitativo de la producción de Biopelícula.....	66
XIV.4 Determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFCs)	68
XIV.5 Determinación de la movilidad	70
XIV.6 Determinación de producción de EPS	75
XV. Discusión	78
XVI. Conclusiones.....	82
XVII. Perspectivas	83
XVIII. Bibliografía.....	83
XIX. Anexo: Medios de Cultivo.....	93

Abreviaturas

▪ PGPR	Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal
▪ NO	Óxido nítrico
▪ AIA	Acido indol-3-acético
▪ PHB	poli- β -hidroxibutirato
▪ MCP	Proteína Aceptora de Metilos
▪ UFC	Unidades formadoras de colonias
▪ DO	Densidad Óptica
▪ EPS	Exopolisacáridos
▪ eDNA	ADN exógeno
▪ QS	Quorum sensing
▪ di-GMPc	Acido di-(3'-5') guanosín monofosfato
▪ GTP	Guanosín trifosfato
▪ pGpG	Molécula lineal 5' fosfoguanilil- (3'-5') guanosina
▪ DGC	Diguanilato ciclasa
▪ PDE	Fosfodiesterasa
▪ DgcD	Diguanilato ciclasa D

Resumen

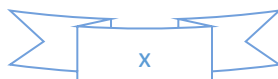
Para que un organismo sobreviva, debe ser capaz de percibir su entorno por lo cual utiliza moléculas señal que detecta de su microambiente, posteriormente para amplificar y transmitir las señales a receptores, hacia blancos en la célula, cuyo resultado impacta en diversos procesos fisiológicos. La comprensión de cómo las bacterias integran las señales de factores ambientales que regulan el metabolismo de segundos mensajeros como el di-GMPc, sería la clave para desarrollar estrategias moleculares y eventualmente obtener el mayor beneficio de las bacterias. Las concentraciones intracelulares del segundo mensajero di-GMPc es regulado por diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas para su síntesis y degradación respectivamente.

En el genoma de *Azospirillum brasilense* Sp245 por medio de un análisis bioinformático permitió identificar 32 genes que codificaban presuntivamente diguanilato ciclasas (DGCs) (Minjárez-Sáez, 2015). Se procedió a analizar el gen *dgcD* que codifica presuntivamente para la proteína híbrida DgcD que tiene tanto el dominio diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa.

Para analizar la función de este gen, se generaron mutantes por inserción con un casete de kanamicina en el gen *dgcD* tanto en las cepas Sp245 y Sp7 (Gamboa- Pérez, 2014) y se procedió a realizar un análisis fenotípico comparando las cepas mutantes contra las cepas silvestres. Los resultados obtenidos mostraron que la mutante 12-A en el gen *dgcD::Km^R* de *A. brasilense* Sp245 presentó una disminución en la formación de biopelícula de 3.8 veces y en producción de EPS 4.1 veces menor en comparación con la cepa silvestre en medio mínimo adicionado con KNO_3 como fuente de nitrógeno y la movilidad se encontró aumentada, lo que sugiere que bajo las condiciones experimentales probadas funcionaría como diguanilato ciclasa.

Sin embargo la mutante-78 en el gen *dgcD::Km^R* de *A. brasilense* Sp7 no está alterada en la formación de biopelícula en medio mínimo adicionado KNO_3 o NH_4Cl , como fuentes de nitrógeno; mientras que presentó disminución de la movilidad, lo que sugiere que funcionaría como una fosfodiesterasa, bajo las condiciones experimentales del ensayo.

Es posible que la diferencia en el tipo de cepa (aislamiento en rizosfera y localización endófito), sea responsable del efecto fenotípico obtenido. Estudios posteriores aportaran datos al respecto.



I. Introducción

La necesidad de sustituir la agricultura convencional a base de agroquímicos por una agricultura sostenible menos agresiva con el medio ambiente, ha llevado a la investigación a encontrar opciones biotecnológicas, y económicas de biofertilización que generen un impacto mínimo para el ecosistema y para la salud humana, permitiendo aumentar la calidad nutricional y rendimientos de los cultivos (Kloepper & Beauchamp, 1992). Esto es de relevancia en nuestro país, ya que el costo de la tecnología de fertilización química es elevado. En los últimos años se ha incrementado la utilización de fertilizantes basados en microorganismos promotores del crecimiento que se denominan rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) (término aceptado internacionalmente), bioestimulantes, biofertilizantes o inoculantes, aisladas de diversos ambientes. Aunque son muchos los microorganismos identificados que se utilizan en este tipo de fertilizantes, los más comunes pertenecen a los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Azospirillum* (Bashan *et al.* 2004).

Durante los últimos años varios inoculantes comerciales comúnmente conocidos como biofertilizantes se han producido a pequeña escala y han entrado lentamente en el mercado internacional, tanto en Europa como en Sud-América (Okon y Labandera-González, 1994).

Estas bacterias son una alternativa que contribuye con la habilidad potencial de afectar de manera positiva el crecimiento de las plantas (similar a un fertilizante químico), especialmente en los sistemas radicales de manera directa e indirecta y poseen una serie de mecanismos como supresión de enfermedades de las plantas (bioprotectora), la mejora de la adquisición de nutrientes (biofertilizantes), o la producción de fitohormonas (bioestimulantes) (Mitter *et al.* 2013). Estos mecanismos se interconectan lo cual facilita el intercambio de nutrientes entre ellas, así tiene un papel significativo en la sustentabilidad de los agroecosistemas, tanto en condiciones de invernadero como de campo, bajo varias condiciones climáticas y de suelo (Bashan *et al.* 2004) contribuyendo a la implantación, desarrollo y producción de cultivos tales como arroz, trigo y maíz.

II. Antecedentes

II.1 Rizosfera

El suelo está fuertemente influenciado por las raíces de las plantas, este sistema radical tiene una gran variedad de microorganismos como los hongos, las bacterias y los nematodos interactuando con ellos de manera positiva o negativa.

La mayoría de estas interacciones se realizan en una zona conocida como rizosfera, que con apenas 1 mm de grosor es rica en nutrientes, rodea la arquitectura viva del sistema radical de una planta y es debido a la acumulación de una variedad de compuestos orgánicos liberados por la raíz a través de la exudación, la secreción, y la deposición (Cardon & Whitbeck, 2007) (Philippot *et al.* 2013) (Fig. 1). Estas asociaciones se inician en respuesta al intercambio de señales desencadenadas por la interacción planta-bacteria (Van Bleu & Vanderleyden, 2003). A las bacterias que encontramos en esta zona de interacción y que influyen positivamente en el crecimiento de las plantas se les denomina Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR, por sus siglas en ingles), las PGPR's más conocidas pertenecen a géneros bacterianos que incluyen a *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Azotobacter* y *Azospirillum* (Davison, 1988).

Desde su re-descubrimiento por Döbereiner y colaboradores (Döbereiner *et al.* 1976), las especies de *Azospirillum* son las PGPR's más estudiadas. Además de su aplicación directamente en agricultura, *Azospirillum* se ha convertido en un excelente modelo para los estudios genéticos de bacterias asociadas a plantas en general.

Adicionalmente, se están introduciendo lentamente aplicaciones diferentes a la agricultura, como la producción de poli-beta hidroxibutirato para usos médicos, en degradación de contaminantes, producción de vitaminas y el tratamiento de aguas residuales, (Bashan & Holguin, 2002; Bashan *et al.* 2004).

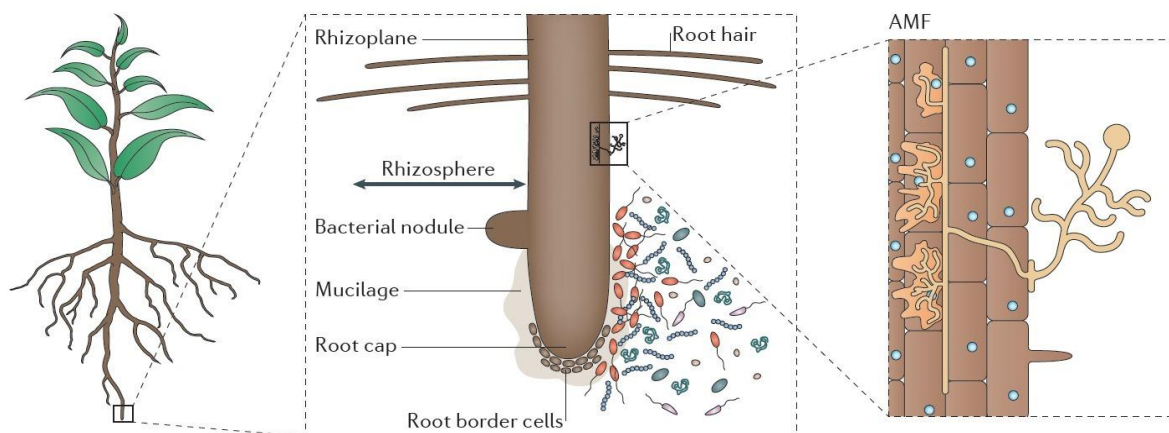


Fig. 1. La rizosfera es una zona estrecha de suelo (unos pocos milímetros de espesor) que rodea y está influenciada por las raíces de las plantas y es rica en nutrientes. Esta rizosfera contiene diversos microorganismos conocidos como PGPR que interactúa con ellos de una manera mutualista (Fuente: Philippot *et al.* 2013).

II.2 Género *Azospirillum*

El nombre *Azospirillum* proviene del francés *Azote*, que significa nitrógeno y del grupo *Spirillum*, pequeña espiral. Su descubrimiento data del año 1925, cuando Beijerinck (Beijerinck, 1925) describió una nueva especie de bacteria, aislada a partir de suelos arenosos pobres en nitrógeno en Holanda, a la que primeramente nombró *Azotobacter spirillum* y que posteriormente denominó *Spirillum lipoferum*. Döbereiner y colaboradores fueron los primeros en reportar su amplia distribución en la rizosfera de diversos pastos tropicales. (Krieg & Döbereiner, 1986). Desde entonces, se han aislado cepas de *Azospirillum* a partir de la filosfera (superficie de la planta que se encuentra expuesta al aire) (Singh, 1992), de raíces de numerosos pastos (silvestres y cultivados), cereales y de plantas de diversas familias, así como de suelos tropicales, subtropicales, templados y árticos (Bilal et al.1990).

Tarrand y cols. (1978), propusieron agrupar estos organismos en un nuevo género al que se denominó *Azospirillum* con base en diferencias morfológicas y fisiológicas entre varias cepas y en experimentos sobre homología del ADN distinguiendo dos especies: *Azospirillum brasilense* y *A. lipoferum*. Sin embargo, la mayoría de cepas aisladas en los últimos años pertenecen a las especies *A. brasilense* o *A. lipoferum*.

Actualmente 19 especies de *Azospirillum* se han descrito (en orden de descubrimiento): ***A. lipoferum*** (Tarrand et al. 1978), ***A. brasilense*** (Tarrand et al. 1978), ***A. amazonense*** (Magalhães et al. 1983), ***A. halopraeferens*** (Reinhold et al. 1987), ***A. irakense*** (Khammas et al. 1989), ***A. largimobile*** (Ben Dekhil et al. 1997), ***A. doebereineriae*** (Eckert et al. 2001), ***A. oryzae*** (Xie & Yokota, 2005), ***A. melinis*** (Peng et al. 2006), ***A. canadense*** (Mehnaz et al. 2007a), ***A. zeae*** (Mehnaz et al. 2007b), ***A. rugosum*** (Young et al. 2008), ***A. palatum*** (Zhou et al. 2009), ***A. picis*** (Lin et al. 2009), ***A. thiophilum*** (Lavrinenko et al. 2010), ***A. formosense*** (Lin et al. 2012), ***A. fermentarium*** (Lin et al. 2013), ***A. humicireducens*** (Zhou et al. 2013) y ***A. himalayense*** (Cerqueira et al. 2015).

II.3 *Azospirillum* como PGPR

El género *Azospirillum* pertenece al dominio bacteria, filo proteobacteria, clase α -proteobacteria, orden Rhodospirillales, familia Rhodospirillaceae son bacterias Gram negativas heterotróficas, microaerofílicas, son muy móviles, de vida libre aislada de la rizosfera y del espacio intracelular de la raíz de varias plantas (endofíticas) (Fig. 2). La morfología de las células depende de las condiciones nutricionales y edad del cultivo,

crece a un pH entre 6.5 y 7 a 30°C. Se observa una forma de ese y vibroide de 0.8 a 1 x 2 a 5 micrómetros de tamaño; en medio rojo Congo se observan unas colonias redondas y rojo escarlata, se asocia además la aparición de formas quísticas o en C, como vía de resistencia a las condiciones de estrés y del mismo modo como mecanismo de supervivencia en la rizosfera (Okon & Vanderleyden, 1997). Todas las especies de *Azospirillum* tienen un alto contenido G + C, alcanzando valores de 64 a 71% (Khammas *et al.* 1989). El genoma de *Azospirillum* es de 1.8 veces mayor que el de *E. coli* (4.6 mpb) y estudios sugieren la presencia de varios megareplicones en 10 cepas de 5 especies de *Azospirillum* con tamaños moleculares que oscilan desde 0,2 hasta 2,7 Mbp, indicando que contiene múltiples cromosomas (Wood *et al.* 1982). Por otro lado *A. brasilense* Sp245 además mostró 5 megareplicones, sin embargo, el perfil de DNA fue claramente diferente: las dos bandas más grandes aparentemente migran con aquellas de *A. brasilense* Sp7, mientras que esta cepa tiene tres bandas en la región de 0,6 Mbp y dos bandas por encima de 1,7 Mbp.

Es considerada una PGPR, por el beneficio obtenido de la inoculación de la bacteria en una amplia variedad de plantas, ya que colonizan las raíces de muchos cultivos económicamente importantes, como trigo, arroz y maíz. La respuesta quimiotáctica a diferentes compuestos presentes en la rizosfera, se asocia a la existencia de vías metabólicas alternativas, que convierten a *Azospirillum* en un organismo nutricionalmente versátil. Un análisis de estas propiedades fisiológicas y bioquímicas demuestra que este género posee características y mecanismos que promueven el crecimiento vegetal, que lo convierten en un organismo capaz de competir en la rizosfera de varias especies de plantas, y que le proporcionan mayores posibilidades de subsistencia que a otros diazótrofos en el nicho ecológico. Se han propuesto algunos mecanismos de acción:



Fig. 2. *A. brasilense* Sp7. Flagelo polar y laterales (Fuente: Krieg & Döbereiner, 1986).

II.4 Fijación de nitrógeno

Todas las cepas silvestres de *Azospirillum* fijan nitrógeno atmosférico, ya sea como bacterias de vida libre o en asociación con las plantas, y participan en varias transformaciones relacionadas con el ciclo del nitrógeno ya que se sugiere que el principal elemento asimilado es en forma de gas nitrato o amonio para que las plantas puedan directamente asimilarlo (Tarrand *et al.* 1978).

Después de la inoculación de las plantas con *Azospirillum* hay un incremento total del nitrógeno en brotes y en los granos, de aquí que la fijación de nitrógeno fuera el primer mecanismo principal sugerido para explicar el incremento del crecimiento vegetal por la presencia de *Azospirillum*.

Las bacterias diazotróficas aportan concentraciones de nitrógeno a las plantas en ambientes pobres en nitrógeno fundamentando el hecho de que la actividad de la nitrogenasa en las raíces se incrementa significativamente (Holguin, 1999). *Azospirillum* puede producir grandes cantidades de nitritos, debido a su alta capacidad de reducción desasimilatoria de los nitratos, los cuales al alcanzar concentraciones de 0.1-2.0 mM producen un efecto similar al del ácido indol-3- acético (AIA), estimulando el crecimiento de las raíces de varias plantas. Estudios sobre la inoculación de trigo y maíz han indicado que de 5 a 10% y hasta 18% del nitrógeno total de la planta, se deriva de la fijación de nitrógeno. Sin embargo, este dato es controversial ya que estudios han mostrado baja y a veces insignificante concentración de nitrógeno que *Azospirillum* aporta a las plantas y que la bacteria fija nitrógeno principalmente para satisfacer sus propias necesidades (Kucey, 1988).

Los genes involucrados en la fijación de nitrógeno (genes *nif*, identificados en *A. brasilense*), están localizados en por lo menos cuatro regiones del genoma las cuales abarcan un mínimo de 65 kb de ADN (Singh *et al.* 1989).

Tanto la actividad como la síntesis de la nitrogenasa son procesos metabólicos que requieren una considerable cantidad de energía y metabolitos, por lo que la actividad de la nitrogenasa está estrictamente regulada por la concentración intracelular de amonio u otras formas de nitrógeno, además también está regulada por el sistema DraT/DraG. Sin embargo la nitrogenasa se inactiva irreversiblemente a concentraciones altas de oxígeno, por lo cual *Azospirillum* fija nitrógeno en condiciones microaerofílicas de 0.2 kPa de oxígeno aproximadamente, aunque esta concentración varía entre cepas y especies (Hartmann & Baldani, 2006).

Por otro lado, se ha reportado la producción del óxido nítrico (NO) por *A. brasilense* Sp245 (Creus *et al.* 2005). La evidencia actual indica que existe una importante conexión entre el NO y las hormonas vegetales clásicas, particularmente las auxinas, durante el desarrollo del sistema radical. Recientemente se demostró la participación del NO en la formación de raíces laterales en plántulas de tomate inoculadas con *A. brasilense* Sp245, utilizando un secuestrador específico de NO, cuya aplicación resultó en la inhibición de la formación de raíces laterales (Creus *et al.* 2005; Molina-Favero *et al.* 2007). Estos resultados muestran que el NO es un componente clave en la promoción del crecimiento inducido por *Azospirillum*.

II.5 *Azospirillum* secreta diversas hormonas que estimulan el crecimiento de las plantas

Especies de *Azospirillum* son capaces de producir y secretar hormonas vegetales que actúan como señales y efectores que en una concentración baja estimulan el crecimiento de las plantas (Duca *et al.* 2014). Una de las principales es el ácido indol-3-acético (AIA) que controla procesos como alargamiento, división celular y diferenciación de tejidos, modificando así diferentes órganos de las plantas, como el sistema radical. Los análisis bioquímicos y genéticos en *A. brasilense* revelaron que existen cuatro vías para la biosíntesis del AIA durante todas las etapas de crecimiento: tres vías dependiente de triptófano, la vía indol-3-piruvato (IPA), indol-3-acetamida (IAM) y vías triptamina (TAM) y una vía independiente de triptófano (Glick, 2014).

La vía de IPA es de gran importancia en *Azospirillum* y proporciona 90% del IAA sintetizado, se ha descrito en numerosas bacterias tales como la fitopatógena *P. agglomerans*, las benéficas *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Rhizobium* y *Enterobacter cloacae*, y cianobacterias. La enzima clave de esta vía es la indol- 3-piruvato descarboxilasa (codificada por el gen *ipdC*) (Spaepen *et al.* 2007; Glick, 2014).

Varias cepas de bacterias diazotróficas asociativas utilizaron de un 0.28 a 1.0% del triptófano disponible para la producción de AIA. La producción de AIA se incrementó con la presencia de amonio en el medio de cultivo, así como en el inicio de la fase exponencial de las células, por lo que se le considera un metabolito secundario.

Otras hormonas detectadas en concentraciones más bajas, pero biológicamente significativas, son el ácido indoláctico (ALA), ácido indol-3-butírico (IBA), indol-3-etanol, indol-3-metanol y compuestos derivados de indol no identificados. También produce varias giberelinas (GAs), ácido abscísico (ABA), citocininas o citoquininas (CK) y etileno

solo bajo diferentes fuentes de carbono y en presencia de metionina en el medio (Strzelczyk *et al.* 1994). Otras fitohormonas han sido identificados, tales como el jasmonato, brasinoesteroides y estrigolactona (Shan *et al.* 2012).

Yahalom *et al.* (1991) encontraron que el efecto de la hormona AIA sobre las raíces dependió de su concentración; concentraciones de 10^{-8} M estimularon la elongación radicular, mientras que concentraciones mayores que 10^{-6} M la inhibieron y redujeron la longitud de la zona de elongación. Las hormonas vegetales pueden promover la capacidad de *Azospirillum* para fijar nitrógeno así como su crecimiento.

Además, bajo las fluctuaciones ambientales y las limitaciones de nutrientes, especialmente nitrógeno, carbono y fósforo, los niveles de AIA se incrementan. En las plantas, citocininas regulan la división celular, y se han asociado con brote y morfogénesis de raíz (Spaepen *et al.* 2009). La zeatina, el principal tipo CK, se ha reportado en *A. brasilense* y *A. lipoferum* (Molina- Favero *et al.* 2007; Esquivel *et al.* 2010).

Las GAs y el ácido abscísico (ABA), producidos por cepas de *Azospirillum*, parecen contribuir al alivio de estrés hídrico y en los mecanismos de defensa en las plantas (Vacheron *et al.* 2013; Cohen *et al.* 2015). ABA es una fitohormona inducida en respuesta al estrés ambiental, tal como sequía, pH extremo, metales pesados, luz y estrés salino (Bauer *et al.* 2013).

En el 2013 se demostró que *A. brasilense* Sp245 produce ABA y que esta producción se incrementa cuando el NaCl (100 mM) es incorporado al medio de cultivo, además de que la inoculación de *Arabidopsis thaliana* con *A. brasilense* Sp245 incrementa dos veces la concentración de ABA en la planta (Cohen *et al.* 2008). Estos resultados refuerzan la idea que este género sintetiza ABA y explica los efectos benéficos de *Azospirillum* en plantas bajo condiciones de estrés.

Se conoce que *Azospirillum* sp produce poliaminas y aminoácidos en medios de cultivo (Bashán y De-Bashán 2010). Espermina, espermidina, putrescina y cadaverina son polímeros orgánicos genéricamente llamado poliaminas y están relacionados con el crecimiento de raíces y mitigación de estrés en plantas (Gupta *et al.* 2013). Tolerancia de las plantas al estrés ambiental uno de ellos el NaCl mediada por *Azospirillum* puede implicar ABA o solutos compatibles como prolina, poliaminas y trehalosa (Cohen *et al.* 2015).

Azospirillum sp induce la biosíntesis de ácido fenilacético y bacteriocinas que son metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (Walker *et al.* 2011; Vacheron *et al.* 2013). Además también tiene un sistema muy eficiente de adquisición de hierro a través

de sideróforos, que le permite secuestrarlo en la rizosfera, haciéndolo no accesible por otros microorganismos. Además de que la bacteria tiene la capacidad de solubilizar fosfatos (Spaepen *et al.* 2009).

II.6 Absorción de minerales, actividad de membrana y relación planta-agua por *Azospirillum*

Además de afectar positiva o negativamente muchos parámetros en raíces, la inoculación de plantas con *Azospirillum* también puede afectar diversas medidas relacionados con el follaje (Kucey, 1988).

Se ha propuesto que la permeabilidad de iones como: NO_3^- , NH_4^+ , HPO_4^{2-} , K^+ , Rb^+ , y Fe^{2+} inducida por *Azospirillum*, es el factor responsable en incrementar la materia seca foliar y la acumulación de nutrientes minerales en tallos y hojas que se correlaciona con un mejor rendimiento de las partes aéreas de la planta. (Jain & Patriquin, 1984). Durante el periodo de reproducción vegetal, estos minerales pueden transferirse a las panículas y espigas, lo que resulta en un mayor rendimiento (se desconoce el mecanismo de este proceso); esto explicaría también la acumulación de compuestos de nitrógeno en la planta (Bashan *et al.* 1992).

Los cambios en la actividad del flujo de protones en raíces de trigo inoculadas con *Azospirillum*, cambios en el potencial de membrana de células radicales, en la elasticidad de la pared celular y en la concentración relativa de fosfolípidos en la membrana celular del frijol y orimón, apoyan la hipótesis que propone que la absorción de nutrimentos es más eficiente en raíces inoculadas (Bashan *et al.* 1992).

Además de promover la absorción de minerales, la inoculación con *Azospirillum* mejora factores relacionados con el incremento del consumo de agua y la conductividad hídrica en plantas de sorgo sometidas a un periodo de estrés acuoso, dando como resultado mayor concentración de agua en el follaje, mayor potencial hídrico en hojas, y menor temperatura de follaje que en plantas no inoculadas. Es probable que el estimular la absorción de agua y minerales juegue un papel vital en la asociación *Azospirillum*-planta. (Fig. 3).

II.7 Inducción de resistencia en plantas a patógenos

Otro de los mecanismos para favorecer el crecimiento vegetal, es la inducción de resistencia sistémica en plantas en contra de patógenos. Este mecanismo se ha observado en plantas de tomate inoculadas con *A. brasilense* en contra de la bacteria

patógena *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Bashan y de-Bashan, 2002). Plantas de *Oryza sativa* cv. *Nipponbare* inoculadas con *Azospirillum* B510 presentan un incremento en la resistencia en contra del hongo *Magnaporthe oryzae* y de la bacteria *Xanthomonas oryzae*, a través de la activación de un mecanismo de defensa independiente de la señalización por ácido salicílico (Yashuda *et al.* 2009). Esto sugiere que la interacción biológica entre células de la planta y células bacterianas activan el sistema de inmunidad innata de las plantas hospedantes.

La producción de sideróforos por *Azospirillum* también es un mecanismo de biocontrol. Bajo condiciones limitadas de hierro, *A. brasilense* tiene la capacidad de producir sideróforos tipo catecol, los cuales tienen actividad antifúngica *in vitro* en contra de *Colletotrichum acutatum* M11, previniendo las antracosis provocada por este hongo (Tortora *et al.* 2011).

Aunque *Azospirillum* no es bien conocido como un agente de biocontrol típico, se han descrito algunos posibles mecanismos empleados por el género para reducir el daño por patógenos, como la competencia a medioambientes, el desplazamiento de patógenos, y la posible inhibición del crecimiento de hongos vía producción de sustancias tóxicas (Bashan y de-Bashan, 2010). El ácido fenilacético es una molécula con actividad antibacteriana y antifúngica aislada de un cultivo de *A. brasilense*, Fig. 3 (Somers *et al.* 2005; Rajkumar *et al.* 2010).

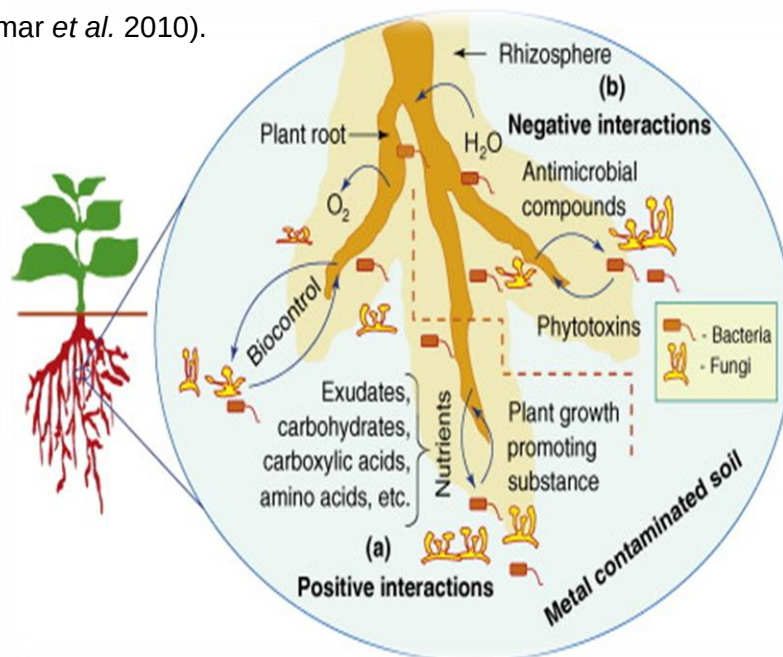


Fig. 3. Múltiples mecanismos que poseen las PGPR que promueven el crecimiento de las plantas a nivel de la rizosfera. Estos mecanismos incluyen liberación de compuestos antimicrobianos, sustancias y aumento del consumo de agua, así como también las raíces secretan diversos nutrientes, habiendo una relación benéfica bacteria- planta. (Fuente: Rajkumar *et al.* 2010).

II.8 Colonización de diversos cultivos con *Azospirillum*

La inoculación de plantas con *Azospirillum*, puede dar como resultado un cambio significativo en varios parámetros de crecimiento, los cuales pueden afectar o no el rendimiento de la cosecha.

Al evaluar datos acumulados, a nivel mundial, durante los últimos veinte años sobre experimentos de inoculación con *Azospirillum*, en muchos cultivos de importancia agronómica (Okon y Labandera-González, 1994) concluyeron que se obtuvieron efectos positivos en el rendimiento total de la cosecha de 50 a 270% en relación con los controles con plantas no inoculadas. Además, incrementan el rendimiento entre un 5 y 30% en maíz, trigo, sorgo, arroz y leguminosas y hasta el 75% de incremento con cereales de verano (Dobbelaere *et al.* 2001). En otros estudios la inoculación de trigo incrementó significativamente el rendimiento de la cosecha, desde 23% hasta 63% (Caballero *et al.* 1992). En 70-75% en macetas con algodón y en varios vegetales se obtuvo un incremento significativo en el rendimiento desde 23% hasta 72% (Bashan y Levanon, 1989). También se ha reportado un efecto a simple vista sobre el crecimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), berenjena (*Solanum melongena* L.), pimiento (*Capsicum annuum*) y algodón (*Gossypium barbadense*) (Kapulnik *et al.* 1983).

Un incremento hasta de 20% en el rendimiento se considera comercialmente valioso para la agricultura moderna, siempre y cuando estos resultados sean consistentes. Por lo tanto, existen algunas preparaciones comerciales de *Azospirillum* disponibles en el mercado (Fages, 1992).

Estos cambios se encuentran directamente relacionados con la concentración del inóculo; cuando éste es superior a los niveles óptimos tiene efectos inhibitorios, mientras que dosis bajas no causan efecto. El nivel de inoculación óptimo en semillas y plántulas para muchos cereales, y en vegetales y plantas de cultivo comerciales, se ha observado que es de alrededor de 10^5 - 10^6 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) (Bashan, 1986; Bashan y Levanony, 1989), mientras que para el maíz es de 10^7 UFC/mL. Una concentración de inóculo de 10^8 - 10^{10} UFC/mL generalmente inhibe el desarrollo radicular sin afectar el desarrollo de raíces laterales y pelos radicales (Bashan, 1986; Spaepen *et al.* 2008) (Fig. 4). Vandenhove *et al.* (1993) encontraron que si el inóculo de *A. brasilense* se toma de la fase exponencial del cultivo, las bacterias sobreviven mejor en suelo que si se toma el inóculo de la fase estacionaria.

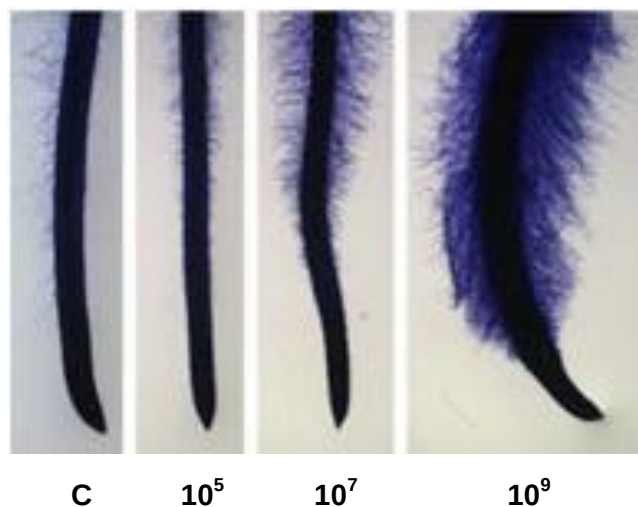


Figura 4. Efecto de *A. brasilense* sobre el desarrollo de la raíz. C, control; UFC; unidades formadoras de colonias. (Fuente: Spaepen *et al.* 2008).

II.9 Efectos de la colonización radicular

Los efectos positivos de la inoculación se reflejan en diversos parámetros morfológicos de la raíz incremento en la longitud, diámetro (particularmente en la zona de elongación) en el número y longitud de las raíces laterales y adventicias lo cual incrementa el volumen radicular, incremento en el peso seco de la raíz, en la velocidad de respiración de la raíz (Umali-Garcia *et al.* 1980), en el número, densidad y aparición temprana de pelos radiculares, en el área de superficie radicular (Bashan, 1986), promoción de la división celular en el meristemo radicular, cambios en los arreglos celulares de la corteza, estimulación de la exudación radicular y cambios en la morfología externa de las raíces (Bashan y Levanony, 1989; Vacheron *et al.* 2013) (Fig. 5).

La secuenciación reciente del genoma de *Azospirillum* demuestra que este género codifica un número sustancial de glicosil hidrolasas, enzimas que son esenciales para romper la pared celular de la planta. El número de celulasas y hemicelulasas de este género es comparable al encontrado en bacterias que tienen la capacidad de degradar la pared celular, y muchas de estas se cree que fueron adquiridas horizontalmente (Wisniewski- Dyé *et al.* 2011), sugiriendo que *Azospirillum* puede colonizar el interior de la raíz a través de la degradación de componentes de la pared celular de la raíz.

Azospirillum además de colonizar la parte interna, también puede colonizar la parte externa de la raíz, en ésta última, las bacterias tienden a formar pequeños agregados, aunque es posible encontrar también células aisladas distribuidas a lo largo de la

superficie radicular. Por otro lado, las bacterias colonizadoras de la parte externa de la raíz se encuentran embebidas en la capa mucilaginosa que cubre la superficie radicular (Bashan, 1986). Tanto raíces vivas como muertas pueden ser colonizadas (Bashan y Levanony, 1988; Bashan, 1986). En el proceso de colonización interna, las células de *Azospirillum* pueden invadir las raíces penetrando a través de los espacios intercelulares de la corteza (Patriquin & Döbereiner, 1978). *A. brasilense* Sp245 se encontró repetidamente en altas densidades en el interior de células de pelos radiculares en plantas de trigo (Assmus *et al.* 1995). Mientras que Sp7 se ha localizado en las raíces superficiales y coloniza principalmente los pelos de la raíz y puntas de las raíces (Van de Broek *et al.* 1993).

En cereales, la colonización ocurre principalmente en la superficie radicular y muy pocas bacterias se adhieren a los pelos radiculares (Bashan y Levanony, 1988), mientras que en arroz se observa con frecuencia colonización masiva en estas estructuras. Se ha demostrado que *Azospirillum* no sobrevive bien en suelos sin plantas (Bashan y Holguin 1995).

Se han identificado dos fases en el mecanismo de adhesión de *Azospirillum* a raíces de trigo. La primera fase del proceso consiste en una adhesión rápida y débil, dependiente de proteínas superficiales bacterianas. El segundo paso (llamado anclaje) bajo condiciones *in vitro* es independiente del primero y consiste en un anclaje firme caracterizado por la producción de fibrillas largas formando una red que conecta las células de *Azospirillum* entre sí y a la superficie radicular de las plantas (Bashan y Holguin, 1993) e involucra la participación de un polisacárido extracelular (Michiels *et al.* 1991).

Se ha sugerido que el mecanismo de adhesión bacteria-planta está mediado por lectinas expuestas en la superficie celular de la bacteria o contenidas en el material fibrilar (Bashan y Levanony, 1988). Es probable que la lectina de *A. brasilense* se involucra en la recepción de la aglutinina de germen de trigo (una de las lectinas de plantas más estudiadas). Se encontró que la adición de aglutinina de germen de trigo a *A. brasilense* Sp245 promovió la fijación de nitrógeno, provocó cambios en la proporción relativa de los fosfolípidos ácidos de la membrana, la excreción de amonio y la síntesis de AIA. Estos resultados sugieren la hipótesis de que la aglutinina de germen de trigo tiene la función de molécula de comunicación celular que altera el metabolismo de *Azospirillum* en beneficio de la planta (Alenkina *et al.* 2014b).

En síntesis, el mecanismo de colonización radicular de *Azospirillum* varía dependiendo de la cepa bacteriana, especie vegetal, condiciones ambientales (humedad del suelo, temperatura y pH), el nivel de fertilización con nitrógeno, factores químicos, fisiológicos y nutricionales y otros todavía no identificados. La interacción entre todas estas variables crea diferencias en grados y patrones de colonización radicular, tamaños poblacionales, y sitios de colonización.

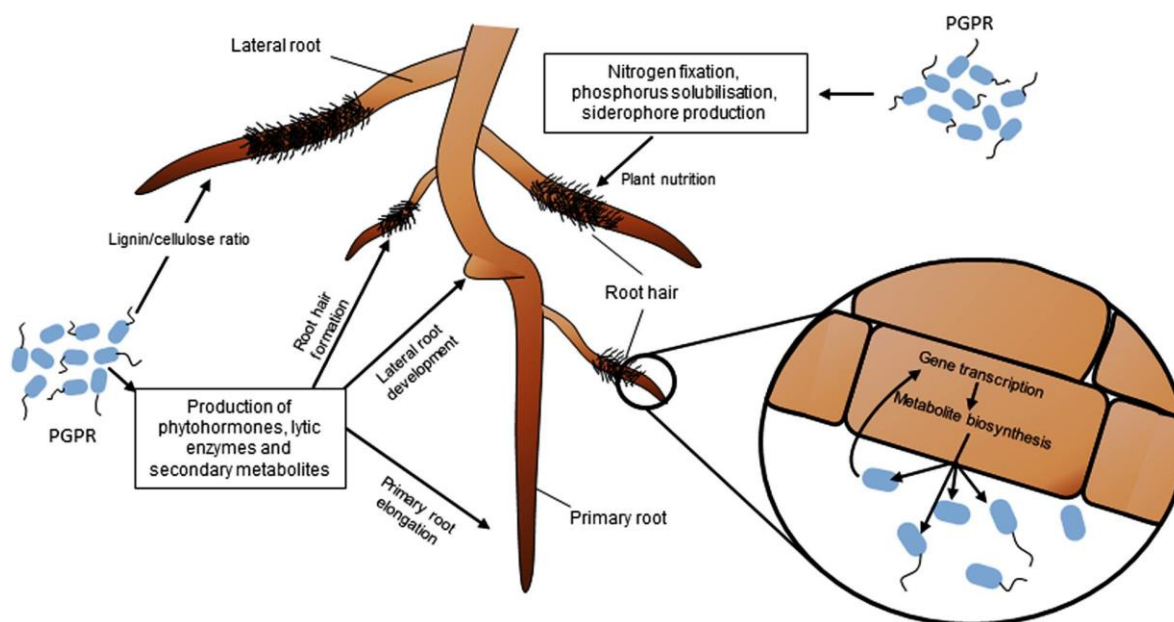


Fig. 5. PGPR puede modular el desarrollo de raíces y el crecimiento a través de la producción de fitohormonas, metabolitos secundarios, y enzimas. Los efectos más comúnmente observados son una reducción de la tasa de crecimiento de la raíz primaria, y un aumento en el número y la longitud de las raíces laterales y pelos radiculares en general modificando la fisiología de la raíz. (Fuente: Vacheron *et al.* 2013).

II.10 Floculación

En condiciones de estrés, como radiación ultravioleta, desecación o tensión osmótica y escasez de nutrientes, *Azospirillum* es capaz de formar quistes, los cuales incrementan de manera significativa el índice de supervivencia de las células (Bashan *et al.* 1991).

Azospirillum acumula grandes cantidades de poli- β -hidroxibutirato (PHB) (hasta 70% de su peso seco) el cual puede ser almacenado para una bioconversión posterior o utilizado como fuente de energía cuando el organismo se enfrenta a escasez de nutrientes (Bashan *et al.* 1991).

Se demostró que las formas enquistadas ricas en PHB sobreviven mejor que células sin PHB, siendo los quistes formas celulares fisiológicamente activas en la rizosfera del trigo. Estos fenómenos pueden ser resultado de la edad, condiciones del cultivo o estrés por falta de agua (Bleakley *et al.* 1988).

III. La movilidad, la quimiotaxis y su papel crucial en la ecología microbiana

Los microorganismos han desarrollado una gran cantidad de estrategias para adaptarse a los cambios espaciales y temporales en el medio ambiente. Además, muchas bacterias son capaces de forma rápida y transitoria de responder a cambios en el medio ambiente. En bacterias móviles, estas respuestas adaptativas transitorias incluyen la capacidad de navegar hacia las condiciones más favorables (nutrientes) y de alejarse de ambientes desfavorables (tóxicos) en su microambiente. Este comportamiento se denomina quimiotaxis es el movimiento de células a lo largo de un gradiente de concentración química ya sea acercándose o alejándose del estímulo químico. Otros tipos de taxis son: aerotaxis cuando responden a gradientes de oxígeno, fototaxis cuando responden a gradientes de luz, taxis de pH cuando responden a gradientes de pH, etc. (Wadhams & Armitage, 2004).

Además, debido a su pequeño tamaño, bacterias móviles no detectan gradientes espacialmente, en su lugar, utilizan la detección temporal en el que se comparan las condiciones actuales con las que se encontraron unos pocos milisegundos antes (Alexandre *et al.* 2015).

Un paso clave para que las PGPB ejerzan efectos de promoción del crecimiento es el logro de una efectiva colonización de las raíces. La unión de *Azospirillum* a las raíces de las plantas es esencial para la asociación eficiente con la planta huésped y la evidencia experimental en apoyo de esta hipótesis se ha obtenido (Bashan & Holguin 1994; Greer-Phillips *et al.* 2004). La planta excreta hacia la rizosfera exudados que atraen a muchos microorganismos, como las rizobacterias. La movilidad bacteriana en la rizosfera responde a la quimiotaxis, lo que les permite moverse hacia las raíces y obtener beneficios de exudados de la raíz (fuente de carbono y nitrógeno) (Vanderbroek *et al.* 1995; Okon *et al.* 1980).

En una primera etapa, las bacterias se adsorben a las raíces como células individuales de una manera rápida, débil y reversible. Varias líneas de evidencia sugieren la participación del flagelo polar en esta fase de adsorción.

La fase de adsorción es seguida por la fase de anclaje en la que se forman los agregados bacterianos que están firmemente anclados y de forma irreversible a las raíces logrando la formación de biopelículas (Steenhoudt *et al.* 2000; Guerrero-Molina *et al.* 2012) (Fig. 6).

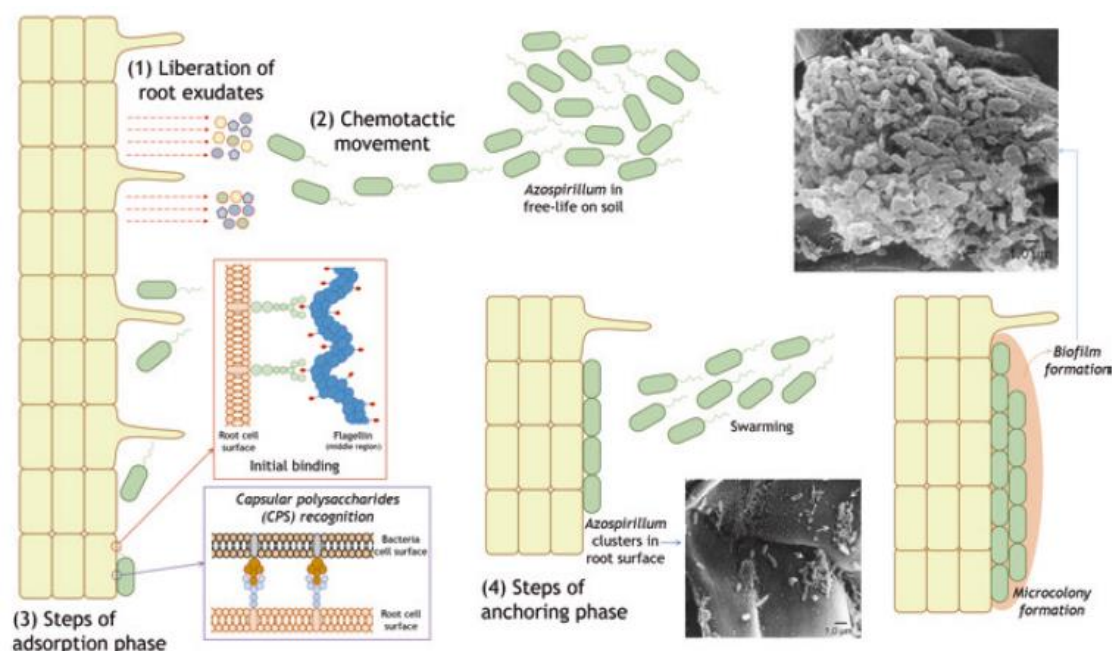


Fig. 6. Etapas de unión de *Azospirillum* sp a raíces de las plantas (las micrografías electrónicas de barrido SEM) son raíces colonizadas por *A. brasilense* (Fuente: Guerrero-Molina *et al.* 2012).

La movilidad proporciona una ventaja de supervivencia bajo una amplia variedad de ambientes, permitiendo que las bacterias respondan a condiciones benéficas o negativas para competir con éxito con otros microorganismos. Se ha reportado movimiento activo de *A. brasilense* hacia raíces de trigo y exudados de las raíces de diferentes variedades de fresa que causaron quimiotaxis positiva ya que coloniza los tejidos internos de las raíces y estolones. El uso de diferentes mutantes de la movilidad en *A. brasilense* en un ensayo de colonización, demostró directamente el requisito de movimiento quimiotáctico bacteriano para la iniciación de colonización de la raíz (Pedraza *et al.* 2009). Este efecto fue mayor con las cepas endofíticas que con los colonizadores de la superficie externa de la raíz. Se observaron resultados similares en el estudio de la respuesta quimiotáctica de bacterias endofíticas y de la rizosfera hacia exudados de las raíces del arroz (Bacilio-Jiménez *et al.* 2003).

Las bacterias del género *Azospirillum* son móviles por medio del flagelo polar en medios líquidos (swimming) y sintetiza múltiples flagelos laterales cuando se mueve a través

superficies o entornos viscosos que se hace referencia como la movilidad en superficie tipo "swarming" (Hall & Krieg, 1983; Pereg *et al.* 2000). La función principal de los flagelos bacterianos implica la locomoción y permite que las bacterias se dirijan hacia un entorno más favorable, utilizando la información ambiental para dirigir el movimiento. Se ha demostrado que el flagelo polar de *A. brasilense* gira en ambas direcciones, en sentido y en contra de las manecillas del reloj.

El flagelo polar y laterales no sólo son funcionalmente diferentes, si no que incluyen un conjunto distinto de proteínas estructurales (Moens *et al.* 1996). La proteína estructural del flagelo polar, FLA1, parece ser una glicoproteína que actúa como una adhesina a la superficie de la raíz de las plantas. Mutantes no flagelados-así como una cepa mutante deteriorado en respuesta quimiotáctica demostraron una reducción de la colonización del sistema de raíces que sugiere que el movimiento activo de *Azospirillum* es importante para la iniciación de la colonización de la raíz (Vande Broek *et al.* 1998).

La movilidad y la quimiotaxis han sido mejor descritas en la cepa *A. brasilense* cepa Sp7, es este el modelo para el estudio del comportamiento de taxis en este género bacteriano. La cepa Sp7 mostró una fuerte respuesta quimiotáctica a tres ácidos orgánicos: malato, succinato, piruvato, y a los aminoácidos glutamato y prolina.

Un estudio mostro una disminución significativa (cerca del 20%) en la respuesta quimiotáctica con varios sustratos metabolizables, en el caso de la cepa mutante *chsA::Km^R* (Sp74031) en comparación con el tipo silvestre. El estudio realizado revelo que la mutante es una cepa que no está alterada en el crecimiento, pero muestra reducción en la movilidad en placas de agar suave. La microscopía electrónica e inmunoquímica usando anticuerpos policlonales contra ambos flagelos revelaron que Sp7, Sp7S y 74031 poseían flagelos tanto polar y laterales lo que sugiere que el defecto de la motilidad no fue debido a la falta de flagelos laterales, pero en lugar de ello puede ser debido a una diferencia en respuesta quimiotáctica (Carreño-López *et al.* 2009).

La respuesta de quimiotaxis por lo general hace referencia a un comportamiento independiente del metabolismo, mientras que el uso de "taxis de energía" denota el comportamiento dependiente del metabolismo que es la mayoría de las taxis en *A. brasilense*. La respuesta de quimiotaxis hacia un determinado producto químico generalmente se correlaciona con su concentración.

Los atrayentes más fuertes para *A. brasilense* son también los mejores sustratos de crecimiento, y las células en inanición muestran una respuesta de quimiotaxis mejorada, mientras que sus análogos no metabolizables no son atrayentes ya que la inhibición del metabolismo de un atrayente químico suprime completamente la quimiotaxis a este compuesto (Alexandre *et al.* 2000). Diversos estudios han mostrado que ciertas cepas de *A. brasilense* muestra quimiotaxis positiva y son fuertes atrayentes hacia diversos compuestos tales como los ácidos orgánicos que son productos intermediarios del ciclo del ácido cítrico, como malato y succinato (Zhulin & Armitage, 1993), incluyen el piruvato, citrato, oxalato, fumarato que también son buenos atrayentes para esta especie.

Entre los azúcares fructosa es uno de los más fuertes atrayentes, pero ribosa, arabinosa, galactosa también son buenos atrayentes de *A. brasilense*. Como en muchas otras especies bacterianas, la quimiotaxis a galactosa es inducible y no se detecta a menos que las células se cultiven en presencia de galactosa antes de la detección de quimiotaxis (Alexandre *et al.* 2000). Incluye la expresión de un sistema específico de transporte ABC, éste utiliza una proteína de unión periplásmica llamado SbpA; una mutante que carece de SbpA está alterada específicamente en la quimiotaxis y el metabolismo a este compuesto (Van Bastelaere *et al.* 1999).

Es digno de mención para indicar que *A. brasilense* no puede mostrar la quimiotaxis hacia glucosa. Esta observación tiene sentido si se considera que la glucosa no es una fuente de carbono utilizada por *A. brasilense* ya que no la puede metabolizar.

Los aminoácidos como glutamato, aspartato, alanina, glutamina, asparagina son atrayentes débiles de *A. brasilense*. La atracción débil de estos aminoácidos para provocar una respuesta de quimiotaxis puede resultar del metabolismo diazotrófico de *Azospirillum* spp. Por lo tanto existe una dependencia limitada de aminoácidos como fuente de carbono para el crecimiento de *A. brasilense* (Barak *et al.* 1983). La glicina, histidina, isoleucina, treonina, valina, arginina, lisina, y metionina no son buenos quimioefectores de *A. brasilense* (Okon *et al.* 1980; Alexandre *et al.* 2000).

III.1 Taxis a receptores de electrones alternativos

En ausencia de oxígeno, *Azospirillum* spp es capaz de utilizar aceptores terminales de electrones alternativos para la respiración que incluyen al: nitrato, nitrito, y DMSO. Por lo tanto, no es sorprendente que la quimiotaxis en los gradientes de aceptores de electrones

alternativos también se hayan descrito en *A. brasilense* (Alexandre *et al.* 2000). La respuesta a taxis no se observa si no se proporcionan un donador de electrones a las células en forma de un sustrato de carbono para el crecimiento.

III.2 Redox Taxis

Las células móviles de *A. brasilense* demuestran una respuesta repelente a quinonas oxidadas: la respuesta repelente aumenta con la disminución de potencial redox de la quinona analizada (Alexandre *et al.* 2000).

En *A. brasilense* se requiere un sistema de transporte de electrones funcional, esta respuesta se incrementa cuando están las células privadas de nutrientes (Alexandre *et al.* 2000). Donadores y aceptores de electrones son excelentes atrayentes de *A. brasilense*, mientras que los productos químicos como quinonas o mixotiazol que bloquean el transporte de electrones en la cadena transportadora de electrones, desencadenan una respuesta fuerte de repelente.

III.3 Taxis de energía como el modo dominante de detección del medio ambiente

La mayoría de respuestas a taxis de células móviles de *A. brasilense* parecen originarse por taxis energética que se refiere a la capacidad de células móviles para navegar en gradientes de parámetros físico químicos que afectan a los procesos celulares de generación de energía, es decir la cadena de transporte de electrones (Alexandre, 2010).

Los ligandos químicos son detectados por los quimiorreceptores de la superficie celular llamadas proteínas MCP (Acrónimo del inglés Methyl accepting protein). Tras la unión del ligando quimiotáctico, MCP generan señales quimiotácticas que son comunicadas al motor flagelar a través de una serie de proteínas de quimiotaxis (Che) (Pedraza *et al.* (2007).

Varios de los genes que codifican a las proteínas Che de la vía de transducción central en quimiotaxis en otras especies bacterianas (CheA, W, Y, B y R) se requieren para dirigir la movilidad en *A. brasilense* (Hauwaerts *et al.* 2002; Bible *et al.* 2008.). Ya que se ha reportado que se ha reducido parcialmente la respuesta quimiotáctica de mutantes CheB, CheR, CheBR, y CheA, lo que sugiere múltiples sistemas de quimiotaxis en *Azospirillum*, además se demuestra afectada la colonización de la raíz del trigo, es interesante mencionar que las mutantes son todavía capaces de colonizar las raíces, esto puede ser porque la quimiotaxis afecta competitividad en las bacterias y no por su capacidad

intrínseca para formar una asociación con las raíces de las plantas (Stephens *et al.* 2006; Bible *et al.* 2008).

En *A. brasilense*, la MCP Tlp1 que en su estructura presenta los dominios funcionales característicos de los quimiorreceptores, además juega un papel clave en la taxis energética y colonización de raíz del trigo. Esto indica que la proteína Tlp1 guía a la bacteria por lo que le permite localizar y navegar hacia un óptimo hábitat para el crecimiento. Además Tlp1 contiene un dominio Pilz C-terminal que se une a di-GMPc con afinidad micromolar (Greer-Phillips *et al.* 2004; Russell *et al.* 2013).

III.4 Tipos de Movilidad

Se ha estudiado la movilidad superficial en más de 40 especies bacterianas perteneciendo a 18 géneros diferentes y se consiguió identificar varios tipos de movimiento: movimiento natatorio (*swimming*), movimiento en superficie (*swarming*), movimiento de deslizamiento (*gliding*), movimiento contráctil (*twitching*), movimiento con tensoactivos (*sliding*). Los movimientos natatorio y de superficie dependen de la presencia de flagelos; el movimiento contráctil es individual y requiere la presencia del pilus tipo IV y el movimiento tipo de deslizamiento es cooperativo y se produce a lo largo del eje mayor del microorganismo sin ayuda de flagelos ni de pilus, (Henrichsen, 1972; Römling *et al.* 2013).

La movilidad en superficie requiere el contacto con una superficie sólida. Pero además cabe destacar que todos los desplazamientos microbianos sobre superficies han sido estudiados principalmente sobre superficies de agar.

Ferreira y sus colegas han comenzado a esclarecer los detalles moleculares del control basado en di-GMPc y la movilidad en superficie en *Vibrio parahaemolyticus*. Una disminución en los niveles de di-GMPc activa la movilidad y un aumento en los niveles de di-GMPc reduce la expresión de genes que codifican *laf*, (subunidad importante de los flagelos laterales involucrada en el movimiento en superficie) (Ferreira *et al.* 2008).

Esta regulación se ha establecido en *P. aeruginosa*, tres proteínas implicadas en la biogénesis del pilus elevan los niveles de di-GMPc generado por las proteínas diguanilato ciclasa (DGC) SadC, es degradado por la fosfodiesterasa (PDE) BifA y regulado por SadB, por lo tanto se inhiben la movilidad en superficie (Kuchma *et al.* 2012).

III.5 Movimiento en superficie (swarming)

Este ensayo se lleva a cabo en placa de agar blando, en medio semi solidificado (baja concentración de agar). Mide la capacidad de células móviles en superficie hacia gradientes atrayentes creados a través del metabolismo celular. Se utiliza una sola fuente de carbono y nitrógeno que las células usan para el crecimiento.

Debido a que aerotaxis es una respuesta importante en *A. brasilense*, que guía a la bacteria a una concentración baja de oxígeno necesaria para la generación de energía (3 a 5 μm) se recomienda que las placas sean amplias y no contengan poco volumen de medio (por ejemplo, 25 ml de medio fundido / placa).

Las células que crecen en el punto de inoculación agotan el entorno local de carbono y fuentes de nitrógeno, si estas células son móviles y capaces de navegar por gradientes químicos (es decir, capaces de respuestas quimiotaxis), se alejan de esta zona de inoculación hacia mayores concentraciones de nutrientes y por lo tanto se extenderán hacia el exterior. La presencia de un anillo de quimiotaxis, visto como una zona densa de células con la caída de la densidad de células antes y después de esta zona, es indicativo de que la quimiotaxis o taxis a aceptores de electrones alternativos, se realiza en condiciones microaerofílicas (Alexandre *et al.* 2015).

III.6 Quimiotaxis en *Azospirillum* spp.

Los genomas de especies de *Azospirillum* secuenciados hasta el momento indican la presencia de varias vías de transducción de señales codificadas en operones de quimiotaxis y un gran número de receptores (Wisniewski- Dyé *et al.* 2011).

Las bacterias del género *Azospirillum* tienen un repertorio de receptores de quimiotaxis muy grande, lo que complica la identificación de sus capacidades sensoriales. De hecho la mayoría de los receptores de quimiotaxis aún no se conoce (Krell *et al.* 2011).

Esta complejidad también sugiere que la transducción de señales de quimiotaxis provee a *Azospirillum* de una ventaja competitiva en el suelo y la rizosfera. Tal repertorio de receptores de quimiotaxis probables sugiere que *Azospirillum* spp podría controlar diversas señales ambientales. De las múltiples vías de quimiotaxis codificadas en los genomas de *Azospirillum* spp la mayor parte se predice que controla la movilidad flagelar y por lo tanto probablemente la movilidad en superficie y /o natatoria (Soh *et al.* 2010) (Fig. 7).

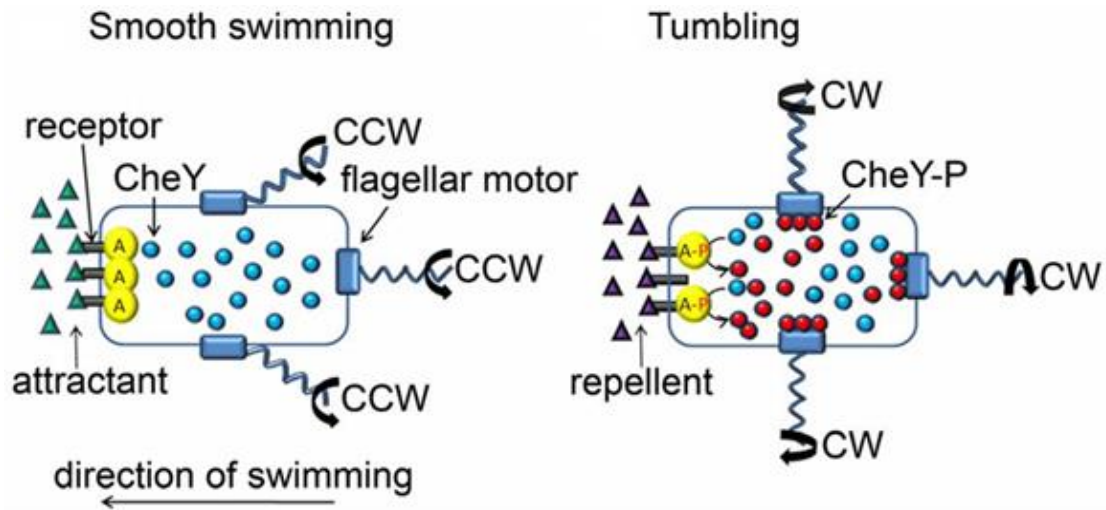


Fig. 7. Las bacterias muestran dos patrones de movimiento diferentes dependiendo de la dirección del motor flagelar. En sentido en contra de las manecillas del reloj (CCW) dan resultados de rotación en la natación suave bacteriana, mientras que la rotación en sentido de las manecillas del reloj (CW) provoca contracción bacteriana. Cuando los receptores de superficie se unen a moléculas atrayentes, autofosforilación de cinasa CheA (indicada como A) se inhibe y CheY permanece inactivo (no fosforilado). Los flagelos están girando CCW, lo que resulta en una formación de un haz flagelar estable y suave en la natación en una dirección de aumento de la concentración atrayente (Fuente: Soh *et al.* 2010).

IV. Formación de Biopelícula

Las bacterias pueden existir en la naturaleza bajo dos formas o estados:

- a) bacterias planctónicas, de libre flotación y suspendidas en el fluido
- b) bacterias sésiles (formadoras de biopelícula), creciendo en colonias de microorganismos adheridas a superficies sólidas.

Se ha reportado que el 99% de todas las células bacterianas existen en calidad de biopelícula, y tan sólo 1% vive en estado planctónico (Ramadan *et al.* 2005).

La importancia de las biopelículas se comenzó a estudiar desde mediados de la década de 1970, cuando se comentaba sobre la naturaleza de las formas en que se encontraban los microorganismos en su hábitat (Betancourth *et al.* 2004). Hasta el año 1987, se consideraba que las biopelículas eran simples cúmulos de material polimérico dentro del cual se encontraban embebidas aleatoriamente las células microbianas sin ningún tipo de organización. Definiéndose a los biofilms o biopelículas como una comunidad de bacterias adheridas a una superficie sólida e inmersa en un medio líquido (Costerton *et al.* 1987).

Estudios posteriores, con técnicas más avanzadas permitieron a Donlan en 2002 efectuar una descripción ampliamente aceptada de biopelícula, estableciendo que es “una

comunidad microbiana sésil, caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente a un sustrato o interface, o unas con otras, mantenidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares producidas por los microorganismos, y que presentan un fenotipo alterado en relación con la tasa de crecimiento y transcripción génica". (Donlan, 2002; Arruebarrena *et al.* 2012). Pueden estar formados por una o más especies de diferentes géneros y presentan similitudes en relación a las características estructurales y al comportamiento (O'Toole *et al.* 2000).

Estas comunidades microbianas de estructura tridimensional aunque su composición es variable, la matriz está formada por exopolisacáridos (EPS), compuesta por un revestimiento de bacterias, nucleótidos, ADN exógeno (eDNA), pilus, proteínas de adherencia, sustancias tenso activas, lípidos, glicolípidos, vesículas de membrana, iones tales como Ca^{2+} y fimbrias, que le sirve de protección de otras bacterias que compiten por el mismo nicho ecológico. Aunque en general el componente mayoritario es el agua, que representa un 97% del contenido total. Además de que hace más eficiente su colonización a la planta. (Sutherland, 2001; Rodríguez-Navarro *et al.* 2007; Ramírez-Mata *et al.* 2014).

La sobrevivencia de los microorganismos se asocia con la adherencia y la formación de biopelículas en la superficie de la planta hospedera. Cada vez más se considera que la intensidad, duración y resultados de las interacciones bacteria-planta están bajo la influencia de la población microbiana adherida (Danhorn & Fuqua, 2007).

Las biopelículas constituyen un modo protegido de crecimiento y desarrollo que permite a los microorganismos sobrevivir en hábitats competitivos. Son estructuras microbianas complejas, que permite que el agua, pueda penetrar a través de los canales y por lo tanto los nutrientes lleguen a zonas profundas de la microcolonia dentro de la comunidad de la biopelícula. El intercambio de nutrientes, facilitado por la arquitectura de la biopelícula, permite que estas comunidades desarrollen un espesor y una complejidad considerable mientras que las células individuales que las componen se mantienen en óptimas condiciones nutricionales, en muchas ubicaciones dentro de la biopelícula. Además necesita la actividad coordinada de varios genomas de procariotas relativamente pequeños (Monds *et al.* 2009).

La formación de la biopelícula puede ocurrir por al menos tres mecanismos. Uno de ellos es la división binaria de las células adheridas (Heydorn *et al.* 2000). El segundo mecanismo es la redistribución de las células adheridas mediante la movilidad superficial. Es decir que a medida que las células se dividen, las células hijas se desplazan sobre la

superficie para formar cúmulos celulares. El tercer mecanismo es la agregación y captación de células planctónicas hacia la biopelícula desarrollada (Tolker *et al.* 2000; Salcedo *et al.* 2015) (Fig. 8).

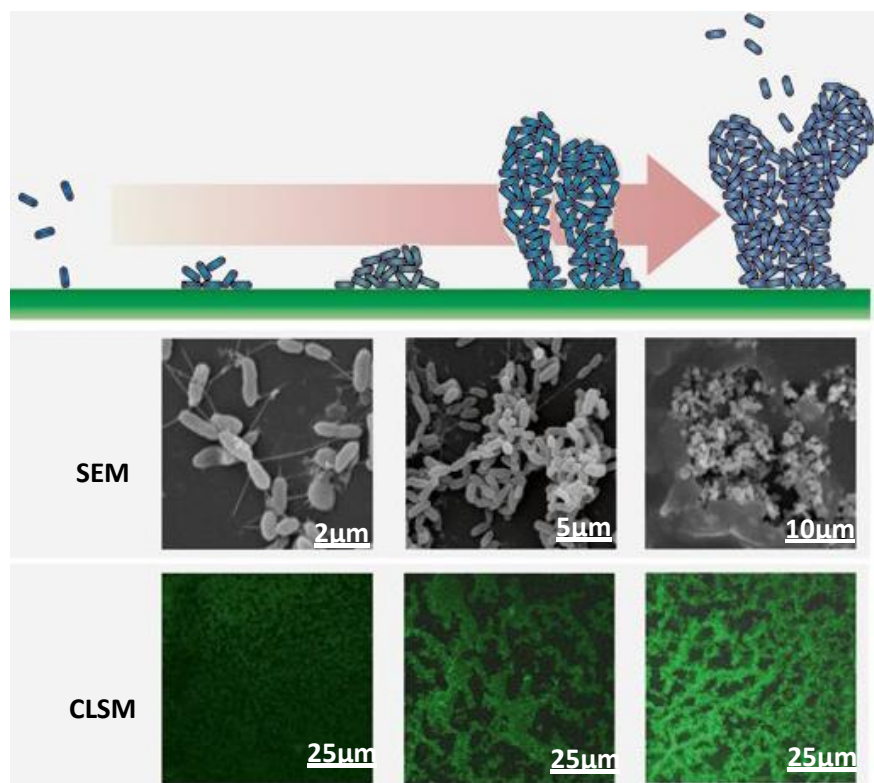


Fig. 8. Representación esquemática de las diferentes etapas de la biopelícula con *A. brasilense* Sp245 etiquetado con *gfp*, el desarrollo de la biopelícula se observa por SEM y CLSM corresponde a 1, 3, y 5 días de crecimiento. (Fuente: Salcedo *et al.* 2015).

IV.1 Etapas de la biopelícula

La materia orgánica presente en el agua se adsorbe sobre las superficies donde se formara la biopelícula y forma lo que se conoce como “película acondicionante”, cambiando las propiedades químicas y físicas de la interfase sustrato/fluido y adaptándola a la adhesión bacteriana (Schneider *et al.* 1994) (Fig. 9).

El transporte de los microorganismos es precedido por la adsorción de una fina película orgánica sobre dicho sustrato. Algunas propiedades físico químicas del sustrato pueden ser transferidas a la película condicionante alterando la composición, la densidad y la configuración de la película adquirida en cuanto al tipo de proteínas teniendo influencia en la etapa inicial de adhesión (Etapa 1 en la Fig. 9), (Davey & O'Toole, 2000).

La segunda etapa corresponde a la adhesión reversible de microorganismos puede ser de dos maneras (Etapa 2 en la Fig. 9). Activa: Vencer la repulsión neta más que actuar como adherente entre la superficie celular y el sustrato y es superada por interacciones moleculares específicas mediadas por apéndices extracelulares (por ejemplo, fimbrias, flagelo, pilis, etc.), estos últimos apéndices con movimiento del tipo contráctil o de deslizamiento. Pasiva: Factores externos tales como la gravedad, difusión, precipitación de partículas y dinámica de fluidos pueden favorecer la adhesión de los microorganismos a cualquier superficie.

Estas células todavía no se encuentran en proceso de diferenciación y pueden abandonar la superficie para volver al estado planctónico. Pueden también influir, variaciones en la velocidad de flujo, temperatura del agua, y concentración de nutrientes. Durante esta etapa, las bacterias presentan ciertos comportamientos específicos como, por ejemplo, rodar, reptar, formación de agregados y de hileras de bacterias (Lappin & Costerton, 1995).

Estas reacciones implican una adhesión firme e irreversible entre la bacteria y receptor del sustrato mediadas por estructuras poliméricas y apéndices extracelulares superficiales como, por ejemplo, cápsulas, fibrillas, fimbrias, pilis y EPS (material polimérico extracelular) (Etapa 3 en la Fig. 9) (Stoodley *et al.* 2002). A medida que la biopelícula madura, se desarrolla una arquitectura compleja, con canales, poros y redistribución de bacterias en el sustrato (Etapa 4 en la Fig. 9) los organismos adheridos se replican, mueren y los componentes extracelulares de las bacterias interactúan con las moléculas orgánicas e inorgánicas presentes en el medio ambiente circundante. El potencial crecimiento está limitado por la disponibilidad de nutrientes. Otros factores que pueden controlar la maduración de la biopelícula son el pH interno, la difusión de oxígeno y fuentes de carbono y la osmolaridad (Davies *et al.* 1998). La necesidad de nutrientes o la presencia de sustancias agresivas pueden conducir al desprendimiento de células en busca de ambientes nutritivamente ricos o menos nocivos logrando así formar nuevas biopelículas en sitios distantes, por medio de tres mecanismos: erosión, separación y abrasión. Pueden liberarse células individuales revirtiendo su estado a bacterias planctónicas que se desprenden de la matriz extracelular dejando espacios entre las microcolonias que pueden actuar como canales dentro de la estructura de la biopelícula. Por lo que, el desarrollo de vida de la biopelícula se transforma en un ciclo completo (Etapa 5 en la Fig. 9) (Sauer *et al.* 2002). Estos procesos no necesariamente están

sincronizados durante todo el desarrollo de la biopelícula, generalmente ocurren de manera tal que en cualquier momento, una región de las colonias está ocupada por la biopelícula en distintos estadios del desarrollo.

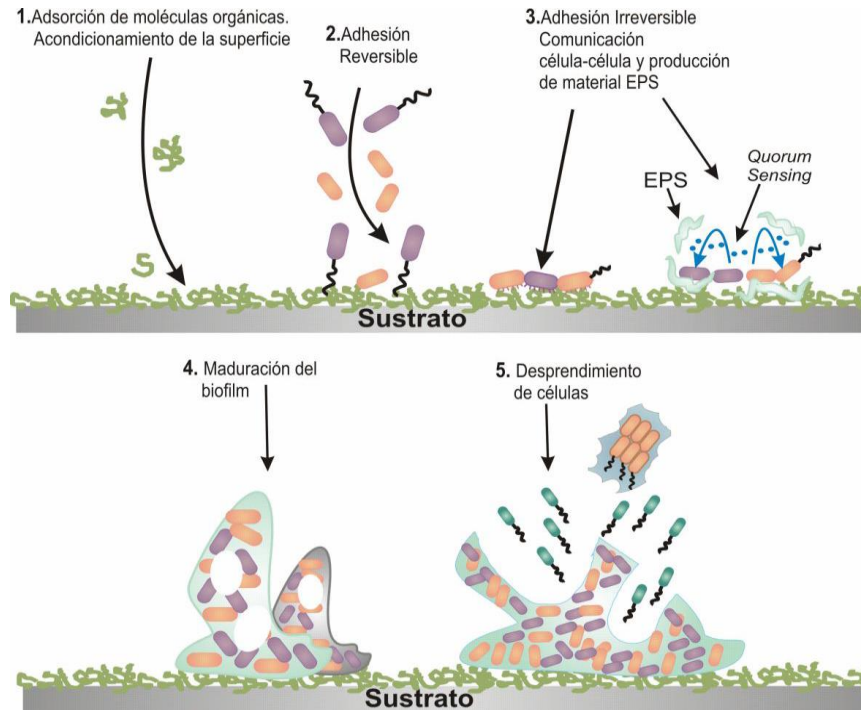


Fig. 9. Las 5 etapas en el desarrollo de una biopelícula (Fuente: Schneider *et al.* 1994)

IV.2 Comunicación célula-célula durante la formación de la biopelícula

La comunicación célula-célula ejerce también un marcado impacto sobre las distintas etapas del desarrollo de la biopelícula. En algunos casos, las interacciones sociales permiten la sincronización del comportamiento de todos los miembros del grupo y por lo tanto actuar como organismos multicelulares. Actualmente, se sabe que la comunicación intercelular no es excepcional sino que es una norma en el ecosistema bacteriano. Existen varios tipos de mecanismos de comunicación: canales de señales químicas de largo y corto alcance; comunicación en un sentido, en ambos sentidos y en múltiples sentidos y señalización mediada por el contacto (Bassler & Losick, 2006).

IV.3 Quorum sensing (QS)

El desarrollo de interacciones célula-célula se facilita por la estrecha proximidad existente entre las bacterias de la biopelícula. El proceso QS funciona debido a que cada bacteria que se une a una superficie produce una molécula señal, de manera tal que mientras más bacterias se unen, la concentración de la molécula señal alcanza un determinado valor, se dispara el mecanismo de detección de quórum, determinada por la densidad de población existente, la célula bacteriana activa genes que expresan funciones de manera cooperativa, y se favorece la adaptación de la bacteria al entorno, para finalmente activar la diferenciación en la biopelícula (Singh *et al.* 2002; Ramírez-Mata *et al.* 2014).

Su objetivo es coordinar determinados comportamientos o acciones entre microorganismos del mismo género, de acuerdo a su número. Este fue descrito por primera vez en *Vibrio fischeri*, bacteria productora de bioluminiscencia en alta densidad celular (Post *et al.* 2004).

Las bacterias poseen un receptor que puede detectar específicamente el auto-inductor (AIs) respectivo. Las principales moléculas señal o auto-inductor que son empleadas para comunicarse con las demás bacterias son: autoinductores, llamado AI-1, oligopéptidos y AI-2, y también algunas moléculas pequeñas únicas. Las AI-1 o N-acil-L-homoserina lactonas (AHLs), que predominan en bacterias Gram negativas, cuando éste se une al receptor, activa la transcripción de determinados genes, incluyendo aquellos para la síntesis del inductor. Mientras que oligopéptidos son producidas por bacterias Gram positivas. Aunque AI-2 ha sido referido como un "autoinductor universal" (Thomas & Nakaishi, 2006; Kalia *et al.* 2013).

Los primeros microorganismos en quienes se observó QS fueron especies de *Myxobacterias* y *Streptomyces*. Sin embargo, el ejemplo más conocido es la regulación de la producción de luz en *V. fischeri*, bacteria que vive como un simbiote en el calamar hawaiano productora de bioluminiscencia en alta densidad celular (Davies *et al.* 1998; (Ramírez-Mata *et al.* 2014).

El QS y el di-GMPc ambas regulan la virulencia y la formación de biopelículas, se presume que las dos vías de señalización pueden estar vinculadas y / o se cruzan. En *V. cholerae*, a medida que aumenta la densidad celular bacteriana, también lo hace la concentración de autoinductor AI-2 y CAI-1 (Kalia *et al.* 2013).

IV.4 Comunicación de corto alcance

En el extremo opuesto del QS se encuentran las señales de corto alcance que requieren el contacto directo entre las células individuales para el intercambio de información. Uno de los primeros mecanismos de comunicación contacto-dependiente celular conocidos es la conjugación mediada por los pilis sexuales (Reguera *et al.* 2005).

Las bacterias de las biopelículas poseen una expresión génica diferente respecto a sus contrapartes planctónicas. Se ha encontrado que hasta el 30% de los genes puede expresarse de manera diferente entre la misma bacteria desarrollada en condiciones planctónicas o en una biopelícula (Chole & Faddis, 2003).

En cuanto a los problemas asociados con la formación de biopelículas en el campo industrial se encuentra la biocorrosión, que es la contaminación producida por actividad microbiana sobre diferentes superficies que genera corrosión de equipos, cascos de barcos, tuberías y también a nivel de campos petroleros. En cuanto a los beneficios podemos encontrar que estas organizaciones degraden compuestos orgánicos por medio de bioremediación de aguas residuales, suelos y aguas subterráneas, además de la biolixidación (Hamilton, 1985; Eweis *et al.* 1999).

IV.5 Dispersión de biopelícula

El NO como molécula señal tiene una participación dual, ya que puede intervenir en la formación o bien en la dispersión de la biopelícula, esto dependiendo del estilo de vida de la bacteria y de la concentración fisiológica de NO acumulada en la célula. Se ha demostrado que NO estimula la formación de biopelículas mediante el control de los niveles de di-GMPc (Arruebarrena *et al.* 2012) (Fig. 10).

A. brasilense produce NO como intermediario de la ruta de desnitrificación por la actividad concertada de tres enzimas: nitrato reductasa periplásmica (codificada por el operón *nap*) y dos nitrito reductasas (NirK1 y NirK2). Se estudió la capacidad de formación de biopelícula bajo condiciones de desnitrificación en una mutante *nap::Tn5*, la cual produce solo un 5% de NO comparada con la cepa silvestre. La mutante deficiente en nitrato reductasa formó menor cantidad de biopelícula que la cepa silvestre, pero la producción se recuperó de manera parcial a los cinco días de crecimiento, lo que sugiere que el NO favorece la formación de biopelícula en el estadio inicial (Arruebarrena *et al.* 2012).

Se ha descrito recientemente un grupo de proteínas que funcionan como sensores del NO. La familia de proteínas que contienen el dominio H-NOX (acrónimo de *heme nitric*

oxide/oxygen) está compuesta por ferrohemo proteínas que unen NO. Estas proteínas no funcionan como reguladores de la transcripción de los genes implicados en la dispersión, unen al NO de manera específica y participan en cascadas de regulación sofisticadas. (Plate *et al.* 2013). H-NOX puede interactuar directamente con la enzima que sintetiza al di-GMPc llamada diguanilato ciclasa (DGC) para regular la síntesis y degradación de di-GMPc.

La respuesta de dispersión de biopelícula en *P. aeruginosa*, se correlaciona con la pérdida del pilus tipo IV, la transcripción de genes y el inicio de la transcripción de genes del flagelo.

Los estudios que utilizan microelectrodos han demostrado que la difusión de oxígeno en el núcleo de la biopelícula disminuye, al aumentar el espesor de biopelícula debido al consumo de oxígeno por las bacterias más cercanos a la interface del medio ambiente (Anderl *et al.* 2003). De hecho, esas bacterias en las capas más profundas de la biopelícula pueden requerir el metabolismo anaerobio para su supervivencia.

La respuesta de dispersión es reducida en cepas con mutaciones en los genes que codifican varios reguladores transcripcionales, como *arcA*, *crp*, y *etr* que se sabe que median las respuestas a los cambios en los niveles de oxígeno en otras bacterias (Thormann *et al.* 2005).

La identificación de reguladores transcripcionales asociados con la dispersión de biopelícula en respuesta al agotamiento del oxígeno sugiere que, los circuitos de detección de oxígeno son al menos parcialmente responsables del evento de dispersión. Se ha demostrado también el inicio de la respiración anaerobia en biopelículas de *P. aeruginosa* (Sauer *et al.* 2004).

La respiración anaeróbica puede resultar en la producción de compuestos intermediarios reactivos de nitrógeno, que en dosis elevadas pueden dañar el DNA, proteínas y lípidos. Este tipo de estrés nitrosativo puede conducir a la dispersión de biopelículas maduras de *P. aeruginosa*. En particular, el NO o las especies reactivas resultantes de NO pueden provocar eventos de dispersión.

La sobreexpresión de una proteína de dominio EAL (*YhjH* de *E. coli*) conduce a la disolución rápida de biopelículas establecidas en este organismo (Gjermansen & Tolker, 2006).

Finalmente, la dispersión de nutrientes inducida de las biopelículas de *P. aeruginosa* es dependiente de señalización de di-GMPc a través de un quimiosensor regulador llamado BdlA. La mutante en BdlA, es deficiente en la dispersión en respuesta a las señales de

escases de nutrientes. Mientras que la biopelícula de *Acinetobacter* sp GJ12 condensa durante la privación de carbono orgánico. La privación de carbono en *P. putida* disminuye el nivel de LapA, una adhesina que se utiliza para la formación de la biopelícula (Kalia et al. 2013).

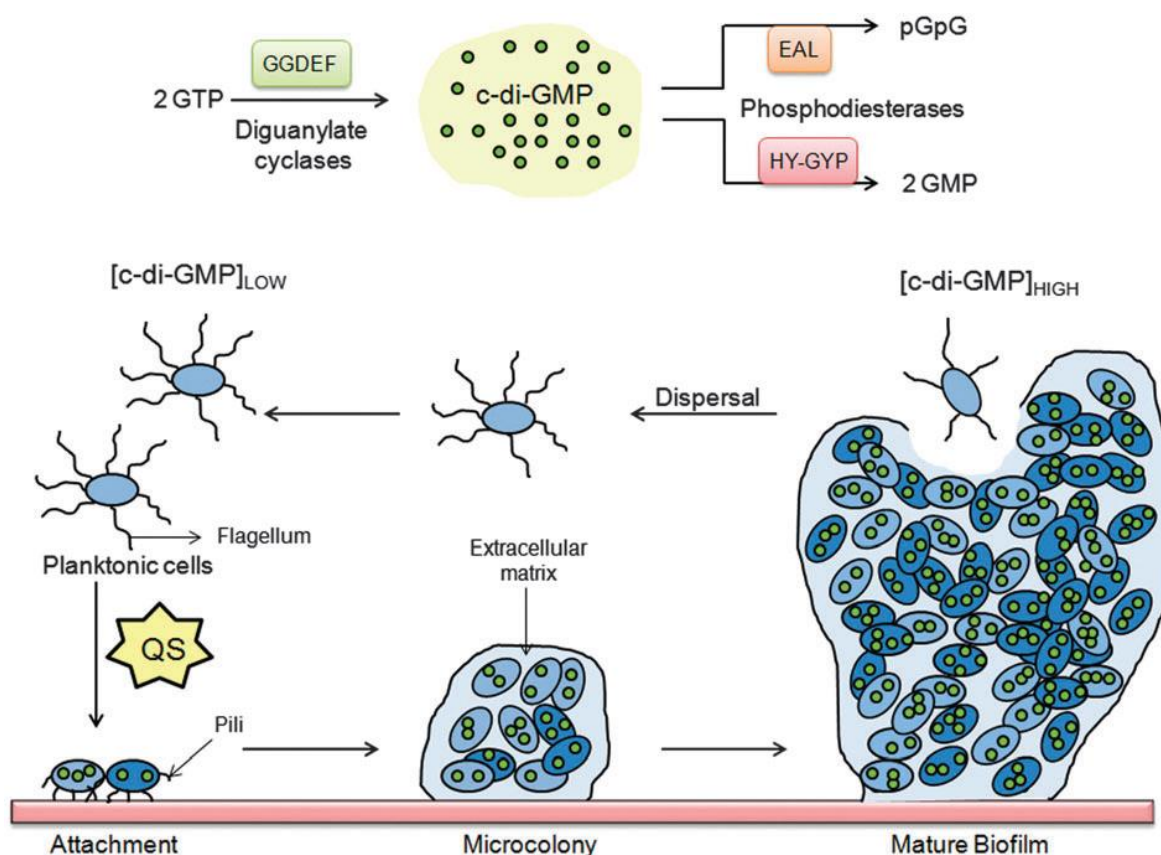


Fig. 10. El di-GMPc regula varios procesos que controlan las vías de maduración de la biopelícula (Fuente: Kalia et al. 2013).

IV.6 Arquitectura de la biopelícula

En cuanto a la arquitectura, las biopelículas pueden ser divididas en dos clases principales: (a) las que muestran una forma irregular topología que se caracteriza por estructuras en forma de hongo separadas por poros (que son canales de agua) y la baja cobertura de la superficie y (b) las que muestran una topología plana caracterizada por capas compactas en forma de hoja y una cobertura significativa de superficie.

Los principales determinantes biológicos de la arquitectura de las biopelículas son la composición del medio (en particular la fuente de carbono), presencia de sustancias tenso

activas, distintos tipos de movilidad (flagelar, contráctil, y movimiento en superficies), y los efectos de la regulación por quorum (Purevdorj & Stoodley, 2002).

Por ejemplo, *P. aeruginosa* PAO1 hace biopelículas planas y compactas en cámaras de flujo cuando se crece en citrato, benzoato, y casaminoácidos como fuentes de carbono, mientras que hace biopelículas irregulares con las estructuras típicas en forma de hongo cuando se utiliza la glucosa como una fuente de carbono (Klausen *et al.* 2003)

La movilidad contráctil del pili tipo IV es el factor más importante en la formación de las biopelículas planas en *P. aeruginosa*, ya que la mutante del pili tipo IV ($\Delta pilA$) no hace biopelículas planas (Karatan & Watnick, 2009) (Fig. 11).

El QS afecta también la arquitectura de biopelículas. Mutantes *lasI* de *P. aeruginosa*, que son deficientes en la homoserina sintasa y no producen el autoinductor 3OC12-HSL, generan biopelículas delgadas y densas, carentes de canales de agua y pequeñas colonias en forma de hongo (Davies & Marques, 2009). Otro estudio también mostró que la dependencia de la fuente de carbono puede regularse por señales de QS (Shrout *et al.* 2006).

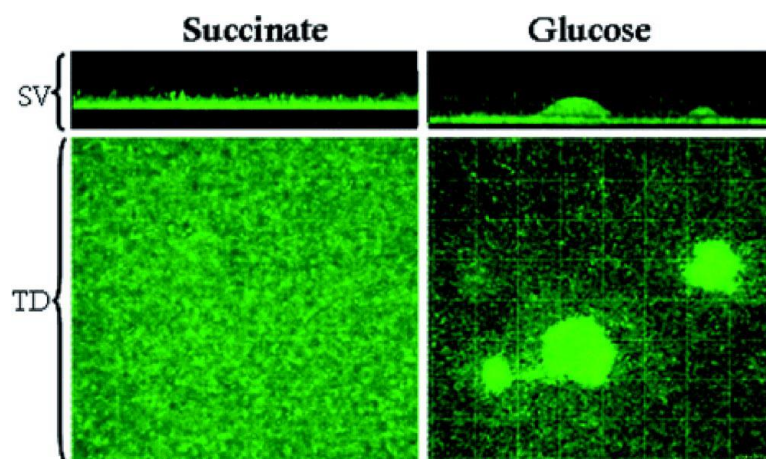


Fig. 11. Biopelículas planas y de topología irregular. Se muestran biopelículas de células etiquetadas con la proteína verde fluorescente (GFP) de *P. aeruginosa* crecida en diferentes fuentes de carbono. Las imágenes fueron adquiridas 48 h de crecimiento. Las biopelículas que crecen con succinato tienen una topología plana que se caracteriza por una alta cobertura superficial y baja altura; las cultivadas con glucosa tienen una topología irregular caracterizada por cobertura baja de la superficie y columnas dispersas de bacterias. SV, vista lateral (plano xz); TD, vista de arriba hacia abajo (plano xy), (Fuente: Karatan & Watnick, 2009).

V. Exopolisacáridos (EPS) componente principal de la Biopelícula

En la mayoría de especies bacterianas, el sello distintivo que diferencia a las biopelículas de las bacterias simplemente adheridas a una superficie es que el componente principal de la matriz de la biopelícula son polisacáridos extracelulares o exopolisacáridos (EPS),

que rodea a las bacterias residentes. El EPS microbiano consiste en polímeros biosintéticos que se componen principalmente de proteínas e hidratos de carbono (75-90%), contienen derivados tales como: lipopolisacáridos, glicoproteínas y lipoproteínas (Simões *et al.* 2010; Sheng *et al.* 2010), también ácidos nucleicos y fosfolípidos (Wingender *et al.* 1999; Ramírez-Mata *et al.* 2016).

Las funciones básicas de EPS son agregados de células bacterianas, componentes principales de la matriz extracelular implicados en la adherencia a las superficies, la formación de flóculos y biopelículas, el reconocimiento de célula a célula (Bazaka *et al.* 2011) (Joo & Otto, 2013) (Fig. 12). Además de que la producción de EPS puede aumentar su potencial individual para la colonización de diversos nichos ecológicos a menudo confieren una ventaja de supervivencia mediante la protección de la célula contra estrés abiótico y biótico, agregación a través de interacciones dipolo, covalente o un enlace iónico, interacciones estéricas, y asociación hidrófoba (Bruno & Yves, 2002), se incluyen los factores como protección contra fagocitosis e interferencia contra la respuesta inmune celular y la reducción de los efectos de los antibióticos, la retención de agua para reducir al mínimo la desecación de la célula, importantes en procesos industriales como la absorción de compuestos orgánicos exógenos, y de iones inorgánicos, actividades enzimáticas y la interacción de los polisacáridos con las enzimas (Wingender *et al.* 1999; Tian, 2008). Un estudio ha sugerido que los polisacáridos y proteínas de la superficie celular pueden actuar como adhesinas bacterianas. (Kroncke *et al.* 1990). Las especies bacterianas que no producen EPS son menos adherentes y menos patógenas (Christensen *et al.* 1982).

V.1 Composición de los EPS

La composición y la cantidad de los materiales poliméricos extracelulares que forman la matriz de la biopelícula cambiarán con el tipo de microorganismo, la edad de la biopelícula y de las circunstancias ambientales: el nivel de oxígeno y el nitrógeno, el grado de desecación, la temperatura, el pH y la disponibilidad de nutrientes (Mayer *et al.* 1999).

Los carbohidratos son el componente principal de EPS extracelulares (principalmente de hexosa, pentosa raramente) y ácidos urónicos (como glucurónico, galacturónico y ácido manurónico). La presencia de ácidos urónicos o sustitutos comunes como éster de acetato, cetales piruvato, formatos, succinato inorgánico (fosfato y sulfato) que son lo que deciden la naturaleza (neutro, aniónico o catiónico) de macromoléculas de EPS.

Los EPS son homopolisacáridos o heteropolisacáridos. Los homopolisacáridos son generalmente neutros y compuestos de tipo único de monosacárido como D- glucosa o L- fructosa (Czaczyk & Myszk, 2007; Pal & Paul, 2008; Sutherland, 2001; Vu *et al.* 2009). Los homopolisacáridos se dividen en tres grupos distintos. Los ejemplos de homopolisacáridos producidos por microorganismos son dextrano, curdlan, y celulosa. El dextrano es producido por *Leuconostoc* spp y *Streptococcus* spp (Vu *et al.* 2009; Rehm, 2010). El curdlan es un polisacárido lineal formado por residuos de β - (1,3) –ligado a residuos de glucosa producidos por *Alcaligenes faecalis* y *Agrobacterium* sp La celulosa es también un biopolímero bien conocido, formado por unidades repetitivas de D-glucosa con enlace β - (1,4). La celulosa es producida principalmente por *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*, así como *Agrobacterium*. (DaRe & Ghigo, 2006; Ude *et al.* 2006).

Los heteropolisacáridos (alginato, xantano, K30-antígeno y ácido hialurónico, entre otros) son producidos por bacterias ácidos lácticas y formados por unidades repetidas de monosacáridos (tales como D-glucosa, D-galactosa, L-fructosa L-ramnosa, ácido D- glucurónico, ácido L-gulurónico y ácido D-manurónico). (Czaczyk & Myszk, 2007). La goma de xantano, que es producida por cepas de *Xanthomonas campestris* es un heteropolímero ramificado aniónico. *Sphingomonas* spp produce gelan, el ácido hialurónico es producido por *Streptococcus* spp y *Pasteurella multocida*.

Algunas cepas de *E. coli*, derivadas de K-12, sintetizan un tercer tipo de EPS llamado ácido colánico. Éste es un polímero ramificado compuesto de L-fucosa, D-galactosa, ácido D-glucurónico, D-glucosa, O-acetil y piruvato, cuya síntesis requiere de 19 genes transportadores en el locus *wca* (Stevenson *et. al* 1996). Las mutantes en el gen *wcaF* no sintetizan el ácido colánico, se unen a superficies como capa compacta de dos células de espesor, pero son incapaces de construir biopelículas de múltiples capas. (Danese *et al.* 2000).

Uno de los EPS más estudiados es el alginato, está presente en especies de patógenos oportunistas como *P. aeruginosa* y *Azotobacter* (Flemming & Wingender, 2010). Los autores Davies y Greenberg han demostrado que en *P. aeruginosa* los genes responsables de la producción de alginatos, inician su expresión después de los 15 min del primer contacto celular con la superficie (Davies *et al.* 1998). Los pulmones se colonizan inicialmente por las formas no mucoides de esta bacteria, que luego se convierten en un fenotipo mucoide. El fenotipo mucoide es debido a la sobreproducción

de alginato (Evans & Linker, 1973). El locus *pel* (en referencia a película, una biopelícula formada en la interfase aire-medio), que contiene los genes *pelA-G*, es responsable de la síntesis del componente rico en glucosa de la matriz, mientras que el locus *psl* (polisacárido síntesis locus), que contiene los genes *pslA -O*, es responsable del componente rico de manosa y galactosa (Friedman & Kolter, 2004). Genomas de especies tan diversas como *Nitrosospira multiformis*, *Geobacter metallireducens*, *Marinobacter aqueolei*, y *Burkholderia cenocepacia* contienen ortólogos a loci *pel*, lo que sugiere que este polisacárido pueda ser ampliamente utilizado para construir matrices de biopelícula. Varios estudios han demostrado la regulación positiva de ambos genes *psl* y *pel* en condiciones donde se incrementan los niveles celulares de di-GMPc (Goodman *et al.* 2004).

Se han detectado en la matriz de EPS una cantidad sustancial de proteínas como enzimas y las proteínas estructurales, muchas de ellas implicadas en degradación. Estas enzimas extracelulares actúan sobre los sustratos solubles en agua incluyen algunos polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, mientras que los compuestos insolubles en agua incluyen celulosa, quitina y los lípidos.

Proteínas (denominadas lectinas), están involucradas en la formación de la red de matriz de polisacáridos y constituyen enlaces entre la superficie bacteriana y la superficie extracelular (Flemming & Wingender, 2010).

V.2 El di-GMPc regula la producción de EPS

Se conocen más de diez EPS regulados por di-GMPc en algún nivel, donde se encontraron diferentes DGCs que están implicadas en la regulación de expresión de genes de EPS. (Ramírez-Mata *et al.* 2016). Incluyendo: (i) la celulosa bacteriana general y poli- β (1-6) -N-acetil-D-glucosamina (PGA o PNAG en *Staphylococcus aureus*); (ii) el curdlan, xantana, mezcla-de β -glucano (MLG) y el polisacárido polar (UPP) producido por las bacterias asociadas a las plantas; (iii) en *P. aeruginosa* son tres: alginato, Psl y Pel (Hickman *et al.* 2005). (iv) otros EPS asociados con los taxones más específicos, tales como los recientemente descritos en *Vibrio* (VPS) exopolisacárido rico en glucosa y galactosa, cuya biosíntesis de las enzimas que lo producen y exportan esta codificada en dos operones: *vpsA* (*vpsA-K*) y *vpsL* (*vpsL-Q*), (Uhlinger & White, 1983; Costerton *et al.* 1987; Wolfaardt *et al.* 1998). La mayoría de estos EPS son activados por di-GMPc, siendo la xantana el único ejemplo conocido de un EPS regulado negativamente por este segundo mensajero. (He *et al.* 2007; Ramírez-Mata *et al.* 2014).

A menudo las bacterias producen más de un EPS regulado por di-GMPc. La regulación postraducciona de los diferentes EPS- di-GMPc es mediante la co-localización de las enzimas que metabolizan di-GMPc (DGC y PDE), cerca de los complejos de la biosíntesis de EPS. Por ejemplo, MucR regula la producción de alginato mediante la generación de una poza local di-GMPc en la proximidad del efector Alg44 (Hay *et al.* 2009). Otros efectores recurrentes di-GMPc implicados en la biosíntesis de EPS son proteínas DGC catalíticamente inactivas con dominios GGDEF degenerados (Römling *et al.* 2013). Los ejemplos que pertenecen a este grupo de efectores di-GMPc son PelD y PssE que son esenciales para la producción de Pel y el EPS de *Listeria*. (Whitney *et al.* 2012; Chen *et al.* 2014). Para varios de los EPS conocidos regulados por di-GMPc, la detección se vio facilitada por tinción *in vivo* con los colorantes rojo Congo y / o calcoflúor. (Pérez-Mendoza & Sanjuán, 2016).

V.3 EPS en *A. brasilense*

Los recientes resultados reportados por Nagarajan y cols. (2007) mostraron un aumento de la expresión de genes relacionados en los componentes de la superficie celular, EPS y LPS bajo una adaptación de las bacterias a ambientes salinos en *A. brasilense*. (Chowdhury *et al.* 2007).

Se mostró la producción de polisacárido de superficie por *Azospirillum* en las colonias que crecen en medios que contienen calcofluor el colorante fluorescente, que se une predominantemente a enlaces glucanos β -1,4 y β - 1,3 (Wood & Fulcher, 1978). Mutantes no fluorescentes de *A. brasilense* y *A. lipoferum* perdieron la capacidad de formar flóculos y anclarse a las raíces del trigo, lo que indica que la concentración de EPS producida por diferentes cepas de *A. brasilense* se correlaciona significativamente con la agregación celular y el anclaje firme de las células bacterianas en la superficie de la raíz. (Koul *et al.* 2015).

Se identificó una de las principales proteínas de membrana externa (OmaA) de *A. brasilense*. Se propuso que, bajo ciertas condiciones de crecimiento, las proteínas de membrana externa interactúan con EPS que conduce a la agregación y floculación en las células de *Azospirillum*, la aparición de estos agregados atrapados en el material fibrilar está en asociación con las raíces de las plantas (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). La producción de EPS, es importante ya que permite que las bacterias se adhieran firmemente a la superficie de la raíz (Pereg *et al.* 2000).

Se demostró que la composición de los EPS y fracciones del polisacárido capsular (CPS) también difiere entre las cepas analizadas de *A. brasilense*. El CPS es un tipo de polisacárido que se une a la membrana externa mediante un enlace covalente (Wisniewski-Dyé *et al.* 2013). Los CPS de *A. brasilense* Sp7, unen una lectina glicosilada de masa molecular 36 kDa con especificidad a L-fucosa y D-galactosa (Sigida *et al.* 2014). Las lectinas son proteínas de unión de azúcar que se reconocen y se unen a los carbohidratos presentes en la superficie radicular de la planta de forma específica y reversiblemente.

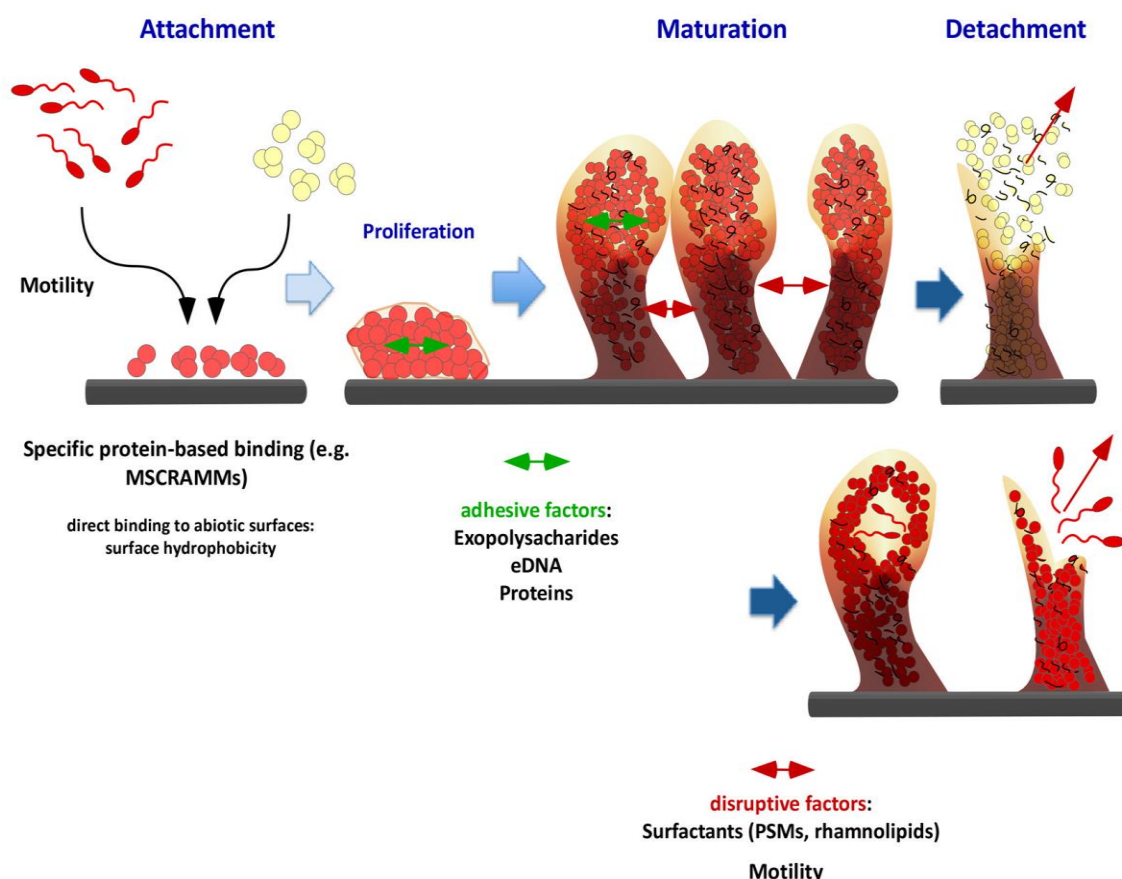


Fig. 12. Fases del desarrollo del biopelícula *in vivo*. Las biopelículas se desarrollan a través de la unión inicial, que depende del transporte de las bacterias a una superficie, que es pasivo en el caso de bacterias no móviles como estafilococos (amarillo), y activa en el caso de bacterias móviles, como *P. aeruginosa* (rojo). Está regulada por interacciones proteína-proteína específicas de superficie bacteriana con proteínas de la matriz en humanos. Las etapas posteriores no difieren en principio entre bacterias móviles y no móviles. Implican la proliferación, la incrustación en una matriz extracelular (constituida por EPS, eDNA, proteínas etc.) y la maduración. Este último depende de factores que modulan la interacción célula-célula, como sustancias tenso activas, cuya síntesis es controlada por QS, que conduce a la dispersión de biopelículas. En el caso de las bacterias móviles, la sobre regulación de la motilidad, que inicia en el centro de la biopelícula "forma de champiñón" (Fuente: Joo & Otto, 2013).

VI. Sistema de señalización en bacterias mediado por el (3'5') guanosín-monofosfato-cíclico (di-GMPc)

En 1987 Benziman descubrió al segundo mensajero di-GMPc como un modulador alostérico de la celulosa sintasa en *Gluconacetobacter xylinus* (anteriormente llamado *Acetobacter xylinum*). Aunque hace más de dos décadas de su descubrimiento, en los últimos años han empezado a surgir los detalles moleculares de la señalización de di-GMPc, así como los fenotipos asociados con el aumento de las concentraciones de di-GMPc intracelulares (Waters, 2012; Kalia *et al.* 2013). Con la secuenciación genómica, se reveló que aproximadamente el 85% de las bacterias analizadas, contienen genes que codifican para la síntesis y degradación del di-GMPc, y el creciente interés en la transición entre estilos de vida bacterianos móvil y sésil (comunidades de biopelícula). En general, cuando el di-GMPc se reduce, la formación de biopelículas es mucho menor, lo que sugiere que el di-GMPc es esencial para este proceso (Waters 2012; Pérez-Mendoza & Sanjuán, 2016; Römling *et al.* 2013) (Fig. 13).

Se conoce actualmente que el segundo mensajero di-GMPc, es un regulador central de la fisiología bacteriana y se ha relacionado con diversas respuestas fisiológicas o varios fenotipos como la producción de adhesinas tipo pilus, proteínas de membrana, síntesis de EPS, movilidad, formación de biopelículas, regula funciones asociadas a virulencia en patógenos de animales, humanos y plantas, señalización célula-célula, progresión del ciclo celular, y producción de antibióticos entre otras funciones celulares. Por lo tanto, el di-GMPc parece ser un segundo mensajero mucho más común en bacterias que su primo más famoso, AMPc (Hay *et al.* 2009; revisado en Xiqui *et al.* 2010; Kalia *et al.* 2013; Römling *et al.* 2013)

Las enzimas que controlan el recambio del di-GMPc son: la diguanilato ciclasa (DGC), sintetiza el di-GMPc a partir de dos moléculas de GTP; las cuales son caracterizadas por el sitio activo (sitio A) que incluye el residuo catalítico Asp (D) / Glu (E), flanqueados por dos residuos muy conservados, que en conjunto forman el conspicuo motivo de secuencia (G[Gly]-G[Gly]-D[Asp]- E[Glu]-F[Phe]) o (G[Gly]-G[Gly]- E[Glu]-E[Glu]-F[Phe]) que estimula la reacción 200 veces, a menudo contienen un sitio inhibitorio (I-Site) que se caracteriza por un motivo RxxD (x: cualquier aminoácido), se ubica cinco aminoácidos arriba del motivo GG (D / E) EF, la unión de di-GMPc al I-sitio de DGC inhibe de forma alostérica la síntesis de di-GMPc. Este dominio fue descrito originalmente en 1995 por Hecht y Newton para el regulador de la respuesta de PleD de *Caulobacter crescentus*,

contiene tanto un sitio A y un sitio I. El dominio consta de aproximadamente 170 residuos de aminoácidos y son nombrados así debido al patrón de secuencia de aminoácidos muy conservado (**G**[Gly]-**G**[Gly]-**D**[Asp]- **E**[Glu]-**F**[Phe]) o (**G**[Gly]-**G**[Gly]- **E**[Glu]-**E**[Glu]-**F**[Phe]) (Hecht *et al.* 1995) (Römling *et al.* 2013).

Otros residuos de aminoácidos conservados que fueron designados como esenciales para la actividad catalítica de la DGCs son los aminoácidos como R, D, N y D, que actúan en el sitio activo y sitios de unión guanilil (Ramírez-Mata *et al.* 2016).

El motivo GG (D / E) EF forma una β - horquilla, congruente con la predicción de modelado estructural. Los primeros dos residuos G de este motivo están implicados en la unión de GTP, mientras que el cuarto residuo E está implicado en la coordinación con los iones metálicos. El tercero de los aminoácidos del motivo (D / E) es indispensable para la catálisis y también juega un papel en la coordinación de metal (Römling *et al.* 2013).

Las enzimas que subsecuentemente catalizan la degradación (hidrólisis) del di-GMPc, son fosfodiesterasas (PDE) con los motivos conservados (**EAL**(**E**[Glu]-**A**[Ala]-**L**[Leu]) que produce 5'pG-p-G lineal y el cual es transformado a dos moléculas de GMP (guanosínmonofosfato) y el motivo HD-GYP (**H**[His]-**D**[Asp]-**G**[Gly]-**Y**[Tyr]-**P**[Pro]) el cual es transformado en GMP. El proceso catalítico requiere Mg^{2+} , o Mn^{2+} para la hidrólisis del enlace fosfodiéster y es inhibida la actividad por cationes como Ca^{2+} Ni^{2+} , Fe^{2+} y Zn^{2+} (Kalia *et al.* 2013; revisado en Xiqui *et al.* 2010; Römling 2013; Ramírez-Mata *et al.* 2014).

Es de destacar que el residuo E del motivo EAL está directamente implicado en la coordinación de uno de los metales, lo que explica su conservación del 100% en las enzimas activas. (Römling *et al.* 2013).

Yakunin y colaboradores han propuesto que los iones metálicos en el sitio activo de la PDE están involucrados en la activación de ácido de Lewis del centro del fosfato, así como la activación de las moléculas de agua (y la participación de la lisina vecina para generar un hidróxido catalítico), que ataca el centro del fosfato de di-GMPc para realizar la hidrólisis. (Tchigvintsev *et al.* 2010; Römling *et al.* 2013).

El dominio PDE consta de aproximadamente 250 residuos de aminoácidos y fue descrito originalmente en la proteína BvgR de *Bordetella pertussis*, denominados *vrg* (*virulence repressed genes*). Además, el dominio se descubrió independientemente como un dominio adyacente al dominio GGDEF responsable de la actividad de hidrolizar el di-GMPc en la proteína A1 (PDEA1) de *G. xylinus* (Ramírez-Mata *et al.* 2014).

En general, las DGCs aumentan niveles intracelulares de di-GMPc que se correlaciona con promover estilos de vida sésiles, agregación y la formación de biopelículas, pero reprimen el fenotipo de movilidad. Mientras que las PDEs regulan niveles bajos de di-GMPc y se correlaciona con la movilidad de la bacteria (Hay *et al.* 2009; Newell *et al.* 2011; Römling *et al.* 2013).

Se ha descrito que varias DGCs son reguladas de manera alostérica por el di-GMPc en el sitio I entre ellas se cuentan WspR de *P. aeruginosa*, PleD de *C. crescentus* y DgcA de *R. sphaeroides*. El di-GMPc se une al sitio-I de PelD, para aumentar la producción de EPS Pel y la formación de biopelículas, funcionando así como un efector regulador de la síntasa (Karatan & Watnick, 2009; Kalia *et al.* 2013).

No obstante, el análisis computacional de más 10,000 secuencias GGDEF reveló que aproximadamente la mitad de las secuencias GGDEF (potencialmente con actividad DGC) carecen de sitios de inhibición alostérica canónica (Kalia *et al.* 2013).

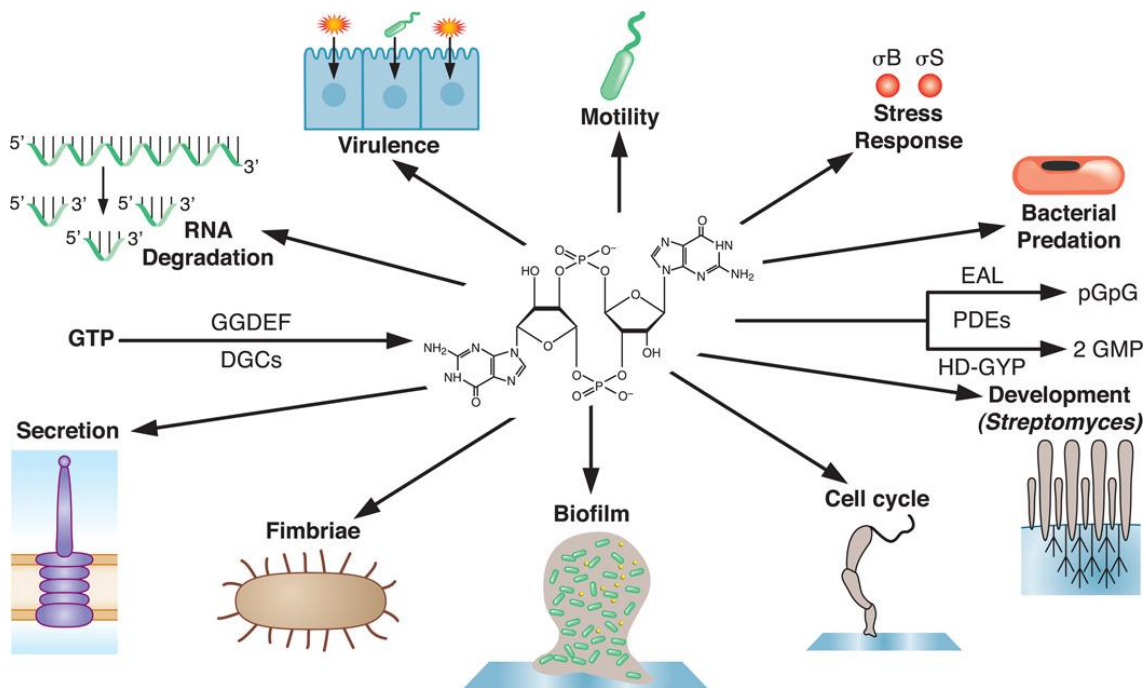


Fig.13. El di-GMPc es sintetizado por enzimas que tiene actividad de DGC, mientras que es degradado por enzimas que poseen actividad PDE. La diversidad de funciones son reguladas de manera positiva o negativa por este segundo mensajero (Fuente: Waters, 2012).

VI.1 Efectores de di-GMPc

Hasta el momento se han encontrado cinco tipos de receptores de di-GMPc: (a) proteínas efectoras, tipo proteínas con dominio PilZ que no tienen actividad enzimática, pero se unen a di-GMPc y regulan otras proteínas o enzimas a través de dominio-dominio o las interacciones proteína-proteína, (b) las proteínas degeneradas GGDEF que ya no son catalíticamente competentes; (c) las proteínas con actividad enzimática que se unen a di-GMPc, unión que estimula la actividad catalítica; (d) factores de transcripción o represores que se unen a di-GMPc para regular la expresión de genes y (e) riboswitches que se unen a di-GMPc para regular la transcripción o traducción (Kalia *et al.* 2013).

El control de las respuestas de salida a cambios en los niveles de di-GMPc también es complejo, el di-GMPc se une a múltiples moléculas efectoras para controlar la expresión génica en todos los niveles que incluyen: inicio de la transcripción, modulación postranscripcional, y a nivel postraducciona, y la regulación alostérica de la proteína (Fig. 14). Los factores de transcripción se dividen en tres grupos generales como: 1) proteínas de unión a promotor como FleQ, VpsR, 2) miembros de la FixJ, LuxR y familia CsgD como regulador transcripcional de la formación del “curli” y producción de celulosa en *E. coli* y *S. enterica* serovar Typhi como: VpsT y CpsQ. 3) el regulador transcripcional de la familia de la proteína activadora AMPc (CAP) Clp la cual regula la virulencia de *Xanthomonas campestris* y Bcam1349 que regula la formación de la biopelícula en *B. cenocepacia* (Waters, 2012; Kalia *et al.* 2013).

El di-GMPc también se une y modula la actividad de varias proteínas. El dominio PilZ fue el primer identificado utilizando análisis de bioinformática (Amikam & Galperin 2006). La proteína YcgR de *E. coli* con dominio PilZ, se une a di-GMPc, se asocia con el cuerpo flagelar (MotA y FliG), para cambiar la velocidad de rotación del flagelo e inhibir la movilidad (Waters, 2012). Otro ejemplo es la proteína Tlp1 de *A. brasilense* Sp7, proteína receptora de quimiotaxis y aerotaxis cuya unión al di-GMPc en el dominio PilZ, regula la velocidad de rotación y cambio de dirección del flagelo, disminuyendo también la trayectoria de la célula bacteriana (Russel *et al.* 2013). La proteína PilZ de *P. aeruginosa*, implicada en la biogénesis del pilus tipo IV, regula movilidad contráctil del pilus (Ryjenkov *et al.* 2006). Varias síntasas que participan en la biosíntesis de EPS son reguladas de forma alostérica por el di-GMPc como Alg44 de *P. aeruginosa* proteína responsable de la síntesis de alginato. En este caso, di-GMPc regula la producción de EPS de manera postraducciona (Hay *et al.* 2009).

El típico ejemplo es LapD de *P. fluorescens*, proteína de membrana interna, proteína híbrida desprovista de actividad catalítica, LapD es capaz de unir a di-GMPc a través del dominio EAL degenerado. FimX de *P. aeruginosa* es una proteína híbrida GGDEF-EAL, cuyo dominio EAL es degenerado pero une al di-GMPc y regula la movilidad contráctil de pilus tipo IV (Kalia *et al.* 2013).

VI.2 Riboswitches- di-GMPc

Los riboswitches son moléculas de RNA pequeños que se unen a un ligando particular y regulan la expresión de genes corriente abajo en respuesta a los niveles de este ligando (Karatan & Watnick, 2009). Actualmente se conocen dos tipos estructurales de riboswitches, tipos I y II. La unión de di-GMPc al riboswitch puede afectar a la transcripción o traducción de los genes aledaños. Regulan la expresión de los genes codificantes de la DGCs y PDEs, así como los genes de la síntesis del flagelo en *Clostridium difficile* (Bordeleau *et al.* 2011) y *V. cholerae* en donde regula virulencia (Ramesh, 2015).

VI.3 Dominios sensores de los genes que codifican a las enzimas que sintetizan el di-GMPc

Un aspecto que caracteriza a las proteínas DGCs y PDEs es su organización modular con la presencia de otros dominios de entrada, los cuales son módulos sensoriales que responden a cambios del entorno y generan una respuesta intracelular. Generalmente están localizados hacia el N-terminal (entre 50 hasta 150 aminoácidos de longitud) los cuales unen una variedad de ligandos y pueden detectar también señales citoplasmáticas, se produce un cambio conformacional que afecta la transmisión de la señal al dominio C-terminal. Así el flujo de información va del dominio sensor N-terminal, hacia el dominio transmisor o de salida en el C-terminal, reflejando un rango amplio de señales que estimulan la respuesta de la bacteria. Estos dominios sensores están ligados a los dominios GGDEF o EAL (o HD-GYP) que se encienden o se apagan según la entrada de señalización. Como resultado, los factores ambientales pueden afectar la concentración intracelular de di-GMPc (Karatan & Watnick, 2009; revisado en Xiqui *et al.* 2010; Kalia *et al.* 2013; Ramírez-Mata *et al.* 2016).

Los dominios sensores (entrada de señal), responden a diversos estímulos ambientales estos son algunos ejemplos: PAS (sensor de oxígeno, óxido nítrico (NO), a través del

grupo hemo), BLUF (sensor de luz azul) GAF-PHY (detección rojo / lejos de luz), hemeritina (detección de gas), REC (receptor fosforilación), y GAF (nucleótidos cíclicos, por ejemplo, AMPc y GMPc, e unión a fitocromo). Generalmente, estos dominios N-terminal responden a señales ambientales específicas, controlan la actividad en los dominios enzimáticos, participan como reguladores de respuesta en cascadas complejas de regulación, en las que intervienen sistemas de dos componentes y en donde algunas de las proteínas que detectan el estímulo a su vez son reguladas por moléculas tipo autoinductores y QS. (Hengge, 2009; Karatan & Watnick, 2009) (Fig. 14).

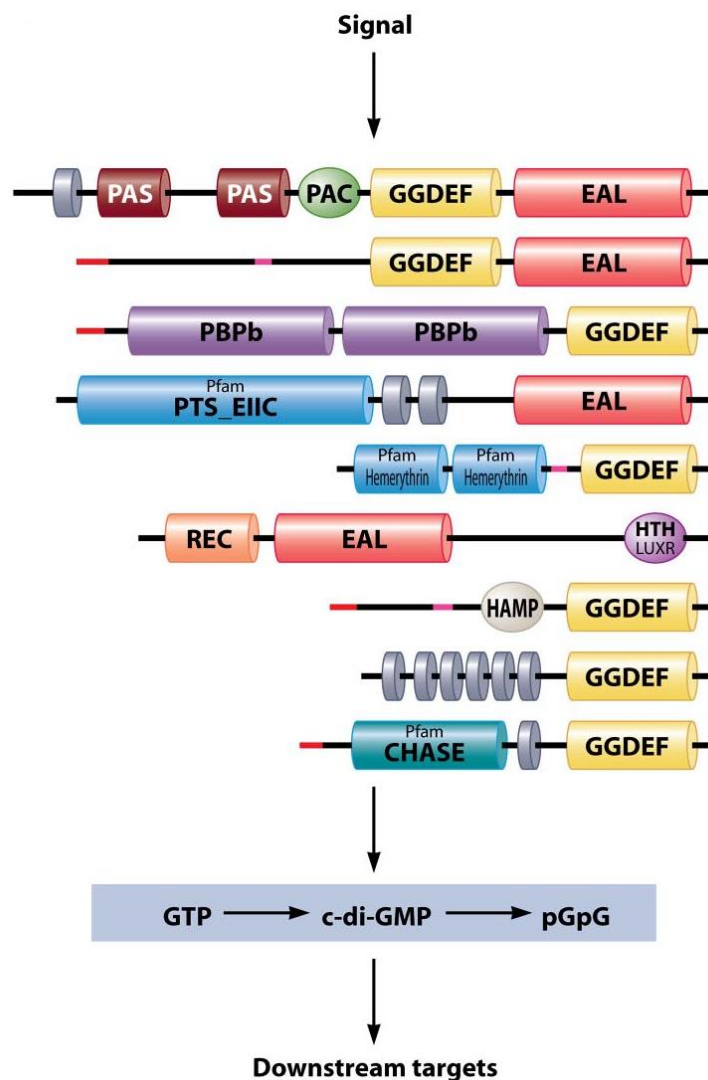


Fig. 14. Proteínas de la superfamilia GGDEF y EAL / HD-GYP son modulares y diversas. Las proteínas que pertenecen a esta superfamilia contienen una variedad de dominios sensoriales que pueden regular la actividad de los dominios enzimáticos basados en las señales de entrada (Karatan & Watnick, 2009).

A través de estos dominios de recepción de señal, estas enzimas permiten que las células se adapten a nichos específicos mediante el control de los comportamientos mediados por di-GMPc, incluyendo el cambio entre los estilos de vida móvil y sésil. En apoyo de esta hipótesis, las bacterias que comúnmente se desplazan entre diferentes ambientes tienden a codificar más DGCs y las PDEs, como *V. cholerae* y *P. aeruginosa*, mientras que aquellos que están limitados a los ambientes menos cambiantes, como los patógenos intracelulares facultativos, tienen pocas o ningún sistemas de señalización de di-GMPc (Waters, 2012; Kalia *et al.* 2013) (Fig. 15).

Las DGC y PDE pueden ser activadas por fosforilación y modulando la traducción del RNAm. Cuando los dominios de señalización interactúan con señales estimulantes, las enzimas DGCs cambian la conformación forman un dímero cerrado y se produce la catálisis, se unen dos moléculas de GTP para formar el di-GMPc (Chan *et al.* 2004). Por lo cual, la activación por la dimerización es un mecanismo que está disponible para el control de la actividad DGC. Además, este mecanismo de control puede ser mediado a través de un dominio accesorio que forma homodímeros de una manera dependiente de la señal (Paul *et al.* 2007). La característica motivo de secuencia RxxD, que tiene un papel central en la inhibición de retroalimentación y se ubica en el sitio de unión alostérico del dominio DGC (Wassmann *et al.* 2007).

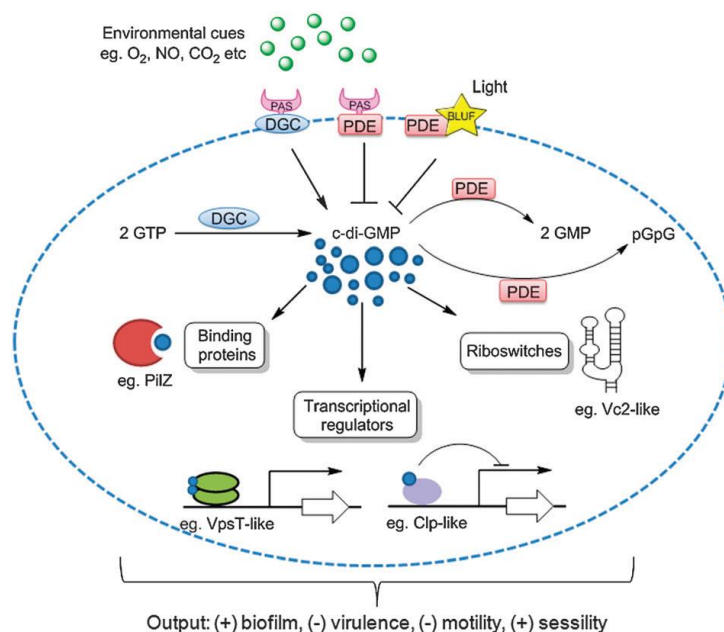


Fig. 15. Múltiples DGCs y PDEs a menudo se encuentran asociadas a dominios sensores como PAS para detectar ligandos gaseosos como O_2 , CO_2 , NO, etc., y BLUF para detectar luz. Di-GMPc se une a proteínas receptoras tales como PilZ o riboswitches o reguladores transcripcionales para regular “estilos de vida” bacterianos (Kalia *et al.* 2013).

VII. Proteínas Híbridas con Motivos: GGDEF Y EAL

Una de las características más llamativas de sistemas de señalización de di-GMPc es el gran número de copias de las proteínas con GGDEF, EAL o dominios HD-GYP, así como los receptores de proteínas (Galperin, 2005; Newell *et al.* 2011).

Esta situación aparentemente simple es muy complicada porque muchas bacterias codifican enzimas que contienen ambos dominios GGDEF y EAL. Es importante mencionar que el número de proteínas híbridas GGDEF-EAL es de aproximadamente 1/3 de todos los dominios GGDEF y 2/3 de todos los dominios EAL que se encuentran en las mismas cadenas de polipéptidos. (Waters 2012; Römling *et al.* 2013).

Al menos 32 presuntas DGCs ocurren en el genoma de *A. brailense* Sp245 y de éstas 10 son proteínas híbridas (Minjárez-Sáez 2015). En el genoma de *Acholeplasma laidlawii*, secuenciado a finales de 2007, se encontró que codifica hasta 15 proteínas GGDEF / EAL (Römling *et al.* 2013). El genoma de *B. subtilis* contiene 7 genes que codifican a proteínas híbridas GGDEF / EAL (Karatan & Watnick, 2009). Varios escenarios se presentan cuando ambos dominios GGDEF y EAL están presentes: 1) sólo uno de estos dos dominios puede ser activo o actúa como un dominio regulador que cambia la actividad del otro dominio tras la activación alostérica por GTP o di-GMPc. Por ejemplo, el dominio GGDEF PdeA de *C. crescentus* une GTP y de forma alostérica activa el dominio EAL; el dominio GGDEF en esta proteína tiene la secuencia de aminoácidos ligeramente alterada GEDEF y es incapaz de catalizar la formación de di-GMPc (Chao *et al.* 2013). Otro caso es MucR proteína híbrida DGC-PDE de *P. aeruginosa* y contiene un dominio de señalización MHYT que la ubica a nivel de membrana se demostró que la mutante $\Delta mucR$ es incapaz de producir alginato y biopelícula por tanto se comporta como una DGC (Hay *et al.* 2009). En general, proporción mayor de dominios GGDEF (2235 proteínas; 23,7%) han perdido su motivo catalítico en comparación con los dominios EAL (935 proteínas; 16,8%) (Kalia *et al.* 2013). 2). Otro escenario es que mientras que los dos dominios son enzimáticamente activos, éstos son regulados diferencialmente por señales ambientales y / o intracelulares de modo que bajo ciertas condiciones un dominio es activo y el otro no (Römling *et al.* 2013). Tal, es el caso de ScrC de *Vibrio parahaemolyticus*, en presencia de ScrA y ScrB funciona como DGC, mientras que en su ausencia presenta actividad de PDE (Ferreira *et al.* 2008). Se encontró que MorA de *P. aeruginosa* proteína con ambos dominios, estos son catalíticamente activos (Phippen *et al.* 2014). El caso de la proteína híbrida de *Shewanella woody* es único, en ella están los dominios H-NOX-GGDEF-EAL. Las proteínas que contienen los dominios H-NOX son

hemo (Fe^{2+})-proteínas que detectan NO. Esta proteína presenta ambas actividades dependiendo de las señales. Si no está presente el NO, tiene actividad DGC, si se adiciona Fe^{2+} SwDGC/ Fe^{2+} , aumenta la velocidad inicial (V_i) y k_{cat} (cuatro y dos veces, respectivamente) si se encuentra como SwDGC/ Fe^{2+} -NO disminuye la V_i de la DGC (sin ser inactiva); pero aumenta la V_i y k_{cat} de la PDE (dos y cuatro veces, respectivamente); lo que indica que la actividad es modulada por dos señales NO y la concentración intracelular de Fe^{2+} para modular el fenotipo sésil o móvil (Liu *et al.* 2012). Finalmente para explicar la multitud de enzimas (proteínas híbridas), se infiere que podría ser de utilidad para la percepción de variedad de diferentes señales ambientales, o subconjuntos de enzimas podrían relacionarse específicamente con el control de comportamientos específicos (Waters, 2012).

VIII. ANTECEDENTES DIRECTOS

En el laboratorio de la Interacción Bacteria-Planta del CICM ICUAP, donde se desarrolló esta investigación, se realizó el análisis bioinformático del genoma de *A. brasilense* Sp245, que permitió identificar 32 genes que codificaban presuntivamente DGCs (Minjárez-Sáez, 2015).

Por la relevancia que implica el conocimiento de la participación del di-GMPc en la interacción bacteria-planta, se inició con el análisis de los genes que codifican a las proteínas DGCs; en el 2013 (Gamboa- Pérez, 2014), estudio los genes *dgcD* y *dgcE*, particularmente seleccionados por el interesante contexto genético de *A. brasilense* en que se ubican los genes. Se generaron las mutantes por inserción con un casete de resistencia a la Km^R (*dgcD::Km^R*), en *A. brasilense* Sp7 y en Sp245; mientras que se insertó el casete *gusA::Km^R* en el gen *dgcE* en ambas cepas *A. brasilense* Sp7 y en Sp245.

Por lo cual se prosiguió a realizar un análisis fenotípico de las mutantes en el gene *dgcD* de las cepas *A. brasilense* Sp7 y Sp245 comparándolas con las cepas silvestres.

IX. JUSTIFICACIÓN

La inoculación con PGPR es una práctica agrícola común que ha ido en aumento en años recientes. Desde el punto de vista de una agricultura sostenible, el uso de bacterias rizosféricas constituye un medio económicamente viable y ecológicamente aceptable al reducir costos a los productores. Por lo mismo, el estudio y entendimiento de las PGPR son temas de gran importancia en muchas investigaciones a nivel mundial. Aunque desde hace 25 años en el di-GMPc se identificó su contribución como segundo mensajero, en las diversas funciones fisiológicas en las bacterias. Debido a que la organización de las señales en las que está implicado el di-GMP-cíclico es muy compleja, falta mucho por descubrir.

Los cambios en la concentración en la poza de di-GMPc, que está bajo el control de las enzimas diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa; sistemas que se encargan de la síntesis y degradación del di-GMPc respectivamente, por lo cual tiene un efecto directo en la regulación de diferentes fenotipos a nivel de la célula como: crecimiento, quimiotaxis, movilidad y formación de biopelículas. Por tanto, es de interés estudiar los genes que codifican a estas enzimas. Ya que *A. brasilense* promueve un beneficio a la planta hospedera es importante analizar su participación en el proceso de colonización.

X. HIPÓTESIS

El análisis fenotípico de las cepas mutantes en el gen *dgcD* de Sp7 y Sp45 de *A. brasilense*, se verán afectadas las funciones implicadas en la colonización a la planta.

XI. OBJETIVOS

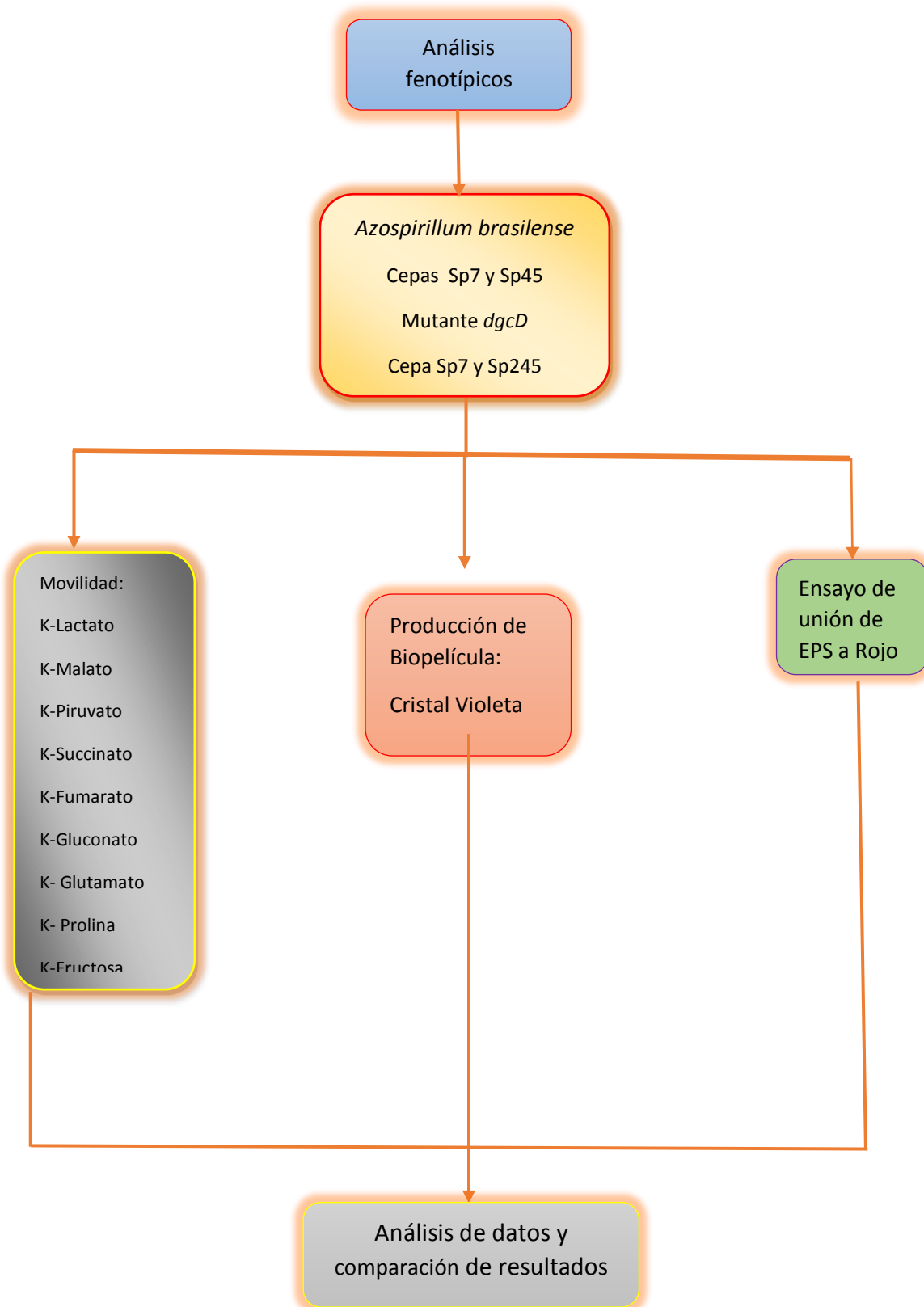
XI.1 Objetivo General

Analizar fenotípicamente las mutantes en el gen *dgcD* de *A. brasilense* Sp7 y Sp245.

XI.2 Objetivos Particulares

Determinar la movilidad, cuantificar la formación de biopelícula, cuantificar la producción de EPS, de las mutantes en el gen *dgcD* de *A. brasilense* Sp7 y Sp245.

XII. Esquema experimental



XIII. MATERIAL Y MÉTODOS

XIII.1 Material Biológico

Tabla que describe el material biológico usado en este trabajo

Cepa	Características	Referencia
<i>A. brasilense</i> Sp7	Cepa silvestre, aislada de la superficie estéril de las raíces de trigo, (Brasil)	Baldani <i>et al.</i> 1986
<i>A. brasilense</i> Sp245	Cepa silvestre aislada de la superficie estéril de las raíces de trigo, (Brasil)	Baldani <i>et al.</i> 1986
<i>A. brasilense</i> D-78	Mutante <i>dgcD</i> ::Km ^R de <i>A. brasilense</i> Sp7	Gamboa- Pérez, 2014
<i>A. brasilense</i> D-12A	Mutante <i>dgcD</i> ::Km ^R de <i>A. brasilense</i> Sp245	Gamboa- Pérez, 2014

XIII.2 Gen de interés a estudiar *dgcD*

Los estudios *in silico* del contexto genético de *A. brasilense* Sp245 y de la cepa *A. brasilense* Sp7 ambas mostraron que río arriba del gen *dgcD*, proteína con 946 a.a en (dirección 5') se encuentra un gen que codifica para una proteína con función desconocida y río abajo (dirección 3') para la cepa Sp245 un gen que codifica para una oxidoreductasa *yxnA* no caracterizada, mientras que para la cepa Sp7 una deshidrogenasa de cadena corta (Fig. 16, 17).

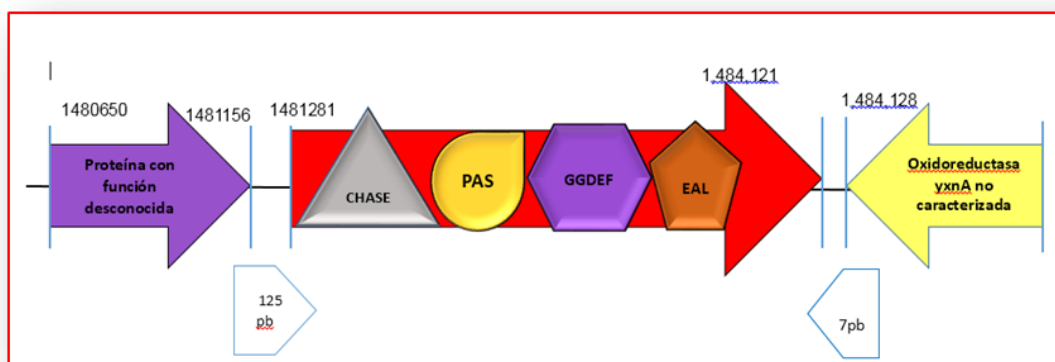


Fig. 16. Mapa físico del gen *dgC D* de *A. brasilense* Sp245, que indica ubicación y sentido de la transcripción de cada gen: Contiene 4 dominios proteicos: Un dominio **CHASE** (Cyclases/Histidine kinases Associated Sensory Extracellular), un dominio **PAS** (Per- Arnt-Sim) (Caja de sensado) y los dominios **GGDEF** (Diguanilato ciclaza) y **EAL** (Fosfodiesterasa) implicados en la regulación del di-GMPc. Se ubica en el cromosoma bacteriano en AZOBR_100210, en el locus genético CCC97824.

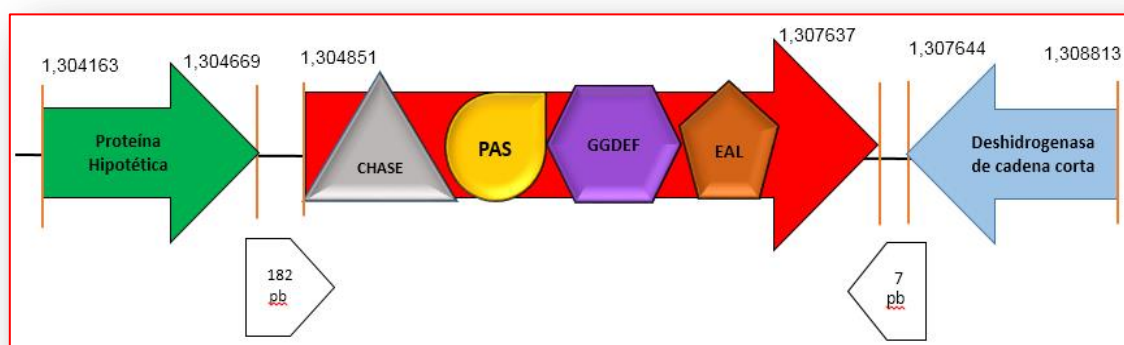


Fig. 17. Mapa físico del gen *dgC D* de *Azospirillum* Sp7, proteína de 928 a.a. de longitud. Indica ubicación y sentido de la transcripción de cada gen: Contiene 4 dominios proteicos: Un dominio **CHASE** (Cyclases/Histidine kinases Associated Sensory Extracellular), un dominio **PAS** (Per- Arnt-Sim) (Caja de sensado) y los dominios **GGDEF** (Diguanilato ciclaza) y **EAL** (Fosfodiesterasa) implicados en la regulación del di-GMPc. Se indica el contexto genético río arriba una proteína hipotética y río abajo una deshidrogenasa de cadena corta. Se ubica en el cromosoma bacteriano en AMK58_05950 en el locus genético ALJ35004.

XIII.3 Métodos

XIII.3.1 Condiciones de cultivo

Se usaron 4 cepas de *A. brasilense*. Las cepas silvestres Sp7 y Sp45. La mutante 12-A en el gen *dgC D::Km^R* de *A. brasilense* Sp245 y la mutante-78 en el gen *dgC D::Km^R* de *A. brasilense* Sp7. Se sembraron en medio mínimo K- Malato, se incubaron a 30°C, durante 18 h con agitación a 150 rpm y se realizó una identificación de morfología al

microscopio, se sembraron en medio líquido Luria-Bertani (LB) incubadas a 30°C, durante 18 h con agitación a 150 rpm. Se observaron células de forma vibroide, pleomorfas, con movilidad en espiral. También las cepas se sembraron en placas con medio rojo Congo (RC) para observar unas colonias redondas que toman un color rojo escarlata. Se obtuvieron los paquetes celulares, se lisaron para la extracción de DNA genómico y para criopreservación de las cepas en glicerol.

Para ensayos de movilidad, se utilizó Medio Difco (MD) para el precultivo y medio mínimo (Base K) al cual se le agregó el quimioatrayente (Lactato), (Malato), (Piruvato), (Succinato), (Fumarato), (Gluconato), (Glutamato), (Prolina) y (Fructosa) a una concentración de 34 mM, y el agar a una concentración de 0.25%, se incubaron a 30°C (Carreño –López *et al.* 2009).

Para los ensayos de la biopelícula y EPS se utilizó medio Luria-Bertani modificado (LB*) para el precultivo, medio NFB (Nitrogen fixation biological) con ácido málico, 13.8 mM de nitrato de potasio (KNO₃) o 13.8 mM de cloruro de amonio (NH₄Cl) como fuentes de nitrógeno, con una relación de carbono/nitrógeno de 2 (Arruebarrena –di Palma *et al.* 2013).

El antibiótico utilizado fue: Kanamicina (Km) a 50 µg/ml.

XIII.3.2 Extracción de DNA genómico (Sambrook *et al.* 1989)

A partir de un cultivo en RC, se tomó 1 o 2 colonias en un tubo con 5ml de medio MD y se incubó de 16 - 18 h 30°C, con agitación a 150 rpm. Posteriormente se tomó 1 ml y se colocó en un tubo eppendorf para centrifugar a 10000 rpm por 2 min; se decantó y se obtuvo el paquete celular y se agregó 567 µl de Buffer TE, 30 µl de SDS 20% y 3 µl de pronasa E (100 mg/ml). Se incubó 1 hora a 37°C, se agregó 100 µl de NaCl 5M y 80 µl de una solución alcalina de CTAB al 10 % (10 gr de CTAB al que se agregó 14 ml de NaCl 5M y se llevó a 100 ml con agua destilada), se incubó 10 min a 65°C y se agregó 500 µl de una mezcla cloroformo- alcohol isoamílico (24:1); se centrifugó 5 min a 12000 rpm.

Se transfirió la fase superior (conteniendo el DNA) a otro tubo y se repitió el paso anterior agregando nuevamente 500 µl de una mezcla cloroformo isoamílico (24:1); se centrifugó 5 min a 12000 rpm. Se volvió a transferir la fase superior a otro tubo, para después agregar 2 volúmenes de EtOH 100%, se incubó a –20°C durante 2 h; se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 600 µl de EtOH 70% para después centrifugar a 10000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 600 µl de EtOH 70%. Se centrifugó a

10000 rpm durante 5 min, se secó la pastilla a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µl de buffer TE con RNAsa. Se mantuvo a -20°C (Sambrook *et al.* 1989).

XIII.3.3 CONDICIONES PARA LA OBTENCIÓN DEL PRODUCTO DE PCR PARA EL GEN *dgcD*

Para la amplificación del gen *dgcD* se realizó bajo las siguientes condiciones para la mezcla DNA 2 ng, tampón 1X, MgCl₂ 1.2 mM, dNTP's 4 mM, iniciador delantero 0.5 µM, iniciador reverso 0.5 µM, buffer 2,5 µl, H₂O 13 µl *Taq*Pol 0.3 U, y DMSO 1X. Las condiciones de amplificación fueron: 95°C 10 min 1 ciclo, 95°C 30 seg, T_m 65°C 1 min, el tiempo de extensión a 71.7°C 1 min, 72°C 5 min, 30 seg, o 95°C 30 seg, 72°C 5 min, 30 seg, 72°C 10 min, 4°C infinito. Fig. 18.

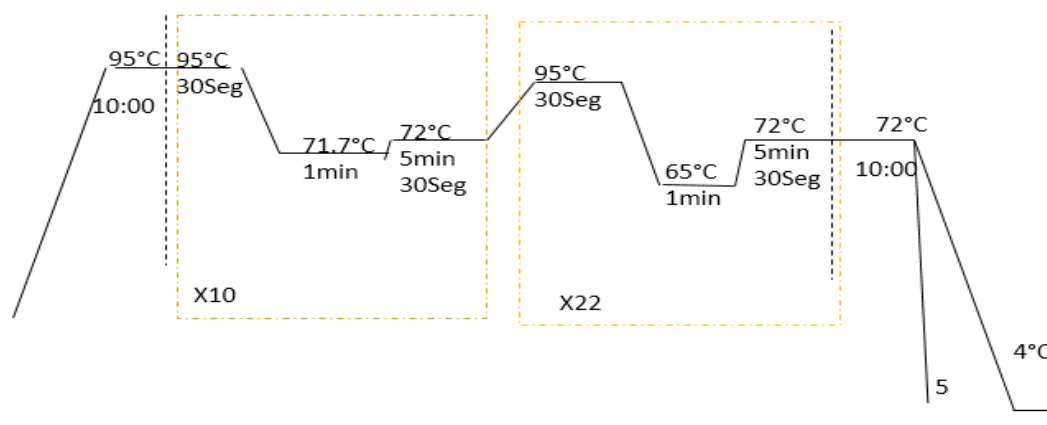


Fig. 18. Programa de PCR empleado para la obtención del amplificado del gen *dgcD*. Basado en (Gamboa-Pérez, 2014).

XIII.3.4 Ensayo de biopelícula

Se inocularon 25 ml de medio LB* contenido en matraz Erlenmeyer de 125 ml, con 1-3 colonias de *Azospirillum* crecido 3-5 días a 32 °C en medio RC. Se incubaron los erlenmeyers a 30°C y 150 rpm de 16 a 18 h. Para los cultivos de las cepas mutantes se les agregó el antibiótico. Se midió la densidad óptica (DO.) de los cultivos. Los cultivos debieron presentar una DO. ($\lambda = 600$ nm), de 1.1 a 1.4. Se transfirió 1ml a tubos eppendorf y se centrifugo a 8000 rpm por 3 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendio con Buffer de Fosfatos (BF) estéril a 66 mM para llegar a una DO de 2.0, el volumen de BF se calcula de la siguiente manera:

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

De esa suspensión de DO. 2.0, se realizó una dilución 1:100 con medio fresco NFb con la fuente de nitrógeno NH_4Cl o KNO_3 (relación C/N =2). Se sembraron los pocillos en dos placas, en una se determinó la unión de biopelícula a Cristal Violeta (CV) y en la otra placa se determinó crecimiento de biopelícula, se inocularon con 2 ml. Se agitó con vortex para homogenizar la muestra y se colocó en cada pozo. Se selló la placa de cultivo celular y se colocó en la incubadora dentro de una cámara húmeda, por 5 días a 32°C.

Transcurridos los días, se colocó a la placa 500 μL de una solución de CV al 0.5 % sobre el cultivo. Se mantuvo por 40 min. Se retiró cuidadosamente el CV, haciendo la rutina de lavado igual para cada placa de cultivo celular, de la siguiente manera: se desechó el contenido de los pozos vertiéndolo lentamente sobre un recipiente con agua; segundo se enjuago lentamente la placa en agua desmineralizada y se vació el contenido; mediante lavados se eliminó el exceso de CV, se hicieron 1 a 2 lavados.

Se dejó la placa invertida sobre papel absorbente. Finalmente se extrajo el CV adherido a la biopelícula del pozo con una solución de ácido acético al 33% con agua desmineralizada, con 2 ml para cada pozo, se realizó la correspondiente dilución para lectura con 200 μl a una placa de Elisa de 96 pozos y se midió al espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

Para la placa de determinación de crecimiento de biopelícula, previamente cultivada, se selló con papel parafilm, cubriendo pozo por pozo, se colocó la tapa, se aseguró con cinta “masking-tape” y se sonicó, previamente preparado con agua destilada y hielo, se mantuvo en frío 1 h. Se resuspendió con pipeta cada pozo, se realizó la correspondiente dilución para lectura al pasar 200 μl de cultivo a una placa de Elisa de 96 pozos y se midió al espectrofotómetro a 600 nm. Se realizaron 3 ensayos independientes con 3 pseudoreplicas por cada medio en cada ensayo.

XIII.3.5 Unidades Formadoras de Colonias (UFCs) para estandarización del ensayo de Movilidad

De una caja de RC, previamente cultivada, se tomó de 2 a 3 colonias uniformes y se inocularon en un tubo con 5 ml de MD y se incubó a 30°C, 18 h con agitación a 150 rpm. Para la cepa mutante los cultivos se les agregó el antibiótico. Transcurrido este tiempo se midió la DO. ($\lambda = 600 \text{ nm}$). Se ajustó la DO. para que ambas cepas tengan la misma y en fase exponencial, se hicieron diluciones seriadas en tubos eppendorf, colocando 100 μl de la muestra y 900 μl del medio, se agitó antes de pasar cada muestra. Cada transferencia

correspondía a una dilución de 1 en 10 hasta alcanzar la dilución 10^{-7} (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , 10^{-7}). Se sembraron 5 gotas de 10 μ l en placa de RC, para las cepas mutantes con antibiótico (se colocaron gotas para cada dilución a partir de 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , 10^{-7}). Se agitó vigorosamente antes de colocar cada gota. Las cajas de RC se dividieron en 4 zonas y se marcaron con las respectivas diluciones y la cepa. Se dejó secar el inóculo sobre la placa. Se incubó 48 h. a 32°C en condiciones estáticas en atmósfera húmeda.

Se contaron las colonias en la dilución más apropiada, colonias aisladas. Obteniendo los tubos ajustados, se tomaron 15 μ l del cultivo y se inocularon en matraces que contenían 12 ml de MD en matraces de 50 ml y se incubó a 30°C, con agitación a 150 rpm, durante 14, 16, 18 y 20 h. y se prosiguió a repetir la técnica para obtener UFC/mL ajustadas con determinada DO. en matraz.

XIII.3.6 Ensayo de Movilidad

De una caja de RC, previamente cultivada, se tomaron de 2 a 3 colonias uniformes se inocularon en un tubo con 5 ml de MD y se incubó a 30°C, 18 h con agitación a 150 rpm. Se tomaron 20 μ l, para observarlas en el microscopio, asegurándose que sean móviles.

Posteriormente se tomaron de 12 a 15 μ l del cultivo e inocularon en matraces (50 ml) que contenían 12 ml de MD, se incubaron a 30 °C, con agitación a 150 rpm, 18 horas. Para la cepa mutante los cultivos se les agregó su respectivo antibiótico. Transcurrido este tiempo se midió la DO. ($\lambda = 600$ nm), que está aproximadamente entre 1.1-1.3, el cultivo bacteriano se encuentra en fase exponencial. Esta densidad óptica fue estandarizada en MD, y se obtuvo aproximadamente, un número de UFC/mL de $2-3 \times 10^8$.

Se preparó la base-K, dependiendo del volumen a utilizar y se midió el pH a 7, se ajustó con HCl 1N. Se agregó el atrayente a evaluar, en la base-K, se midió el pH y se ajustó entre 6.8-6.9. Los medios preparados se esterilizaron a 15 Lb, a 121°C, 20 min, excepto fructosa, se esterilizó a 5 Lb por 30 min.

Cuando el medio está a 45°C se adicionaron el resto de las soluciones. Se debe verter el medio en las placas y se dejaron ligeramente abiertas con el mechero encendido 5 min, para disminuir la condensación de agua en la tapa. Se inocularon con 5 μ l para cada cepa que contiene 5×10^5 a 10^6 UFC, se cerró la placa y se incubó a 30°C con atmósfera húmeda evitando agua de condensación en la tapa. Se midieron los halos quimiotácticos a las 24 y 48 horas. Se realizaron 3 ensayos independientes.

XIII.3.7 Ensayo de EPS

Se inocularon 25 mL de medio LB* contenido en matraz Erlenmeyer de 125 ml, con 1-3 colonias de *Azospirillum* crecido 3 días a 30°C en medio RC. Se incubaron los Erlenmeyer a 30°C y 150 rpm de 16 a 18 h. Para la cepa mutante los cultivos se les agrego su respectivo antibiótico. Se midió la DO. $\lambda = 600 \text{ nm}$ de 1.1 a 1.4.

Se centrifugó a 8000 rpm por minuto 1 ml del cultivo y se resuspendio con BF a 66mM para obtener una DO. 2.0, el volumen de BF se calcula de la siguiente manera:

Vol. BF para re-suspender (ml) = DO. cultivo puro / DO. deseada

De esa suspensión que poseía una DO. 2.0, se realizó una dilución 1:100 con medio fresco NFb con la fuente de nitrógeno de NH_4Cl o KNO_3 (relación C/N =2). Se sembraron en tubos con 3 ml de medio, se agitó vigorosamente.

Se colocaron los tubos en la incubadora en condiciones estáticas, en cámara húmeda, durante 5 días a 32°C. Se tomó 1 ml del medio para determinación de proteínas por el método de Bradford. Se recolectaron las células y EPS por centrifugación a 10000 rpm por 3 minutos, se decantó el sobrenadante y se lavó el paquete celular con 1 ml de medio, se resuspendió el paquete ya lavado, en 1 ml de medio NFb (KNO_3 o NH_4Cl) y se agregó RC 40 $\mu\text{g/ml}$. Se incubó 2 h a 32 °C en agitación a 200 rpm.

Se recolectaron las células y los EPS por centrifugación a 13 000 rpm por 5 min y el sobrenadante se leyó a 490 nm. Se realizaron 3 ensayos independientes con 3 pseudoreplicas por cada medio en cada ensayo.

XIII.3.8 Determinación de proteínas totales para el Ensayo de EPS

Transcurridos los 5 días, se tomó 1 ml de las muestras a estudiar, y se centrifugo a 8,000 rpm, después se resuspendio en 50 μl de agua estéril, se agitó vigorosamente para finalmente hervir en baño María por 5 min. Se determinó por medio de la técnica de Bradford utilizando el reactivo de BioRad con albumina sérica bovina como estándar (Bradford, 1976).

XIV. RESULTADOS

XIV.1 Análisis *in silico*

XIV.1.1 Análisis de la secuencia de DgcD

Se analizó la secuencia del gen *dgcD* con 2,841 bp que codifica para una proteína de 946 aminoácidos. Se ubica en el cromosoma bacteriano en AZOBR_100210, en el locus genético CCC97824, se realizó el análisis en BLAST (Fig. 19 y 20).

MGALEGRRSGVTGSFGTAMQRSSSPDPIDLAPSGSAADSVAVPKR **LPLIALLAALLLTALA** WHDTRQRVAADA
 ESRFALRVEELHRRFENQIQVYVQVTRSAALFT **AYPEVKRTEWNR**FVDGLHLAERFPGITAVAFARVADQWT
SPELVTEARMDGLRNFRIWPESTGPVRLVTLYAAPVNERTLRTLGYDLLSEPVRRAAAEQARDSGEPAVTRAV
 ALRLDEGEASPPAFIVFQAVYRDGLSPATQERRRATFAGLVMTPIHVAPLAESVFGRMNDIAATVFEGRREFP
LYRSRPEPSEQPLLTASRDVTLGSRVWSVQYESRPSFEDAVDSWKP **TLVLATGLSLSVLLSTLLWALAAT**RDR
 ALVIARRITTS LRRE**TELDLLFNQAPLGIALIGPDAKITDCNPAFARAVGVGRDGLIGIDTKLRAQDP**AVIA
AIDAAIAGESVRLEVDRLLLAGGRHSHFSLHLQPVSTPGDPPFVMAFVEDIGDKRRAEQHIHYLAHYDPLTGL
 PNRVLLFDRIAQAARQARRDGGKVAVLFIDLDHFKVINDSLGHSFGDEVLRSVARRLHGGMRPDTDTVGRL**GGD**
EFLIVVPAIQKAAEAAVAEKVLAQLAAPFAIGGRNFVSPSIGISLFPDDAEDAEGILRCADIAMYNAKDAG
 RNAYRFVTREMGARSRERLDLEAALRRALQNRFLVYQPQLRISDDL VVGVE**EALLRWRHPEAGLIMP**NRFLP
 VAEETGLIQPIGDWVLDEVCAQIGRWRDQIGLAVPVAVNVSAQQFRDGQLPAKVAAALDRNGLQGWELEIEVT
 EGTLIDDIPSAIATLRALKQRGCLIALDDFGTGYSSLNYLHRFPIDKLKIDRSFIHDLEQDGAGDSIPRAIVG
 LGRSLGLSVVAEGVETEAQLQLLRSLKCESFQGYLFSRPVLAEE

Fig. 19. Secuencia de aminoácidos de la proteína de DgcD. Se representan con colores donde comprende cada dominio. Dominios **TMD** de 16 y 24 a. a. (letras rojas con amarillo), dominio **CHASE** de 189 a. a. (letras rojas con gris), dominio **PAS** de 64 a. a. (letras rojas con azul), dominio **GGDEF** de 173 a. a. (letras negras con amarillo), dominio **EAL** de 247 a. a. (letras negras con verde).

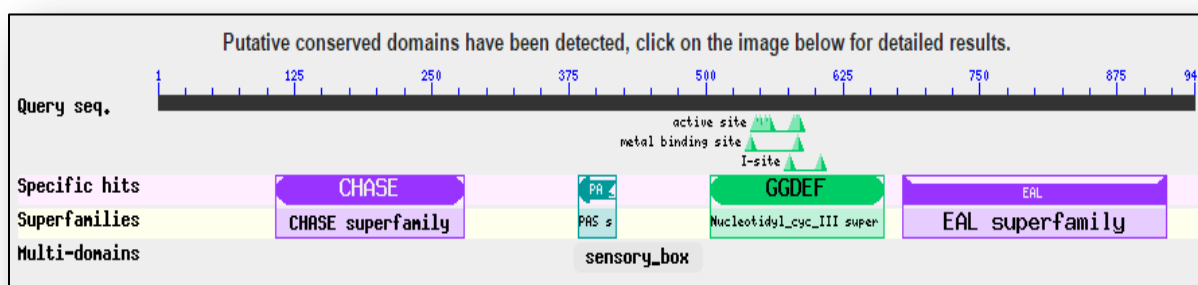


Fig. 20. Secuencia del producto de traducción de la secuencia localizada en el cromosoma bacteriano AZOBR_100210 de *A. brasilense* Sp245. Se indica los aminoácidos característicos del dominio de DGC y PDE, así como la predicción del dominio CHASE y el dominios de señalización PAS.

XIV.1.2 Análisis de los dominios de la proteína

Siguiendo con el análisis bioinformático se utilizaron diferentes programas para verificar los dominios que contiene la proteína. En las siguientes figuras se representa la secuencia de aminoácidos y dominios que posee y predice en que aminoácido empieza y termina cada dominio (Fig. 21, 22, 23 y 24).

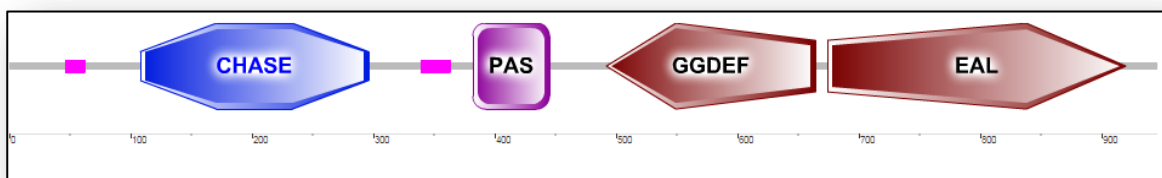


Fig. 21. Esquema de los dominios conservados que predice el análisis en Smart protein, los que ocurren en la secuencia de aminoácidos de la DgcD. Contiene 4 dominios: el dominio **CHASE** (Cyclases/Histidine kinases associated sensory extracellular), un dominio **PAS** (Per- Arnt-Sim) (Caja sensora) y los dominios **GGDEF** (Diguanylate ciclasa) y **EAL** (Fosfodiesterasa) implicados en la regulación del di-GMPc.

Name	Start ▲	End	E-value
low complexity	46	61	N/A
CHASE	108	296	3.14e-35
low complexity	339	362	N/A
PAS	382	445	0.264
GGDEF	492	664	1.8e-67
EAL	674	920	9.19e-115

Fig. 22. Tabla de los dominios conservados de la proteína DgcD que predice Smart protein, donde arroja en que aminoácido empieza y termina cada dominio.

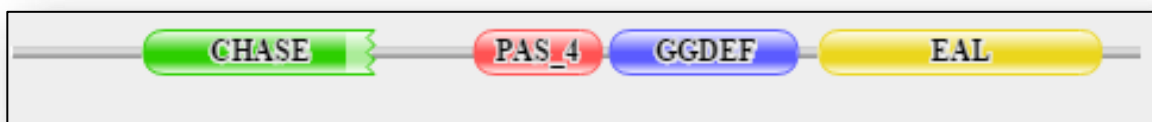


Fig. 23. Esquema de los dominios que predice el análisis en Pfam, que ocurren en la secuencia de aminoácidos de la dgcD. También predice que contiene 4 dominios: Un dominio **CHASE** (Cyclases/Histidine kinases Associated Sensory Extracellular), un dominio **PAS** (Per- Arnt-Sim) (Caja sensora) y los dominios **GGDEF** (Diguanylate ciclasa) y **EAL** (Fosfodiesterasa) implicados en la regulación del di-GMPc.

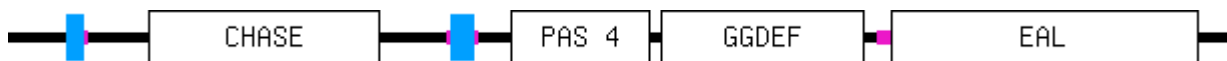
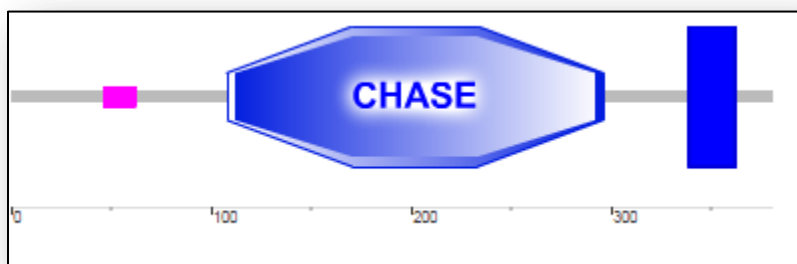


Fig 24. Esquema de los dominios conservados que predice el análisis en MiST 2.2, que ocurren en la secuencia de aminoácidos de la DgcD. También predice que contiene 4 dominios proteicos: Un dominio **CHASE** (Cyclases/Histidine kinases associated sensory extracellular), un dominio **PAS** (Per- Arnt-Sim) (Sensory box) y los dominios **GGDEF** (Diguanylate cyclase) y **EAL** (Phosphodiesterase) implicados en la regulación del di-GMPc.

Basándonos en la tabla anterior, predice que la proteína DgcD contiene dominios transmembrana (TMD) que flanquean el dominio CHASE, por lo cual se continuo el análisis de la proteína (Fig. 25).



Name	Start ▲	End	E-value
low complexity	46	61	N/A
CHASE	108	296	3.14e-35
transmembrane region	339	361	N/A

Fig. 25 Análisis de la proteína DgcD por fragmentos donde arroja dos posible dominio transmembrana y el dominio CHASE que comienza en el aminoácido 339 y termina en el aminoácido 361 (barra color azul).

XIV.1.3 Predicción de regiones TMD.

Siguiendo con el análisis *in silico*, se buscó en diferentes programas, donde se confirman las regiones TMD en la proteína DgcD.

En las figuras se muestra el resultado que vierten los diferentes programas, e indican las regiones TMD (Fig. 26, 27, 28 y 29).

Using the scale **Hphob. / Kyte & Doolittle**, the individual values for the 20 amino acids are:

Ala: 1.800	Arg: -4.500	Asn: -3.500	Asp: -3.500	Cys: 2.500	Gln: -3.500
Glu: -3.500	Gly: -0.400	His: -3.200	Ile: 4.500	Leu: 3.800	Lys: -3.900
Met: 1.900	Phe: 2.800	Pro: -1.600	Ser: -0.800	Thr: -0.700	Trp: -0.900
Tyr: -1.300	Val: 4.200	: -3.500	: -3.500	: -0.490	

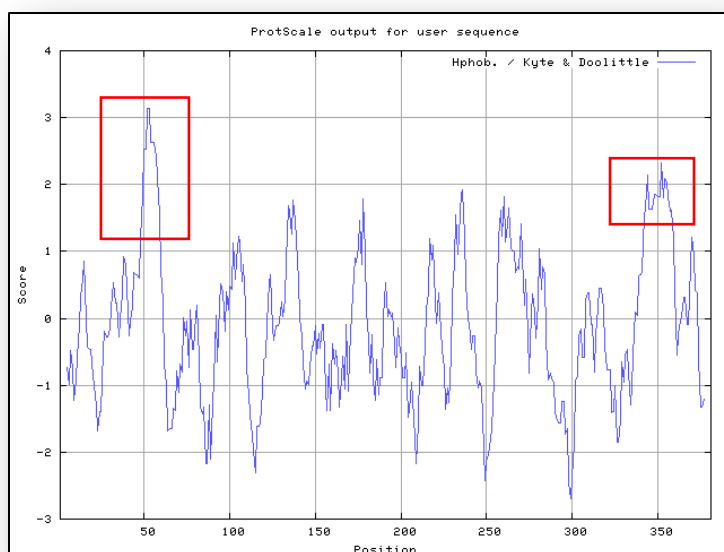


Fig. 26. Análisis de regiones transmembrana en la herramienta ExPASy ProtScale basando en la escala Kyte and Doolittle que asigna un valor a los aminoácidos, entre más positivo es más hidrofóbico. Se marcaron los a.a que son parte de los dominios TMD (cuadro negro). Se analizó fragmento de la proteína para observar con precisión los picos (cuadro rojo).

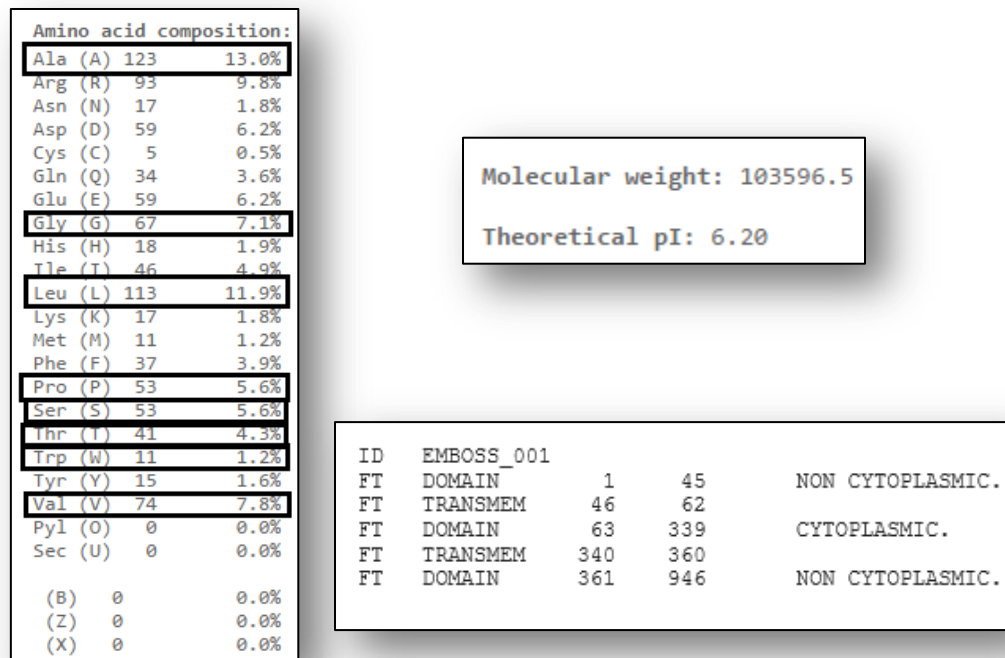


Fig. 27. Análisis de la proteína en la herramienta ProtParam, se predice el peso molecular de la proteína, el punto isoeléctrico y el porcentaje del contenido de cada aminoácido. Se marcaron los aminoácidos que contienen los dominios TMD (cuadro negro).

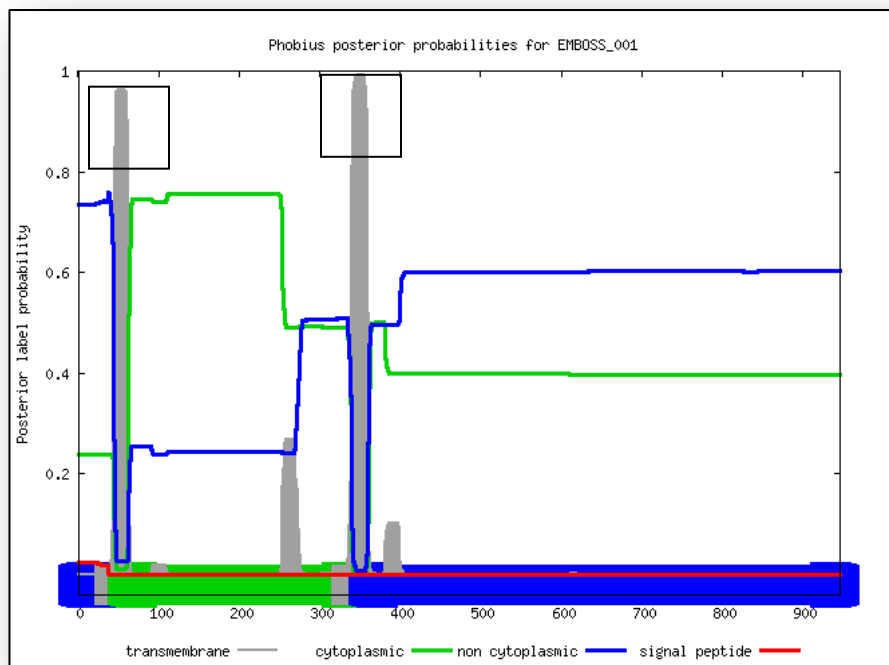


Fig. 28. Análisis de la proteína en la herramienta Phobius Prediction, predice en que región se encuentra cada dominio, se representa los picos de regiones TMD. (Color gris).

Fig. 30. Alineamiento de la proteína DgcD con proteínas de *Azospirillum* que tienen un porcentaje de similitud de aminoácidos similar a la proteína de estudio. Se marcaron los aminoácidos que son importantes para función de fosfodiesterasa incluyendo. Dominio PDE: El motivo característico EAL (rojo), sitio de unión a di-GMPc 1 (amarillo), Sitio de unión a metal 1 (verde lima), sitio de unión a metal 2 (gris bajo), sitio de unión a metal 3 (verde), sitio activo (A) (verde), loop 6 (turquesa), sitio de unión a H₂O (amarillo con rojo), sitio de unión a metal 4(rojo con verde), sitio de unión a di-GMPc 2 (azul con amarillo). Se observa que los aminoácidos en todas las proteínas están conservados (programa utilizado Clustal W).

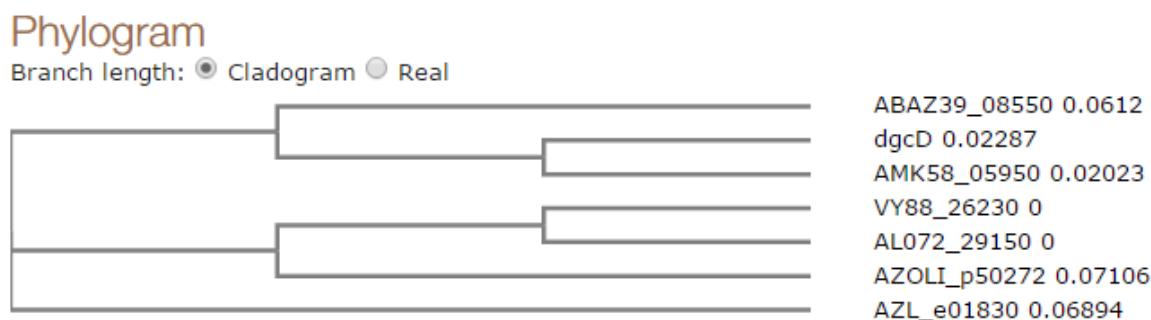


Fig. 31. Filogenia donde se muestra la proteína DgcD con otras proteínas de *Azospirillum* diferentes en especie y cepa, se puede observar que la proteína de estudio tiene un parentesco con estas especies concluyendo que hay una relación evolutiva entre este grupo.

XIV.1.4.2 Alineamientos de dominios probables DGCs incluyendo la proteína DgcD (Azobr_100210) con motivo GGDEF de PleD de *C. crescentus* CB15 y WspR de *Pseudomonas aeruginosa*

Se alinea el dominio DGC (GGDEF) de DgcD con los dominios de otras proteínas de *A. brasilense* que también poseen el dominio característico con las proteínas que se tienen los datos de los cristales y con función DGC PleD de *C. crescentus* CB15 y WspR de *P. aeruginosa*. Este análisis permite predecir si la proteína tendría función de DGC. En el resultado podemos observar que se encuentran conservados los aminoácidos importantes para la función de dominio, por lo que presuntamente la proteína funciona como DGC (Fig. 32).

```

Azobr_40216      ----RRRTQDDLFRLAYYDPVTGLANRLLLVKHM----ADFHGMGEFPTLVIVDFDRFVD
Azobr_p1170039   ----RRRTQDDLFRLAYYDPVTGLANRLLLVKHM----ADFHGMGEFPTLVIVDFDRFVD
Azobr_180308     ----VKAEDRMAWLAHFDPLTGFPNRVQFHQALERAMEIVRRSGGGLSLLLLDFDGFKE
Azobr_200121     ----RMRHERELLRLATRDRLTGLPNRALIESLLDTSIERARRHGRRFAVLCCLDSRFKL
Azobr_p410089    ----RKRAEERIRHMAHDDLTLGLPNRSLFLDRLNGALASAGRARTGVAVLYLDLDRFKA
Azobr_p440044    ----RKYQEHQIRYQASFDRLTDLPNRWLVCEERLEEAIVRAQRMRTKVAVAFLDLNRFKQ
Azobr_100210    ----KRRAEQHIHYLAHYDPLTGLPNRVLLFDRIAQAARQARRDGGKQAVLVFLDLDFHKV
Azobr_40391      ----KRAQEERIRHLAQYDFLTDLPNRFLLRDRLERAMLAADRHGTVKGLLVFLDLDRFKT
pleD             -TDYLRNNLDHSLELAVTDQLTGLHNRRYMTGQLDSLVRATLGGDPVSALLIDIDFFKK
WspR             QQQLLDTNL-VLQRLMNSDGLTGLSNRRHFDEYLELEWRRMRDQTQLSLLMIDVDFFKT
                *  : *  : * *  .  :  .  : * . . *

```

Azobr_40216	VRTSLGQSFANEILTDVATRLSVRA-----GSVLIARI	SDHAEALLIGGTQDPLAVEER
Azobr_p1170039	VRTSLGQSFANEILTDVATRLSVRA-----GSVLIARI	SDHAEALLIGGTQDPLAVEER
Azobr_180308	VNDQFGHAAGDELLAGIARRLREALSDGVLGPITAAARL	GGDEFAILVEER-DGGEVTDL
Azobr_200121	ITDTLGHAGDILLQEVASRIVVTV-----RASITVGRIGT	DDHAEVILDEVGEAKEAEVA
Azobr_p410089	VNDLLGHPAGDRLLQEMARRMLEAV-----PSHTVARLS	GGDEHAEVLH-RIAPGEALAL
Azobr_p440044	VNDTLGHHAGDILLKLVAKRLRNCT-----RVSTTVGRL	GGDEELIVAPDAVDRAAGARL
Azobr_100210	INDSLGHSFGDEVLRVARRLHGGM-----RPTITVGRRL	GGDEELIVVPAIQKAAEAAV
Azobr_40391	INDSLGHGVDRLRAVGARLLGTV-----RASITVSRQ	GGDEHILVNDLDGPDAACSV
pleD	INDTFGHDIGDEVLRREFALRLA-SN----VRAITLPCRY	GGEEFVIMPDTALA-DALRI
WspR	YNSDFGHVEGDEALRKVAATIREAS----SRPSLPAFY	GGEEFALVLPNTSPG-GARLV
	:* : .: * .. :	* . . * ::
Azobr_40216	LTTI-ASLVRSAKTASGAS--VFLSASIGVAA-SCDTHTRPEDVLRDAE	IATGRAREQGG
Azobr_p1170039	LTTI-ASLVRSAKTASGAS--VFLSASIGVAA-SCDTHTRPEDVLRDAE	IATGRAREQGG
Azobr_180308	LDRM-ARVTADPFPLGGVR--HRVSVSIGIAR-HPDHGNGVEELMRMAD	LAMYRAKEQGG
Azobr_200121	AQRI-LAAFDEPVLLMGTE--HYVRPSIGIAL-FPDHADSAQELIRSADT	ALYAAKRAGG
Azobr_p410089	ADRL-VKALGAPAEELDQGR--MVVGTSVGIAL-FPDGSSAEALLQHADT	ALYRAKSEGR
Azobr_p440044	VEKV-LYSMGEPFAVHNQE--LFCGASIGVAF-FPDDGETADQLLRNAD	LAMYHAKRNPE
Azobr_100210	AEKV-LAQLAAPFAIGGRN--FVVSPSIGISL-FPDDAEDAEGILRCADI	AMYNADAGR
Azobr_40391	ARKV-LRAMTESFPVDGHE--LQISPSIGIAL-YPDDATTIDALLKCADM	AMYAAKEAGR
pleD	AERIRMHVSGSPFTVAHGREMLNVTISIGVSATA-GEEDTPEALLKRADE	GVYQAKASGR
WspR	AEKLRMABAALKIPHIAPTEGSSLTISIGLSTMTFPQQGTDCRQVIVAAD	KGLYTAKHNGR
	:	*::: : : * . *

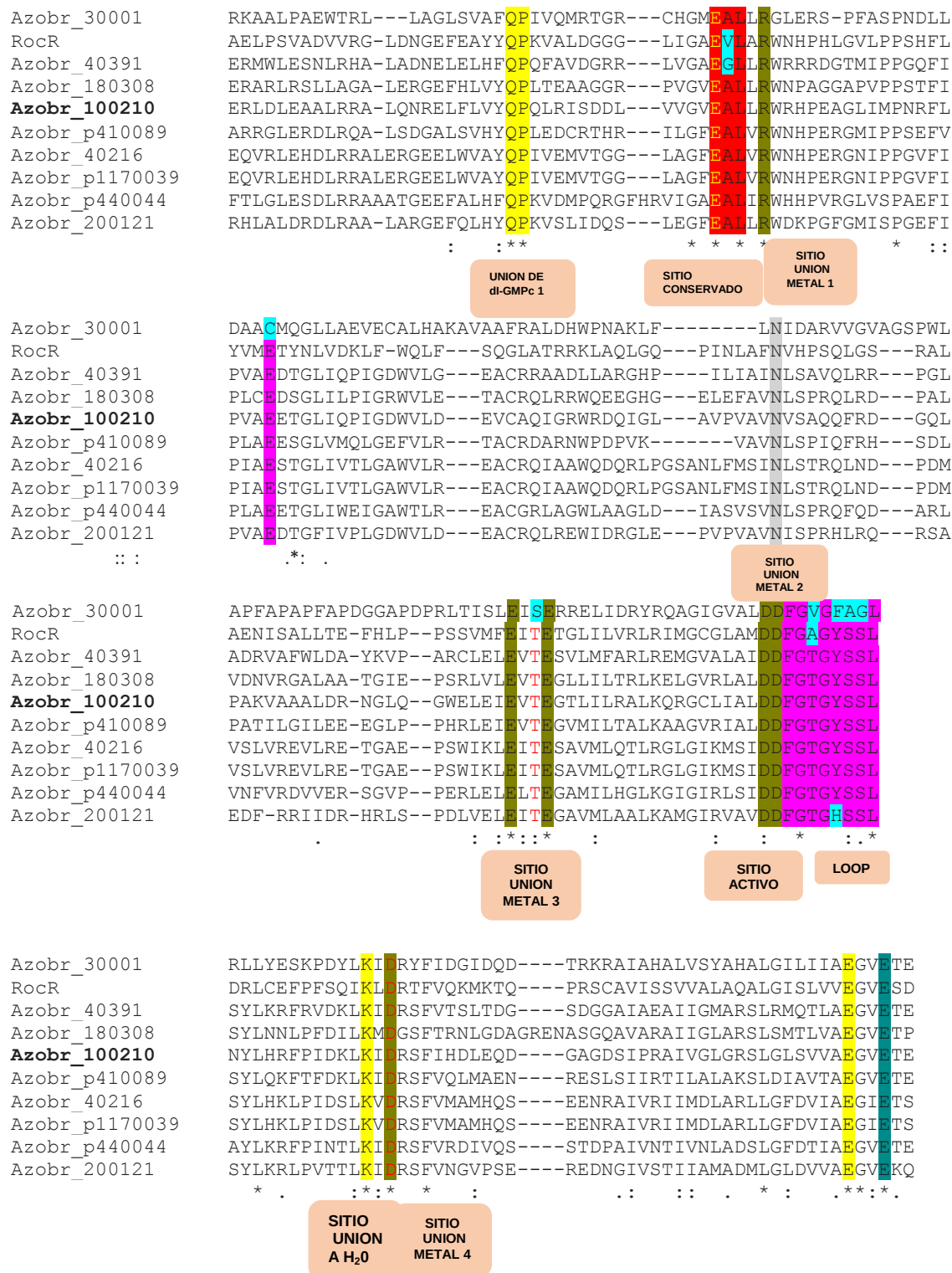
- Sitio activo A GGDEF
- Sitio no conservado o degenerado
- Sitio I
- Sitio A
- Sitio unión Guanina

Fig. 32. Alineamiento de los dominios DGCs de la proteína DgcD con otras proteínas de *A. brasilense* que también tienen este dominio proteico y con las proteínas pleD de *Caulobacter crescentus* CB15 y WspR de *Pseudomonas aeruginosa* caracterizadas con función de diguanilato ciclasa. Se observa que 6 de las 10 proteínas incluyendo la proteína de estudio DgcD tienen conservado el motivo característico GGDEF que actúa como sitio activo (A) (color rojo) ya que en las otras proteínas en 2 esta degenerado cambiando solo un aminoácido y en las otras 2 no está conservado. También se marcaron los aminoácidos que son importantes en función el dominio. Sitio Inhibitorio (I) (color verde lima), sitio A (color gris), sitio unión a guanina (color fucsia), sitios no conservados o degenerados (color turquesa). Se observa que la proteína de interés DgcD tiene conservados todos los aminoácidos (programa utilizado Clustal W).

XIV.1.4.3 Alineamientos de dominios presuntas PDEs incluyendo la proteína DgcD (Azobr_100210) con el motivo EAL y PDE RocR de *P. aeruginosa*

Se alinea el dominio de fosfodiesterasa (EAL) de DgcD con los dominios de otras proteínas de *A. brasilense* las cuales también poseen este dominio característico y primordialmente con la proteína que ya fue cristalizada y está caracterizada con función de PDE, RocR de *P. aeruginosa*. Este análisis es con el fin de predecir si la proteína

podría estar actuando como PDE, regulando la degradación del di-GMPc. Se observa que se encuentran conservados los aminoácidos importantes para la función de dominio, lo cual se predice que la proteína también tendría función de PDE (Fig. 33).



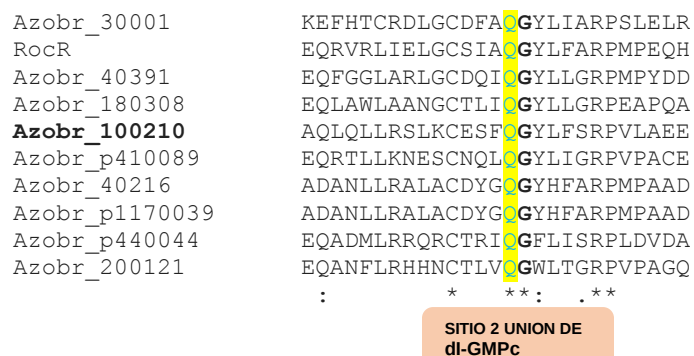


Fig. 33. Alineamiento de los dominios PDEs de la proteína DgcD con otras proteínas de *A. brasilense* que también tienen el dominio proteico y con la proteína RocR de *P. aeruginosa* caracterizada como PDE. Se observa que 8 de las 10 proteínas incluyendo la proteína de estudio DgcD presentan conservado el motivo característico EAL (color rojo) ya otras 2 proteínas cambia solo un aminoácido. También se marcaron los aminoácidos que son importantes para la actividad. Sitio de unión a di-GMPc 1 (amarillo), Sitio de unión a metal 1 (verde), sitio de unión a metal 2 (gris bajo), sitio de unión a metal 3 (verde), sitio activo (A) (verde), loop 6 (fucsia), sitio de unión a H₂O (amarillo), sitio de unión a metal 4(rojo con verde), sitio de unión a di-GMPc 2 (azul con amarillo), sitios no conservados o degenerados (turquesa). Se observa que la proteína de interés DgcD tiene conservados todos los aminoácidos (programa utilizado Clustal W).

XIV. 1.5 Modelo de la Proteína DgcD

Con todos los análisis bioinformáticos que se realizaron se ilustra un modelo de la proteína DgcD donde se indica que está anclada en la membrana citoplasmática.

El dominio CHASE se encuentra a nivel del espacio periplásmico, los dominios transmembrana se encuentran entre el dominio CHASE anclados a la membrana interna, mientras que el dominio PAS, GGDEF y EAL se localizan en el citoplasma recibiendo la transducción de señales para que se active su función (Fig. 34).

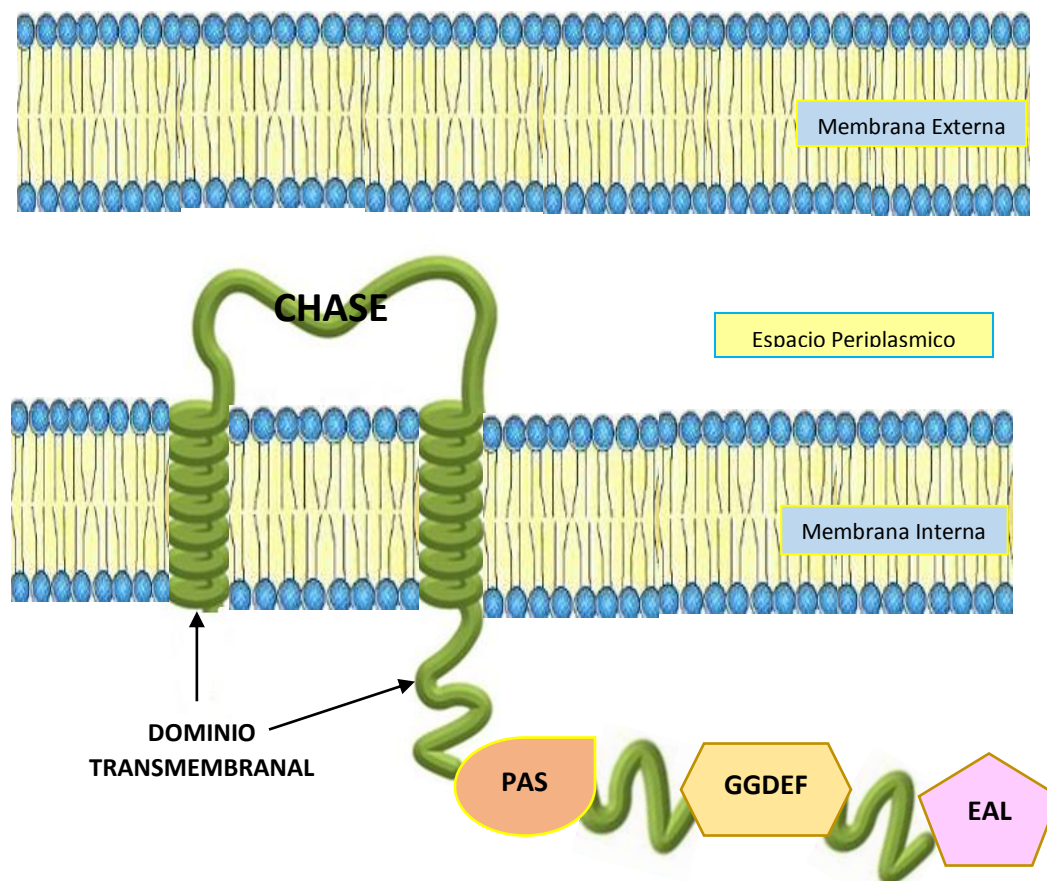


Fig. 34. Modelo propuesto para la proteína DgcD. Se observa el dominio CHASE en el periplasma, a los lados de este dominio se encuentran los TMD y los dominios PAS, GGDEF y EAL se encuentran a nivel del citoplasma.

XIV.2 Análisis de las cepas a estudiar por PCR.

Se analizaron las mutantes obtenidas por (Gamboa- Pérez, 2014), con el fin de comprobar y garantizar su pureza, así como las cepas silvestres correspondientes, por medio de un ensayo de PCR. Esperando un mayor tamaño de las cepas mutantes de 4,867 pb por aumento de la inserción del casete de Km (1.2 kb) (Fig. 35, panel A y panel B).

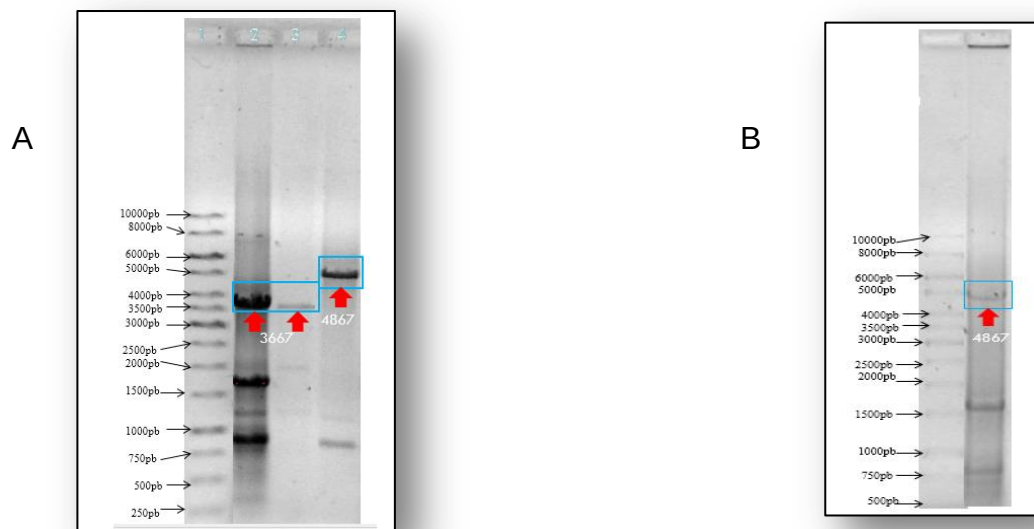


Fig. 36. Electroforetograma de PCR mutantes y cepas Sp7 y Sp245. A. Carril 1: Marcador de peso molecular, en el carril 2 se muestra el amplificado de las cepa mutante-78 en el gen *dgcD::Km^R* de *A. brasilense* Sp7 de un tamaño de 4867 pb, aumentando 1.2 kb por el casete de Km. Panel B. Marcador de peso molecular, en el carril 2 se muestra el amplificado de las cepa mutante-78 en el gen *dgcD::Km^R* de *A. brasilense* Sp245, amplificado de tamaño de 4867 pb.

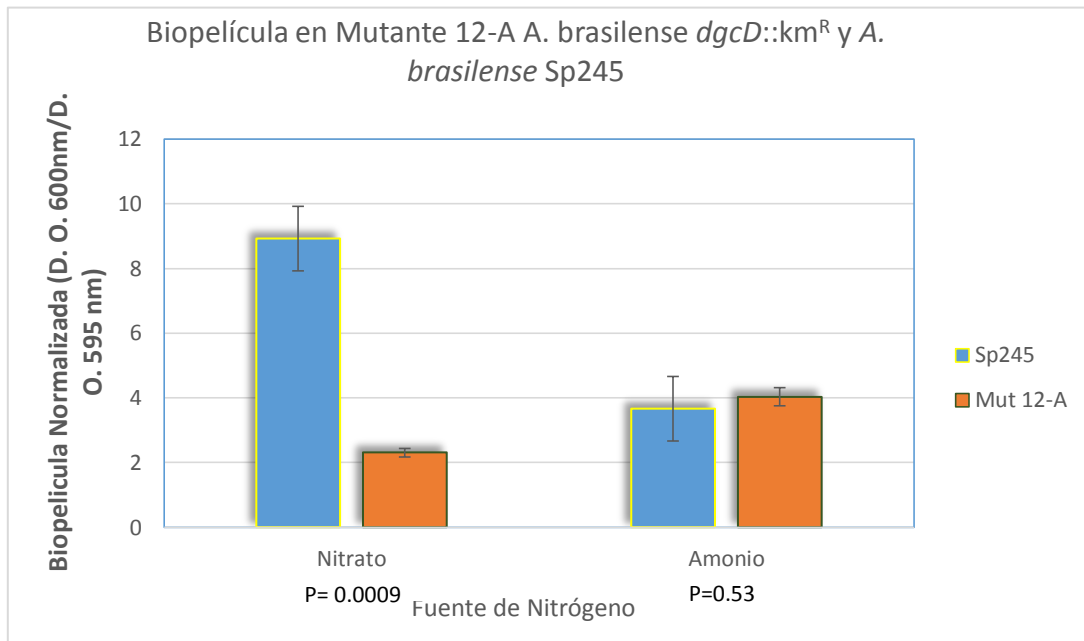
XIV.3 Análisis cuantitativo de la producción de Biopelícula

Ensayo de biopelícula en mutante 12-A *A. brasilense* *dgcD::km^R* y *A. brasilense* Sp245.

Se evaluó la formación de biopelícula en ambas cepas. Se observó una considerable disminución de la producción de biopelícula de la cepa 12-A en medio suplementado con la fuente de KNO₃ del 74%, en comparación *A. brasilense* Sp245; mientras que en medio adicionado con NH₄Cl se produce en ambas cepas menor cantidad de biopelícula en comparación con la producida por la cepa *A. brasilense* Sp245 en medio con KNO₃ (Fig. 37) (Grafica 1).



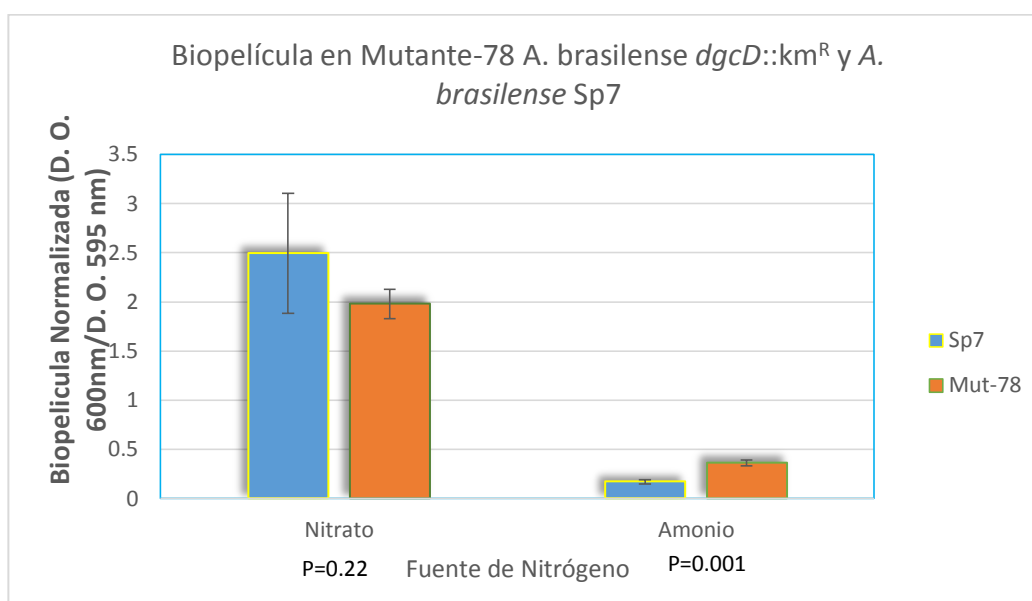
Fig. 37. Biopelícula en la cepa silvestre Sp245 teñida por el método de Cristal Violeta, el cultivo fue crecido en medio Nfb adicionado con KNO_3 como fuente de nitrógeno.



Grafica 1. Determinación de la producción de la biopelícula normalizada, por el método del CV. Cultivos crecidos en medio Nfb, adicionado con KNO_3 o NH_4Cl como fuente de nitrógeno. Cada barra representa el promedio de tres ensayos independientes, con tres replicas por ensayo, y tres repeticiones, por cada uno de los cultivos, se muestra la desviación estándar y significancia estadística.

Ensayo de biopelícula en mutante-78 *A. brasilense* *dgcD::km^R* y *A. brasilense* Sp7.

Se evaluó la capacidad de la mutante para formar biopelícula, como se indicó en métodos. Se observó una disminución pequeña de la producción de biopelícula de la cepa 78 en medio suplementado con la fuente de KNO_3 , en comparación *A. brasilense* Sp7, sin embargo no es estadísticamente significativo; mientras que en medio adicionado con NH_4Cl se produce en ambas cepas menor cantidad de biopelícula; si se comparan ambas cepas la producción de biopelícula es menor en las cepas Sp7 y 78, en ambos medios, con respecto a las cepas Sp245 y A12-A (Grafica 2).



Grafica 2. Determinación de la producción de la biopelícula normalizada, por el método del CV. Cultivos crecidos en medio Nfb, adicionado con KNO_3 o NH_4Cl como fuente de nitrógeno. Cada barra representa el promedio de tres ensayos independientes, con tres replicas por ensayo, y tres repeticiones, por cada uno de los cultivos, se muestra la desviación estándar y significancia estadística.

XIV.4 Determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFCs)

Con la finalidad de determinar el inóculo de 5.5×10^5 - 5.5×10^6 , para el estudio de movilidad y quimiotaxis, se requirió establecer el tiempo necesario de crecimiento de las cepas a estudiar. Por lo que se realizó el ensayo correspondiente. Los datos obtenidos se indican en las Tablas 1, 2, 3 y 4.

Cepa	Tiempo	D. O.	UFCs (5µl)
Wt Sp245	18 h	1.098	6.1×10^6
Mut 12-A	18 h	1.096	5.6×10^6

Tabla 1. Determinación de UFC/mL en MD inoculado de las cepas *A. brasilense* Sp245 y mut 12-A a las 18 h.

Preinoculo	Cepa	Tiempo	D. O. estandarizada	UFCs (5µl)
Tubo en MD	Wt Sp245	14 h	1.132	5.2×10^5
	Mut 12-A	14 h	1.096	5×10^5
Tiempo: 18hrs	Wt Sp245	16 h	1.234	7.6×10^6
	Mut 12-A	16 h	1.128	6.9×10^5
Wt Sp245 D. O. 1.098	Wt Sp245	18 h	1.306	1.06×10^6
	Mut 12-A	18 h	1.27	1.16×10^6
Mut 12-A D. O 1.096	Wt Sp245	20 h	1.346	3.1×10^5
	Mut 12-A	20 h	1.322	9.6×10^5

Tabla 2. Determinación de UFC/mL de *A. brasilense* Sp245 y mut 12-A en un rango de tiempo de 14- 20 h. Obteniendo el inoculo requerido para las dos cepas a las 18 h (cuadro rojo).

Cepa	Tiempo	D. O.	UFCs (5µl)
Wt Sp7	18 h	1.016	1.6x10 ⁶
Mut -78	18 h	1.12	1.46x10 ⁶

Tabla 3. Determinación de UFC/mL en medio MD, de las cepas *A. brasilense* Sp7 y mut-78 por 18 h.

Preinoculo	Cepa	Tiempo	D. O.	UFCs (5µl)
Tubo en K-M	Wt Sp7	14 h	1.038	1.31x10 ⁷
	Mut-78	14 h	0.954	1.38x10 ⁷
Tiempo: 18hrs	Wt Sp7	16 h	1.078	1.2x10 ⁷
	Mut-78	16 h	1.072	1.14x10 ⁷
Wt Sp7 D. O. 1.016	Wt Sp7	18 h	1.146	3.1x10 ⁶
	Mut-78	18 h	1.142	6.8x10 ⁶
Mut-78	Wt Sp7	20 h	1.250	1.7x10 ⁵
D. O. 1.12	Mut-78	20 h	1.244	3.9x10 ⁶

Tabla 4. Determinación de UFC/mL de *A. brasilense* Sp7 y mut-78 en un rango de tiempo de 14-20 h. Obteniendo inóculo requerido para las dos cepas a las 20 h (cuadro rojo).

XIV.5 Determinación de la movilidad

Ensayo de movilidad en la mutante 12-A *A. brasilense* *dgcD::km^R* y *A. brasilense* Sp245.

El ensayo de movilidad se determinó en medio K- malato con 9 diferentes quimioattractantes (Lactato, Malato, Piruvato, Succinato, Fumarato, Gluconato, Glutamato,

Prolina y Fructosa). Los halos de crecimiento fueron medidos a las 24 h y 48 h. Se observó discreto aumento de la cepa mutante 12-A con respecto a la silvestre Sp245 en todos los quimioattractantes los datos son estadísticamente significativos a excepción de Lactato y Glutamato (gráfica 3), (Fig. 38). A las 40 h en malato se presentó mayor movilidad en estos quimioattractantes (4.5 /6.2 cm) de la mutante con respecto a la silvestre; en Piruvato (4.4/ 7.4 cm) de la mutante con respecto a la silvestre (gráfica 4). A las 48 h se observa también un ligero aumento de la mutante 12-A con respecto a la silvestre Sp245, los datos son estadísticamente significativos a excepción de Lactato y Glutamato (gráfica 5) (Fig. 39).



Fig.38. Halo quimiotáctico en 24 h de la cepa *A. brasilense* Sp245 y mut 12-A en medio mínimo con Piruvato.

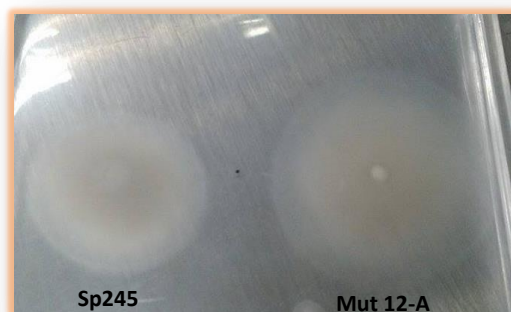
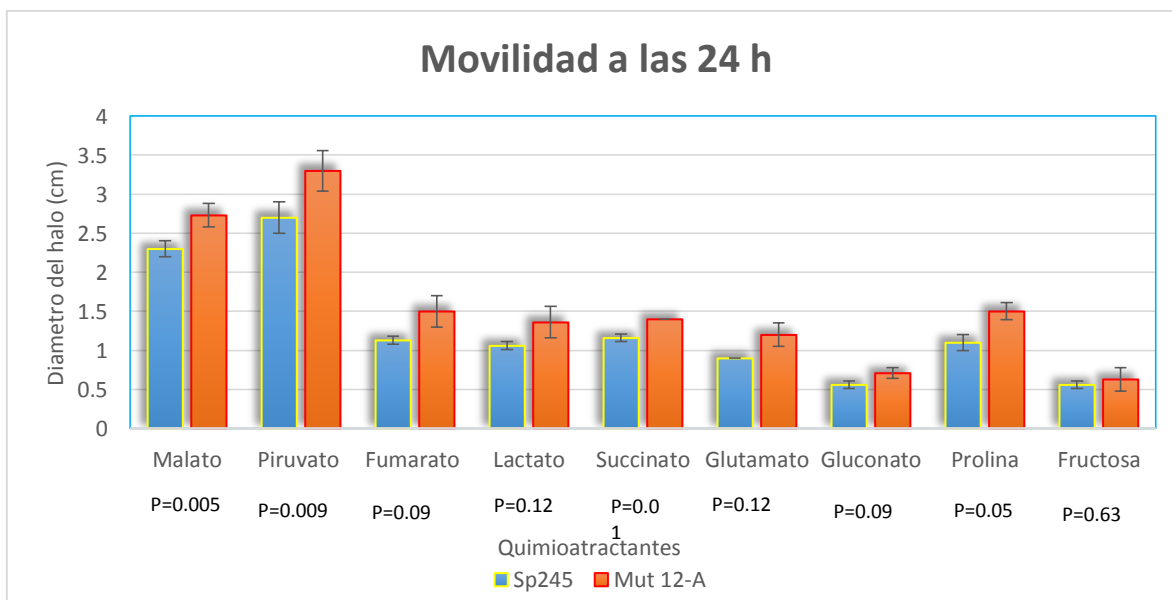


Fig. 39. Halo quimiotáctico en 48 h de la cepa *A. brasilense* Sp245 y mut 12-A en medio mínimo con Succinato.



Gráfica 3. Movilidad de las cepas: *A. brasilense* Sp245 y mut 12-A, en presencia de los quimio atrayentes: Malato, Piruvato, Fumarato, Lactato Succinato, Glutamato, Gluconato, Prolina y Fructosa. A las 24 h, cada barra representa el promedio de tres ensayos independientes con desviación estándar y significancia estadística.

Ensayo de movilidad en mutante-78 *A. brasilense* *dgcD::km^R* y *A. brasilense* Sp7.

El ensayo de movilidad se determinó en medio K- malato con 9 diferentes quimioattractantes (Lactato, Malato, Piruvato, Succinato, Fumarato, Gluconato, Glutamato, Prolina y Fructosa). Los halos de crecimiento fueron medidos a las 24 h y 48 h. La cepa silvestre Sp7 fue más móvil con respecto a la mutante-78, en todos los quimioattractantes, todos los datos son estadísticamente significativos. Se apreció movilidad a las 24 y 48 h en los quimioattractantes Malato, Piruvato, Lactato y Succinato, a excepción de fructosa (grafica 6 y 7) (Fig. 40, 41 y 42). La movilidad en Fructosa se observa hasta las 72 h y 96 h también con un ligero aumento de la mutante-78 con respecto a la silvestre Sp7 observando un halo de (1.73/0.66) y (3.5/2) los datos son estadísticamente significativos (grafica 8 y 9).



Fig. 40. Movilidad en 48 h de *A. brasilense* Sp7 y mut-78 en Piruvato.



Fig. 41. Movilidad en 48 h de Sp7 y mut-78 en Fumarato.

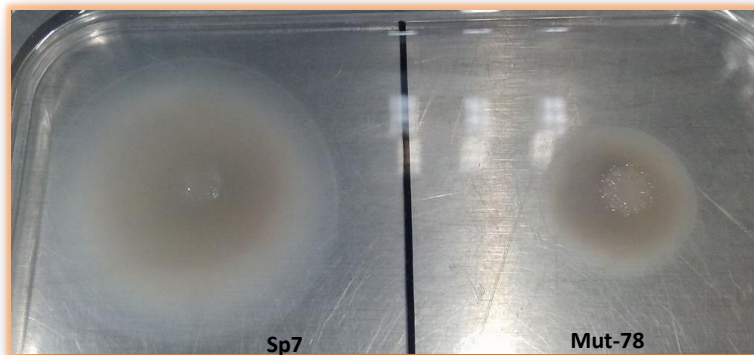
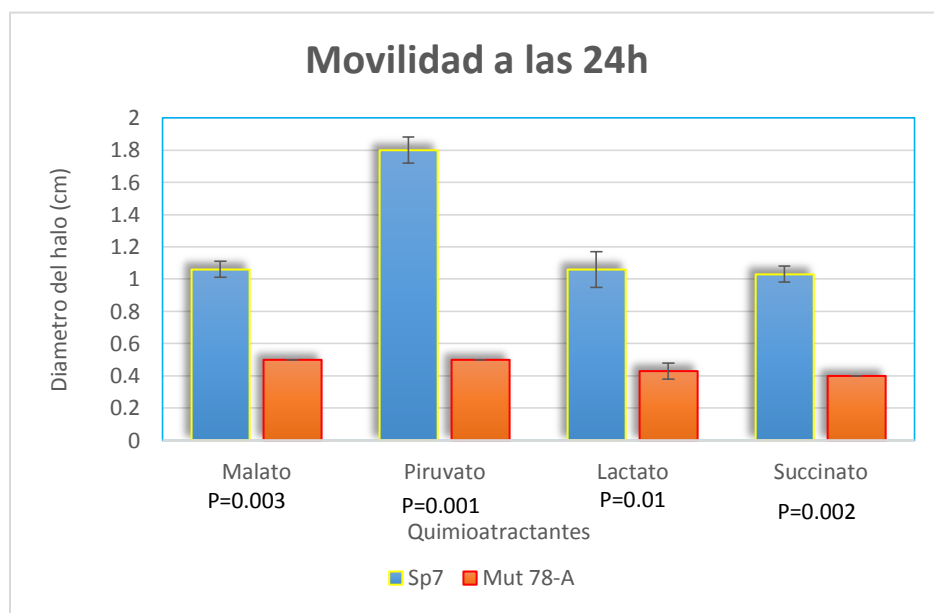
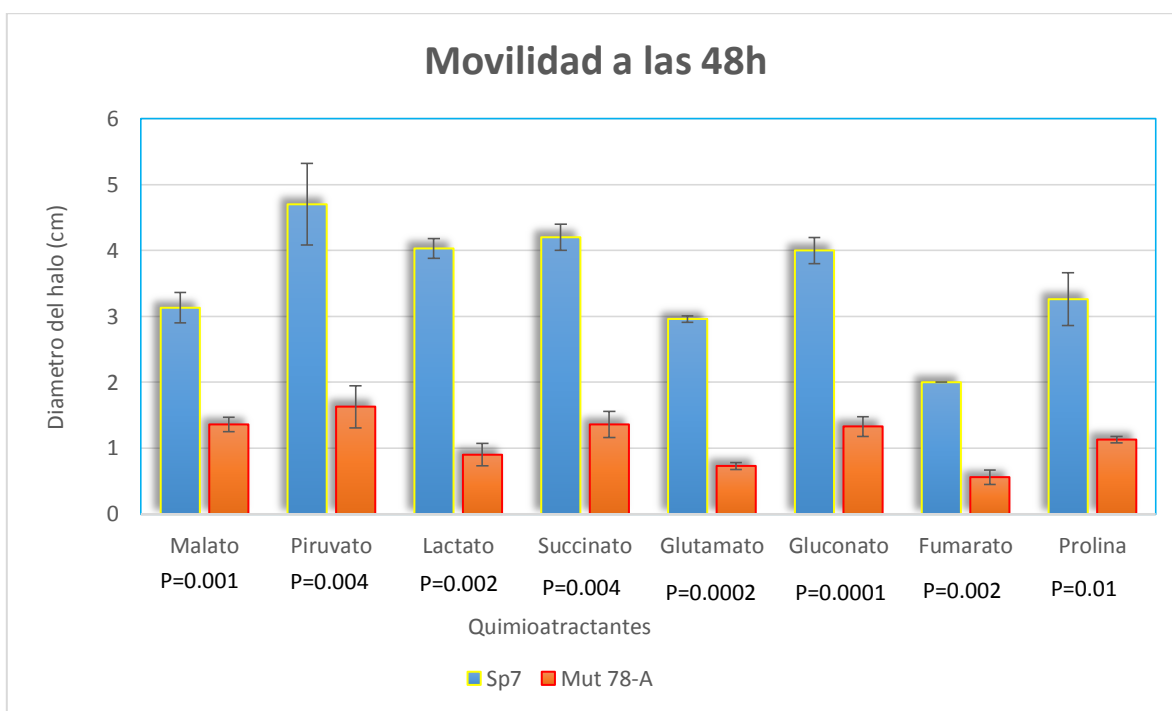


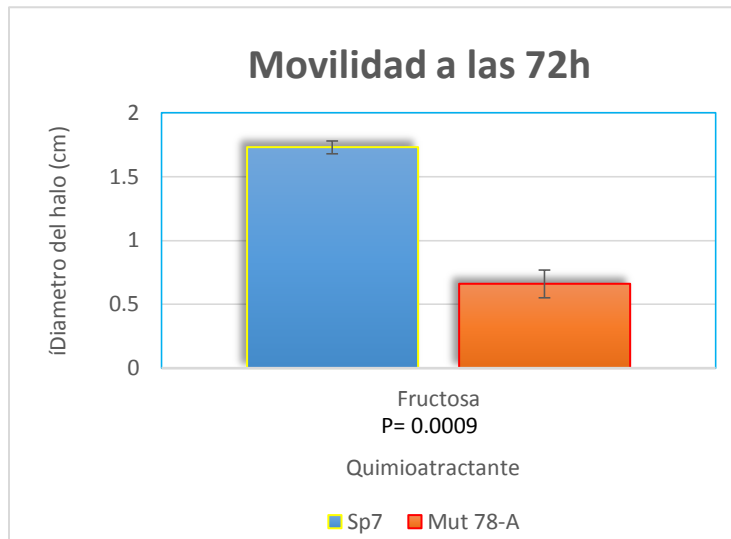
Fig. 42. Movilidad en 48 h de Sp7 y mut-78 en Succinato.



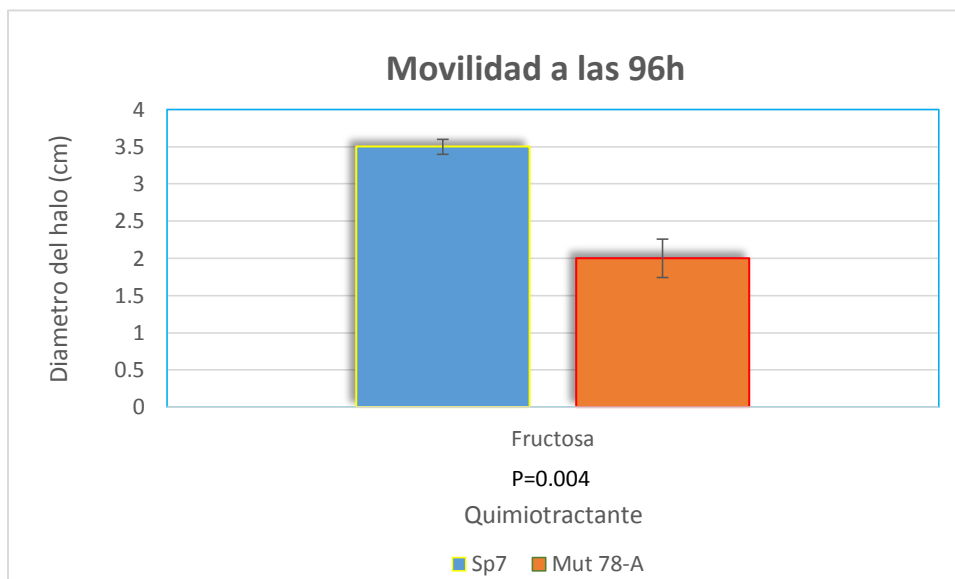
Gráfica 6. Ensayo de movilidad de: *A. brasilense* Sp7 y mut-78, con los quimio-atrayentes: Malato, Piruvato, Lactato y Succinato. A las 24 h, cada barra representa el promedio de tres ensayos independientes con desviación estándar y significancia estadística.



Gráfica 7. Ensayo de movilidad de: *A. brasilense* Sp7 y mut-78 con Malato, Piruvato, Lactato, Succinato, Glutamato, Gluconato Fumarato y Prolina. A las 48 h, cada barra representa el promedio de tres ensayos independientes con desviación estándar y significancia estadística



Gráfica 8. Ensayo de movilidad de: *A. brasilense* Sp7 y mut-78, con el quimioatrayente: Fructosa a las 72 h, cada barra representa el promedio de tres ensayos independientes con desviación estándar y significancia estadística.

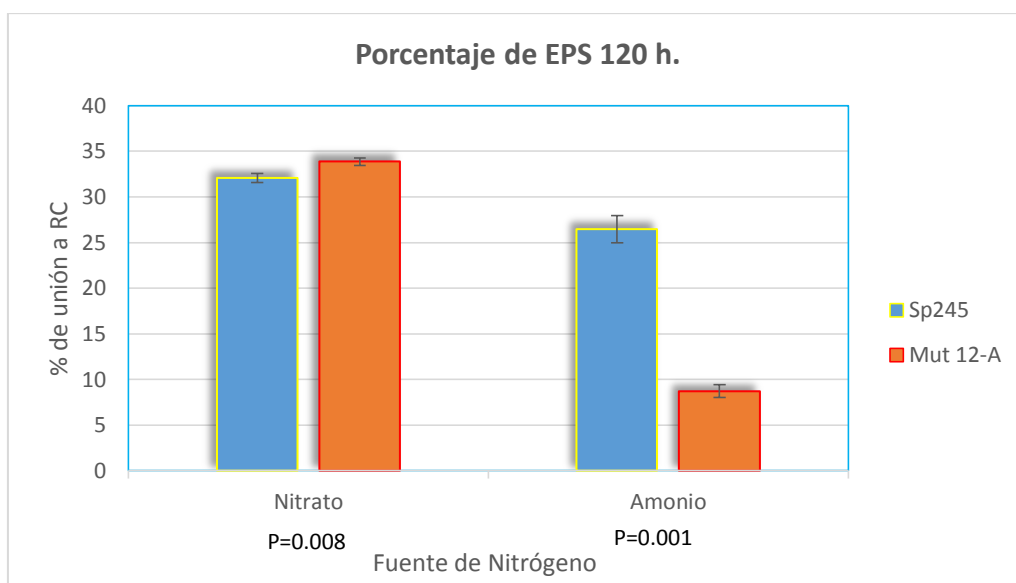


Gráfica 9. Ensayo de movilidad de: *A. brasilense* Sp7 y mut-78, con el quimioatrayente: Fructosa a las 96h, cada barra representa el promedio de tres ensayos independientes con desviación estándar y significancia estadística.

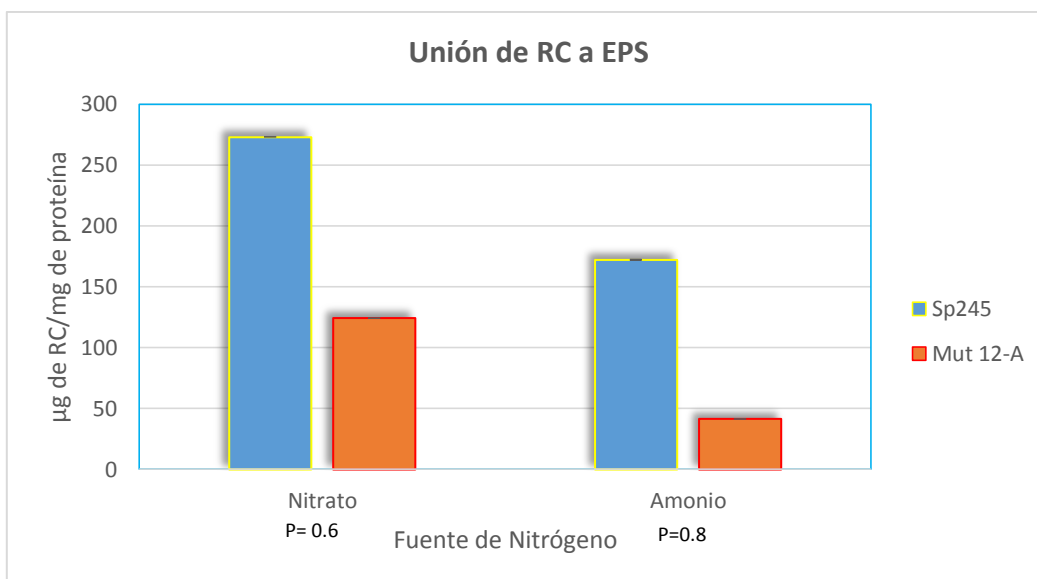
XIV.6 Determinación de producción de EPS

Ensayo de EPS en mutante 12-A *A. brasilense* *dgcD::km^R* y *A. brasilense* Sp245. Una de las características de una biopelícula es la presencia de EPS en la matriz, por tal motivo se procedió a cuantificar como se indicó en métodos. Se observó que en el medio con KNO_3 se produce en ambas cepas mayor cantidad de EPS, mientras que en medio adicionado con NH_4Cl se observa una considerable disminución de la producción de EPS de la cepa mutante 12-A en comparación con la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245 (gráfica 10).

Además también se cuantifico la unión del colorante RC a EPS normalizado con la cuantificación de proteína (mg). Se observó una disminución de la cantidad de EPS de la cepa mutante 12-A en comparación con *A. brasilense* Sp245 para ambos medios con KNO_3 y NH_4Cl (gráfica 11).



Gráfica 10. Porcentaje de cuantificación de EPS en las cepas: *A. brasilense* Sp245 y mut 12-A, en presencia de las fuentes de nitrógeno: KNO_3 y NH_4Cl a las 120 h, cada barra representa el promedio de tres ensayos independientes con tres replicas por ensayo y tres repeticiones por cada uno de los cultivos con desviación estándar y significancia estadística.

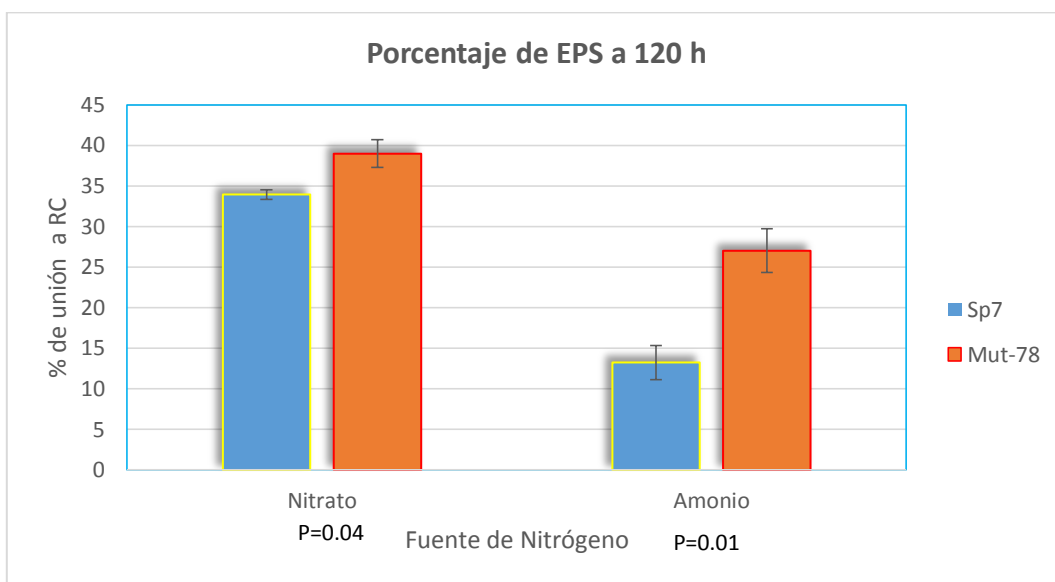


Gráfica 11. Porcentaje de cuantificación de EPS unidos a Rojo Congo, normalizado con la cuantificación de proteínas en las cepas: *A. brasilense* Sp245 y mut 12-A, en presencia de las fuentes de nitrógeno: Nitrato de Potasio (KNO_3) y Cloruro de Amonio (NH_4Cl) a las 120 h, cada barra representa el promedio de tres ensayos independientes con tres replicas por ensayo y tres repeticiones por cada uno de los cultivos con desviación estándar y significancia estadística.

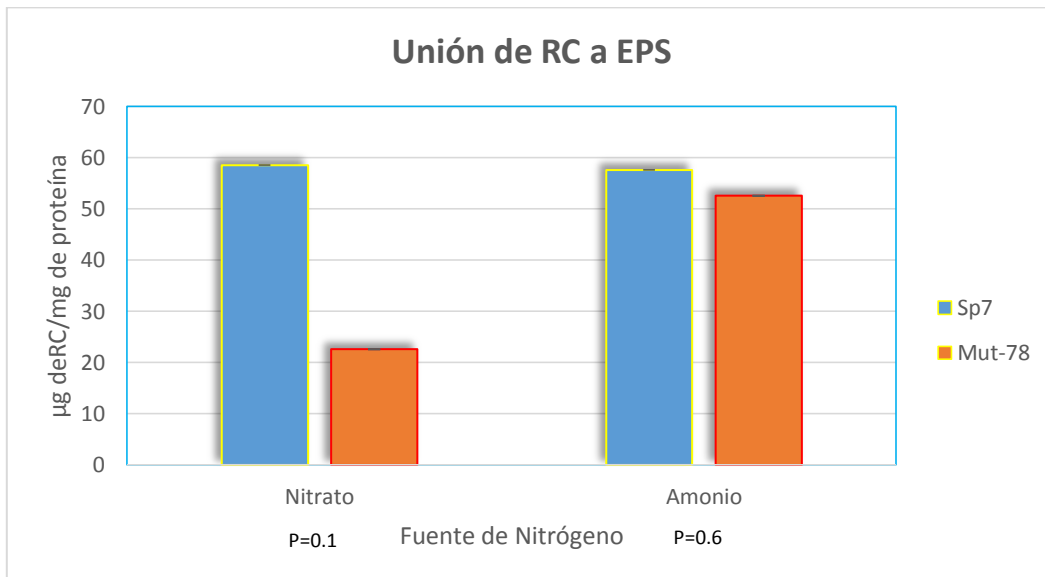
Ensayo de EPS en mutante-78 *A. brasilense* *dgcD::kmR* y *A. brasilense* Sp7.

Una de las características de una biopelícula es la presencia de EPS en la matriz, por tal motivo se procedió a cuantificar como se indicó en métodos. Se observó que en el medio con KNO_3 se produce en ambas cepas mayor cantidad de EPS, mientras que en medio adicionado con NH_4Cl se observa una considerable disminución de la producción de EPS de la cepa *A. brasilense* Sp7 en comparación con la cepa mutante 78 (gráfica 12).

Además también se cuantifico la unión del colorante RC a EPS normalizado con la cuantificación de mg de proteína. Se observó una considerable disminución de la cuantificación de EPS de la cepa 78 en comparación con *A. brasilense* Sp7 para el medio suplementado con KNO_3 , mientras que en medio adicionado con NH_4Cl se produce en ambas cepas mayor cantidad de EPS (grafica 13). Y si se comparan ambas cepas la producción de EPS es menor en las cepas Sp7 y mutante 78-A, en ambos medios solo para la cuantificación normalizada con mg de proteína.



Gráfica 12. Porcentaje de cuantificación de EPS en las cepas: *A. brasilense* Sp7 y mut-78, en presencia de las fuentes de nitrógeno: Nitrato de Potasio (KNO_3) y Cloruro de Amonio (NH_4Cl) a las 120 h. Cada barra representa el promedio de tres ensayos independientes con tres replicas por ensayo y tres repeticiones por cada uno de los cultivos con desviación estándar y significancia estadística.



Gráfica 13. Porcentaje de cuantificación de EPS unidos a rojo Congo, normalizado con la cuantificación de proteínas en las cepas: *A. brasilense* Sp7 y mut-78, en presencia de las fuentes de nitrógeno: Nitrato de Potasio (KNO_3) y Cloruro de Amonio (NH_4Cl) a las 120 h. Cada barra representa el promedio de tres ensayos independientes con tres replicas por ensayo y tres repeticiones por cada uno de los cultivos con desviación estándar y significancia estadística.

XV. Discusión

Las vías de transducción de señales son mecanismos ampliamente utilizados por los microorganismos para responder a estímulos del exterior. Las bacterias se enfrentan a diversos ambientes con constante cambio debido a diferentes variaciones como la disponibilidad de nutrientes, tensión de oxígeno, temperatura, pH, así como salinidad y metales pesados. Es indispensable que las bacterias respondan a los diferentes cambios y adaptarse al entorno por medio de percepción de señales obteniendo los nutrientes y la suficiente energía y conseguir un ahorro de la misma. Por esto, en el mundo bacteriano la regulación de la expresión génica constituye una herramienta fundamental para adaptarse a un hábitat cambiante.

Los mecanismos que responden a distintos estímulos del medio ambiente así como a cambios intracelulares, son detectados por proteínas modulares de señalización a través de mecanismos de transducción de señales que desencadenan respuestas de adaptación de la célula; las cuales se regulan de distintas maneras en diferentes bacterias (Gao & Stock, 2009).

Se ha descrito que el segundo mensajero di-GMPc regula varios fenotipos vitales para la célula, a través de vías de señalización complejas hacia respuestas específicas, así como adaptación ante diversos estímulos extracelulares e intracelulares en diferentes microorganismos. El di-GMPc se relaciona con diversas respuestas fisiológicas como la transición entre estilo de vida planctónico y sésil (biopelículas) así como la producción de adhesinas, síntesis de EPS y movilidad.

Por la relevancia que implica el conocimiento de la participación del di-GMPc en nuestro modelo de estudio *A. brasilense* se realizó un análisis bioinformático, se inició con el análisis de los genes que codifican a las proteínas DGCs; en el 2013 (Gamboa- Pérez, 2014), estudió los genes *dgcD* y *dgcE*, particularmente seleccionados por el interesante contexto genético, en que se ubican los genes y se obtuvieron las correspondientes mutantes.

Se prosiguió a realizar un análisis fenotípico de las mutantes en el gen *dgcD* de las cepas Sp7 y Sp245 comparándolas con las cepas silvestres. Con el fin de elucidar su función en la producción de biopelícula, producción de EPS y quimiotaxis *in vitro*.

El análisis bioinformático de la proteína DgcD mostro que contiene un dominio CHASE en el N-terminal probablemente a nivel periplásmico y entre dos dominios transmembrana

que le permite anclarse a la membrana citoplasmática, un dominio PAS que está relacionado con sistemas de transducción de señales de igual forma que el dominio CHASE, y acoplados a estos están los dominios GGDEF y EAL (Fig. 19-24 y 34).

El dominio CHASE (**C**yclases/**H**istidine kinases **A**ssociated **S**ensory **E**xtracellular) se encuentra extracelular o periplásmico con una región citoplasmática, junto a diversos dominios de señalización enzimática como cinasa histidínica, adenilato ciclasa, DGCs y los dominios PDE tipo EAL, así como dominios no enzimáticos tipo PAS, GAF, REC. Los límites y la longitud del dominio se establecen en función de los segmentos transmembrana que flanquean el dominio en ambos extremos (Anantharaman & Aravind, 2001). Se ha observado el dominio CHASE en el receptor de planta citocinina (CK) Cre1, lo que sugiere que versiones de este dominio reconocen derivados de adenina similares a citocinina, así como ligandos peptídicos de bajo peso molecular y median la transducción de señales a través de los respectivos receptores. La descripción de este dominio de unión a ligando-receptor-asociado y de la señalización de citocininas por plantas (Mougel & Zhulin, 2001; Pas *et al.* 2004), en *Azospirillum*, conduciría a la posible señalización por esta molécula durante la interacción con la planta hospedera; es por tanto, importante estudiar la proteína DgcD y su probable papel en la colonización a la planta.

Las proteínas que contienen los dominios **Per-ARNT-Sim** (PAS/PAC) son modulares y funcionan para detectar una amplia variedad de estímulos físicos y químicos, y regular la respuesta, la actividad de los dominios efectores (de salida) en las proteínas de transducción de señales como activación enzimática o regulación de genes. Los dominios PAS comprenden de 100-120 a. a. y presentan baja identidad en la secuencia, sin embargo conservan la estructura secundaria (Finn *et al.* 2006). Se unen a cofactores como metabolitos, iones, hemo y nucleótidos (FAD). Aunque es probable que muchos dominios PAS ejercen su papel fisiológico en la ausencia de cualquier cofactor. Con frecuencia, los dominios PAS median interacciones proteína-proteína. Dicha unión promueve la actividad de los dominios efectores de DGC y PDE. Por lo tanto, las interacciones entre PAS y otros dominios de sensores y efectoras son críticas para la transducción de señales. (Möglich *et al.* 2009). Entonces la presencia de este dominio en la proteína DgcD modularía la actividad de DGC o PDE. Por tanto es tentativo especular que la actividad dual de la proteína podría ser regulada por la percepción de estímulos externos e intracelulares por medio del dominio PAS/PAC al detectar O₂, NO, CO, el

estado redox de los componentes de la cadena de transporte de electrones, moléculas sensibles a la luz, y una variedad de otras señales (Römling *et al.* 2013).

Los alineamientos de la proteína en estudio de los dominios DGC y PDE con las proteínas ya cristalizadas y caracterizadas PleD de *C. crescentus* CB15 y WspR de *P. aeruginosa* con función de DGC y RocR de PDE, indicaron que en DgcD están conservados los residuos de amino ácidos que son requeridos para la actividad enzimática de ambos dominios (Fig. 32 y 33), por lo cual se sugiere que la proteína DgcD presenta ambas actividades dependiendo de las señales percibidas.

Los resultados de la formación de biopelícula (gráfica 1 y 2) indican mayor producción de biopelícula en el medio adicionado de KNO_3 que en presencia de NH_4Cl . *A. brasilense* presenta la vía de desnitrificación por medio de la nitrato reductasa periplásmica (Nap) y las nitrito reductasa (NirK1 y NirK2). Ambas enzimas producen óxido nítrico (NO) intermediario de la vía de desnitrificación, molécula señal que modula de manera positiva la formación de biopelícula a través del proceso de desnitrificación (Arruebarrena *et al.* 2012). Además evidencia creciente indica que el NO es una molécula de señalización clave que está implicada en una amplia gama de funciones en las plantas (Creus *et al.* 2005; Molina-Favero *et al.* 2008). Se ha demostrado que el NO desempeña un papel importante en cascadas de señalización regulando la producción de AIA, y esta molécula actúa regulando genes de *Azospirillum*; un efecto de la producción del AIA en la producción de biopelícula por la bacteria es un aspecto a definir. Sin embargo, la mutante derivada de la cepa Sp245, presentó una disminución de la producción de biopelícula del 75% en el medio adicionado con la fuente de nitrógeno KNO_3 . Sugiere de que la actividad de DGC está afectada (gráfica 1). Este dato correlaciona con lo obtenido en los ensayos de movilidad en presencia de diversos quimio atrayentes (gráficas 3, 4, y 5).

Mientras que la mutante-78 derivada de la cepa Sp7 en medio de KNO_3 , no presenta cambio con respecto a la cepa *A. brasilense* Sp7 silvestre, y un resultado sorprendente fue el determinado en el medio adicionado de NH_4Cl en el cual se observó un aumento del 211%, a pesar de la baja producción de biopelícula en dicho medio (gráfica 2). Sugiriendo que funcionaría como PDE, este dato correlaciona con la disminución de la movilidad en la mutante (gráficas 6, 7, 8, y 9).

En general, las DGCs aumentan niveles intracelulares de di-GMPc que se correlaciona con promover estilos de vida sésiles, agregación y la formación de biopelículas, pero con

reprimir el fenotipo de movilidad. Mientras que las PDEs regulan niveles bajos de di-GMPc y se correlaciona con promover la movilidad de la bacteria (Hickman *et al.* 2005; Hay *et al.* 2009; Newell *et al.* 2011; Römling *et al.* 2013). No obstante en *A. brasilense* Sp7 estudios de Russell *et al.* (2013), indican que esta apreciación podría ser simplista en esta bacteria.

Una parte esencial en la biopelícula son los EPS, componente principal de las matrices, la síntesis del polisacárido se requiere para la unión a la superficie de la raíz. Se realizó el ensayo de producción de EPS por medio de la unión al colorante RC, en la mutante 12-A y *A. brasilense* Sp245, se observa una disminución de los EPS en la cepa mutante con respecto a la silvestre *A. brasilense* Sp245 (gráfica 10 y 11), lo que concuerda con los datos de producción de biopelícula disminuida; mientras que en la cepa *A. brasilense* Sp7 y mutante-78, se observa un incremento de los EPS en la cepa mutante-78 con respecto a la silvestre *A. brasilense* Sp7. Varios aspectos podrían ser responsables de tal resultado ya que la matriz está constituida por varios componentes, entre ellos proteínas, ADN extracelular y apéndices propios de la célula como fimbrias y flagelos. Es importante indicar que tres clases de EPS pueden participar en la matriz de *Azospirillum* y solo una clase de EPS puede ser detectada por el colorante RC. Se sugiere utilizar una técnica más específica para detectar los EPS totales o utilizar una tinción más específica como el calcofluor, ya que se ha demostrado por las colonias que crecen en medios que contienen el colorante fluorescente calcofluor, que se une predominantemente a enlaces glucanos β -1,4 y β -1,3 en la producción del polisacárido de superficie de *Azospirillum* (Wood and Fulcher, 1978). Por otra parte, un exceso de EPS podría contribuir a la alteración en la movilidad observada (gráfica 12 y 13).

Aunque muchas proteínas GGDEF / EAL están involucrados en la formación de biopelículas, las señales a las que responden estas proteínas permanecen en gran parte desconocidas. La proteína DgcD presenta dominios de señalización que estarían detectando señales tanto externas como internas. Estudios posteriores deberán dilucidar este importante aspecto.

En conclusión los datos anteriores sugieren que la proteína tiene ambos dominios funcionales pero en diferentes cepas. Sin embargo, las diferencias en las respuestas también pueden ser debido al origen de las cepas bacterianas es decir si se aíslan de la superficie (la rizosfera) en este caso la cepa Sp7 de *A. brasilense* o internamente de la planta (endofíticas) cepa Sp245 de *A. brasilense*. Por lo cual debido a la competencia

rizosferica, en ambas cepas, al haber diferentes condiciones la señalización es distinta por lo que se pueden observar distintos fenotipos. La adaptación de la bacteria a las condiciones nutricionales proporcionadas por la planta puede, por lo tanto, desempeñar un papel importante en su establecimiento. Y hay que considerar que también la colonización de la bacteria hacia la planta depende la planta, ya que cada variedad vegetal secreta diferentes exudados radiculares (Bacilio-Jiménez *et al.* 2003). Además, se ha establecido que las bacterias que presentan una diversidad de su genoma, les permite una mejor adaptación y supervivencia en el hábitat en que se encuentra; ya que el género *Azospirillum*, habita en la rizosfera asociada a planta, cuyo ambiente es muy competitivo por nutrientes y esta redundancia puede favorecer su sobrevivencia en el ambiente (Wisniewski-Dyé *et al.* 2011).

XVI. Conclusiones

- El análisis bioinformático predice que el gen *dgcD* codifica para la proteína híbrida DgcD, cuyos dominios GGDEF y EAL están conservados. Con dominios de señalización CHASE y PAS. Además de dos dominios transmembrana que predicen un anclaje probable a la membrana celular.
- El gen que codifica para la DgcD está conservado en los genomas de las cepas de *A. brasilense* Sp245 y Sp7, así como en *Azospirillum lipoferum* sp B510 y 4B.
- Se observó que la mutante 12-A en el gen *dgcD::Km^R* de *A. brasilense* Sp245, presentó una disminución en la formación de biopelícula de 3.8 veces menor en comparación con la cepa silvestre en el medio mínimo adicionado con KNO₃, mientras que la producción de EPS disminuyó 4.1 en medio adicionado con NH₄Cl, bajo las condiciones de la determinación de los EPS por el método del rojo Congo.
- La movilidad se encontró aumentada, en presencia de varios quimioattractantes, lo que sugiere que bajo las condiciones experimentales probadas funciona como Diguanylatto ciclasa, disminuyendo quizás localmente la concentración celular del di-GMP.
- La mutante-78 derivada de la cepa silvestre *A. brasilense* Sp7 *dgcD::km^R* presentó un fenotipo diferente al de la mutante 12-A, ésta última no está alterada en la formación de biopelícula (en ambos medios de cultivo). Mientras que presentó disminución de la movilidad en presencia de varios quimioattractantes.

Funcionando como una fosfodiesterasa, bajo las condiciones experimentales del ensayo.

- Cabe la posibilidad de que el fondo genético de las cepas tenga diferencias no comprendidas, consideradas, ni exploradas en este estudio preliminar que modulen a los genes estudiados en este trabajo, responsables de los datos obtenidos aparentemente contradictorios.

XVII. Perspectivas

- Analizar el fenotipo de colonización al trigo de *A. brasilense* Sp245 Δ 12-A (*dgcD*)
- Complementación de la mutante y analizar los fenotipos de *A. brasilense* Sp245 Δ 12-A (*dgcD*)
- Caracterización de la actividad de DGC de *A. brasilense* Sp245 (*dgcD*)
- Analizar el fenotipo de colonización al trigo de *A. brasilense* Sp7 Δ -78 (*dgcD*)
- Complementación de la mutante y analizar los fenotipos *A. brasilense* Sp7 Δ -78 (*dgcD*)
- Caracterización de la actividad de PDE de *A. brasilense* Sp7 (*dgcD*)

XVIII. Bibliografía

Aleñkina S.A., Petrova L. P., Sokolova M. K., Chernyshova M.P., Trutneva K. A., Bogatyrev V. A., Nikitina V. E. 2014b. Comparative assessment of inductive effects of *Azospirillum* lectins with different antigenic properties on the signal systems of wheat seedling roots. Plant Soil. 381(1–2):337–349.

Alexandre G., Greer S.E., Zhulin I. B. 2000. Energy taxis is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol. 182:6042–6048.

Alexandre G. 2010. Coupling metabolism and chemotaxis-dependent behaviours by energy taxis receptors. Microbiology. 156:2283–2293.

Alexandre G. 2015 Chemotaxis in *Azospirillum*. Springer International Publishing Switzerland Handbook for *Azospirillum*. 6:101- 113.

Anantharaman V. and Aravind L. 2001. The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. Trends Biochem Sci. 26:(10) 579–582.

Anderl J. N., Zahller J., Roe F. and Stewart P. S. 2003. Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1251–1256.

Amikam D. and Galperin M.Y. 2006. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics.* 22:3– 6.

Arruebarrena Di Palma A., Pereyra C.M., Moreno Ramírez L., Xiqui Vázquez M.L., Baca B. E., Pereyra M. A., Lamattina L. & Creus C. M. 2013. Denitrification-derived nitric oxide modulates biofilm formation in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett.* 338: 77–85.

Assmus B., Hutzler P., Kirchhof G., Amann R., Lawrence J.R. y Hartmann A. 1995. In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1013-1019.

Bacilio-Jiménez M., Aguilar Flores S., Ventura- Zapata, Pérez-Campo S. & Bouquelet Zenteno, E. 2003. Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant and Soil.* 249: 271-27.

Baldani V.L.D., Alvarez D. B. M. A., Baldani J. I. and Döbereiner J.1986. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant Soil.* 90: 35-46.

Barak R., Nur I., Okon Y. 1983. Detection of chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. *J Appl Bacteriol* 53:399–403.

Bashan Y. 1986. Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants. *Soil Biol. Biochem.* 18: 297-301.

Bashan Y. y Levanony H.1988. Migration, colonization and adsorption of *Azospirillum brasilense* to wheat roots. In: *Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, eds. TC Bøg-Hansen DLJ Freed. 6:69-84.

Bashan Y. y Levanony H. 1989. Wheat root tips as a vector for passive vertical transfer of *Azospirillum brasilense* Cd. *J. Gen. Microbiol.*135:2899-2908.

Bashan Y., Levanony H. y Mitiku G.1989. Changes in proton efflux of intact wheat roots induced by *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 35: 691-697

Bashan Y. 1991. Changes in membrane potential of intact soybean root elongation zone cells induced by *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 37: 958-963.

Bashan Y., Alcaraz-Melendez L. y Toledo G. 1992. Responses of soybean and cowpea root membranes to inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Symbiosis.* 13:217-228.

Bashan Y. y Holguin G. 1993. Anchoring of *Azospirillum brasilense* to hydrophobic polystyrene and wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* 139: 379-385.

Bashan Y., Holguin G. 1994. Root-to-root travel of the beneficial bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2120–2131.

Bashan Y. y Holguin G. 1995. Inter-root movement of *Azospirillum brasilense* and subsequent root colonization of crop and weed seedlings growing in soil. *Microb. Ecol.* 29: 269-281.

Bashan Y. and Holguin, G. 2002. Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. *Trees-Struct. Funct.* 16:159-166.

Bashan Y., Holguin, G. and de-Bashan, L.E. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances.1997-2003. *Canadian Journal of Microbiology.* 50: 521-577.

Bashan Y, De-Bashan L.E. 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *Adv Agron.* 108:77–136.

Bassler B. L., y Losick, R. 2006. Bacterially speaking. *Cell.*125:237-24.

Bauer H., Ache P., Lautner S., Fromm J., Hartung W., Al-Rasheid K.A., Sonnewald S., Sonnewald U., Kneitz S., Lachmann N, Mendel R.R, Bittner F., Hetherington A.M., Hedrich R. 2013. The stomatal response to reduced relative humidity requires guard cell-autonomous ABA synthesis. *Curr Biol.* 23(1):53–57.

Bazaka K., Crawford R.J., Nazarenko E.L., Ivanova E.P. 2011. Bacterial extracellular polysaccharides. . *Adv Exp Med Biol.* 715:213-226.

Beijerinck M.W. 1925. Über ein *Spirillum*, welches freien Stickstoff binden kann? *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr.* 63:353-359.

Ben Dekhil S., Cahill M., Stackebrandt E. and Sly L.I. 1997. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. Syst. Appl. Microbiol. 20:72-77.

Betancourth M., Botero J. E., O.D., Rivera S. P., Sc B. 2004. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. Colomb Med. 35(1):34-39.

Bible A.N., Stephens B.B, Ortega D.R., Xie Z., Alexandre G. 2008. Function of a chemotaxis-like signal transduction pathway in modulating motility, cell clumping and cell length in the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol. 190:6365–6375.

Bilal R., Rasul G., Qureshi J. A. y Malik K. A. 1990. Characterization of *Azospirillum* and related diazotrophs associated with roots of plants growing in saline soils. World J. Microbiol Biotechnol. 6: 46-52.

Bleakley B.H., Gaskins M. H. Hubbell D. H. y Zam S. G. 1988. Floc formation by *Azospirillum lipoferum* grown on poly-(-hydroxybutyrate). Appl. Environ. Microbiol. 54:2986-2995.

Bordeleau E., Fortier L.C., Malouin F., Burrus V. 2011. C-di-GMP turnover in *Clostridium difficile* is controlled by a plethora of diguanylate cyclases and phosphodiesterases. PLoS Genet. 7(3): e1002039. doi:10.1371/journal.pgen.1002039.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem. 72:248–254.

Bruno C., Yves F. 2002. In situ characterization of bacterial extracellular polymeric substances. AFM. 23:173–182.

Caballero-Mellado J., Carcano M., Montiel M. G. y Mascarua-Esparza M. A. 1992. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivu*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. Symbiosis 13:243-253.

Cardon Z.G., Whitbeck J.L. 2007. The Rhizosphere - An Ecological Perspective. Academic Press, San Diego, CA. 31-56.

Carreño-López R., Sánchez A., Camargo N., Elmerich C. and Baca B. E. 2009. Characterization of *chsA*, a new gene controlling chemotactic response in *Azospirillum brasilense*. Arch. Microbiol. 191: 501-507.

Cerqueira A., Bonifacio A., Araujo F. F., Lira M. A. and do Vale Barreto M. 2015. *Azospirillum* sp. as a Challenge for Agriculture. Springer International Publishing Switzerland 12:29-51.

Chan C., Paul R., Samoray D., Amiot N.C., Giese B., Jenal U., Schirmer T. 2004. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylatecyclase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:17084 – 17089.

Chao L., Rakshe S., Leff M., Spormanna A. M. 2013. PdeB a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase that regulates *Shewanella oneidensis* MR-1 motility and biofilm formation. J. Bacteriol. 195(17):3827–3833.

Chen L-H., Ko seog lu V.K, Gu vener Z.T, Myers-Morales T, Reed J.M, D’Orazio SEF, Miller K.W., Gomelsky M. 2014. Cyclic di-GMP-dependent signaling pathways in the pathogenic firmicute *Listeria monocytogenes*. PLoS Pathog. 10(8): e1004301. doi:10.1371/journal.ppat.1004301.

Chole R. A., and Faddis B. T. 2003. Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: a possible mechanism to explain chronicity. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 129:634-636.

Chowdhury S.P., Nagarajan T., Tripathi R., Mishra M.N., Le Rudulier D. & Tripathi A.K. 2007. Strain-specific salt tolerance and osmoregulatory mechanisms in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol Lett. 267:72–79.

Christensen G. D., Simpson W. A., Bisno, A. L., and Beachey E. H. 1982. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infect Immun. 37(1):318-326.

Cohen A.C., Bottini R., Piccoli P.N. 2008. *Azospirillum brasilense* Sp245 produces ABA in chemically defined culture medium and increases ABA content in *Arabidopsis* plants. Plant Growth Regul. 54(2):97–103.

Cohen A.C., Bottini R., Pontin M., Berli F.J., Moreno D., Boccanlandro H., Travaglia C.N., Piccoli P.N. 2015. *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. Physiol Plant. 153:79–90.

Costerton J. W., Cheng K. J., Geesey G. G., Ladd T. I., Nickel J. C., Dasgupta M., and Marrie T. J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. Ann Rev Microbiol. 41:435–464.

Creus C.M., Graziano M., Casanovas E.M., Pereyra M.A., Simontacchi M., Puntarulo S., Barassi C. A. and Lamattina L. 2005. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense* induced lateral root formation in tomato. *Planta*. 221: 297–303.

Czaczyk K., Myszk K., 2007. Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Pol. J. Environ Stud*. 16:799-806.

Danese P. N., Pratt L. A., and Kolter R. 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol*. 182:3593–3596.

Da Re S., and Ghigo J. M. 2006. A CsgD-independent pathway for cellulose production and biofilm formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 188:3073-3087.

Davey M. E. y O'Toole G. A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 64:847-867.

Davies D. G. and Marques C. N. 2009. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J. Bacteriol*. 191:1393–1403.

Davies D. G., Parsek M. R., Pearson J. P., Iglewski B. H., Costerton J. W., and Greenberg E. P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 280: 295-298.

Davison J. 1988. Plant beneficial bacteria. *Bio-Technology*. 6:182-286.

Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Ptacek D., Vanderleyden J., Dutto P., Labandera-Gonzalez C., Caballero-Mellado J., Aguirre J.F., Kapulnik Y., Brener S., Burdman S., Kadouri D., Sarig S., Okon Y. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiol*. 28:871–879.

Döbereiner J., Marriel I.E. y Nery M. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol*. 22:1464-1473.

Donlan R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 8:881–890.

Duca D., Lörv J., Patten C.L., Rose D., Glick B.R. 2014. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 106:85–125

Eckert B., Weber O., Kirchhof G., *et al.* 2001. *Azospirillum dobereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 51:17–26.

Esquivel-Cote R., Ramírez-Gama R.M., Tsuzuki-Reyes G., Orozco-Segovia A., Huante P., 2010. *Azospirillum lipoferum* strain AZm5 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency. *Plant Soil*. 337(1–2):65–75.

Evans L. R., and Linker A. 1973. Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol*. 116:915–924.

Eweis J.B., Ergas S.J., Chang D.P., Schroeder E.D. 1999. Principios de biorecuperación: tratamiento para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y fisicoquímicos. *Madrid: McGraw Hill*.

Fages J. 1992. An industrial view of *Azospirillum* inoculants: Formulation and application technology. *Symbiosis*. 13:15-26.

Ferreira R. B., Antunes L. C., Greenberg E. P. and McCarter L. L. 2008. *Vibrio parahaemolyticus* ScrC modulates cyclic dimeric GMP regulation of gene expression relevant to growth on surfaces. *J. Bacteriol*. 190:851–860.

Flemming H.C., Wingender J., 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) Part I: structural and ecological aspects. *Water Sci. Tech*. 43:1-8.

Flemming H.C., Wingender J., 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol*. 8:623-633.

Finn R.D., Mistry J., Schuster-Bockler B., Griffiths-Jones S., Hollich V., Lassmann T., Moxon S., Marshall M., Khanna A., Durbin R., *et al.* 2006. Pfam: clans, web tools and services. 34: 247–251.

Friedman L., and Kolter R. 2004. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol. Microbiol*. 51:675–690.

Galperin M. Y. 2005. A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol*. 5: 35-41.

Gamboa-Pérez A. 2014. Participación de proteínas GGDEF en crecimiento de *Azospirillum brasilense*. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Microbiología), con opción en Bioquímica y Genética Microbiana.

Gao R., Stock A.M. 2009. Biological insights from structures of two-component proteins. *Annual review of Microbiology* 63:133-54.

Gjermansen M., Ragas P., and Tolker-Nielsen T. 2006. Proteins with GGDEF and EAL domains regulate *Pseudomonas putida* biofilm formation and dispersal. *Annu Rev Microbiol.* 265:215–224.

Glick B.R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol Res.* 169(1):30–39

Goodman A. L., Kulasekara B., Rietsch A., Boyd D., Smith R. S. and Lory S. 2004. A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev. Cell.* 7:745–754

Greer-Phillips S.E., Stephens B.B., Alexandre G. 2004. An energy taxis transducer promotes root colonization by *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol.* 186: 6595–6604.

Guerrero-Molina M.F., Winik B.C., Pedraza R.O. 2012. More than rhizosphere colonization of strawberry plants by *Azospirillum brasilense*. *Appl Soil Ecol.* 61:205–212.

Gupta K., Dey A., Gupta B. 2013. Plant polyamines in abiotic stress responses. *Acta Physiol Plant.* 35(7):2015–2036.

Hall P.G and Krieg N.R. 1983. Swarming of *Azospirillum brasilense* on solid media. *Can J Microbiol.* 29:1592-1594.

Hamilton W.A. 1985. Classical model of corrosion by sulfate-reducing bacteria (SRB). *Annu Rev Microbiol.* 39:195-217.

Hartmann A., Baldani J.I. 2006. The Genus *Azospirillum*. In Dworkin M (ed). *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer Science Business Media. 115–140.

Hauwaerts D., Alexandre G., Das S. K., Vanderleyden J. & Zhulin I. B. 2002. A major chemotaxis gene cluster in *Azospirillum brasilense* and relationships between chemotaxis operons in α -proteobacteria. *FEMS Microbiol. Let.* 208:61-67.

Hay I.D., Remminghorst U., Rehm B.H. 2009. MucR, a novel membrane-associated regulator of alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 75:1110-1120.

He Y.W., Ng A.Y., Xu M., Lin K., Wang L.H., Dong Y.H., Zhang L.H. 2007. *Xanthomonas campestris* cell-cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signalling network. *Mol Microbiol.* 64:281-292.

Hecht G.B., Lane T., Ohta N., Sommer J.M., Newton A. 1995. An essential single domain response regulator required for normal cell division and differentiation in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 177:6223– 6229.

Hengge R. 2009. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 7:263–273.

Henrichsen J. 1972. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* 36: 478-503.

Heydorn A., Nielsen A. T., Hentzer M., Sternberg C., Givskov M., Ersboll B. K., y Molin S. 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology.* 146: 2395-2407.

Hickman J. W., Tifrea D. F. and Harwood C. S. 2005. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Bacteriol Rev.* 102:14422–1427.

Holguin G. 1999. Nitrogen fixation of plant growth promoting bacteria. In: *Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria*, ed. Joy Marie Tan. River Edge, USA: World Scientific Publishing Co.

Jain D.K. y Patriquin D. G. 1984. Root hair deformation, bacterial attachment, and plant growth in wheat-*Azospirillum* associations. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 1208-1213.

Joo H. S. and Otto M. 2012. Molecular basis of in-vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chem Biol* 19(12):1503–1513.

Kalia D., Merey G., Nakayama S., Zheng Y., Zhou J., Luo Y., Guo M., Roembkea B. T., and Herman O. S. 2013. Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p) ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chem. Soc. Rev.* 42:305-341.

Kapulnik Y., Sarig S., Nur I. y Okon Y. 1983. Effect of *Azospirillum* inoculation on yield of field-grown wheat. *Can. J. Microbiol.* 29:895-899.

Karatan E. and Watnick P. 2009. Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. *J. Bacteriol.* 73(2): 310–347.

Khammas K.M., Ageron E., Grimont P. A. y Kaiser P. 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Res Microbiol.* 140:679-693.

Klausen M., Heydorn A., Ragas P., Lambertsen L., Aaes-Jorgensen A., Molin S., and Tolker-Nielsen T. 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol. Microbiol.* 48:1511–1524.

Koul V., Tripathi C., Adholeya A., Kochar M. 2015. Nitric oxide metabolism and indole acetic acid biosynthesis cross-talk in *Azospirillum brasilense*. *Res Microbiol.* 166:174-185.

Kloepper J.W., Beauchamp C.J. 1992. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.* 38: 219-1232.

Krell T., Lacal J., Munoz-Martinez F., Reyes-Darias J.A., Cadirci B.H., Garcia-Fontana C., Ramos J.L. 2011. Diversity at its best: bacterial taxis. *Environ Microbiol.* 13:1115–1124

Krieg N.R. y Döbereiner J. 1986. The genus *Azospirillum*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, eds. NR Krieg, JG Holt, Baltimore: The Williams and Wilkins Co. 1:96- 104.

Kroncke K. D., Orskov I., Orskov F., Jann B., y Jann K. 1990. Electron microscopic study of coexpression of adhesive protein capsules and polysaccharide capsules in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 58: 2710-2714.

Kucey R.M.N. 1988. Alteration of size of wheat root systems and nitrogen fixation by associative nitrogen-fixing bacteria measured under field conditions. *Can. J. Microbiol.* 34:735-739.

Kuchma S.L., Griffin E.F., O'Toole G.A. 2012. Minor pilins of the type IV pilus system participate in the negative regulation of swarming motility. *J. Bacteriol.* 194:5388 –5403.

Lappin-Scott H. M., y Costerton J. W. 1995. *Microbial biofilms*, Cambridge University Press, Cambridge; New York.

Lavrinenko K., Chernousova E., Gridneva E. *et al.* 2010. *Azospirillum thiophilum* sp. nov. a novel diazotrophic bacterium isolated from a sulfi de spring. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60: 2832–2837

Lin S-Y., Young C-C., Hupfer H. *et al.* 2009. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59:761–765.

Lin S-Y., Shen F-T., Young L-S. *et al.* 2012. *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62:1185–1190.

Lin S-H., Liu Y-C., Hameed A. *et al.* 2013. *Azospirillum fermentarium* sp. nov., a novel nitrogen fixing species isolated from a fermenter in Taiwan. *Int J Syst Evol Microbiol.* 63:3762–3768

Liu N., Xu Y., Hossain S., Huang N., Coursolle D., Gralnick J.A., Boon E.M. 2012. Nitric oxide regulation of cyclic di-GMP synthesis and hydrolysis in *Shewanella woodyi*. *Biochemistry.* 51:2087–2099.

Magalhães F., Baldani J., Souto S. *et al.* 1983. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *An Acad Bras Ciênc.* 55:417–430

Mayer C., Moritz R., Kirschner C., Borchard W., Maibaum R., Wingender J., Flemming H. C. 1999. The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *Int J Biol Macromol.* 26:3–16

Mehnaz S., Weselowski B., Lazarovits G. 2007a. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57:620–624.

Mehnaz S., Weselowski B., Lazarovits G. 2007b. *Azospirillum zeae* sp. nov. a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2805–2809.

Michiels K., Croes C. L. y Vanderleyden J. 1991. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *J Gen Microbiol.* 137: 2241–2246.

Minjáles-Sáez M. 2015. Papel de la fosfodiesterasa putativa B de *Azospirillum brasilense* en la quimiotaxis. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Microbiología), con opción en Bioquímica y Genética Microbiana.

Mitter B., Brader G., Afzall M., Compant S., Naveed M., Trognitz F., Sessitsch A. 2013 Advances in elucidating beneficial interactions between plants, soil, and bacteria. In: Sparks DL (ed) *Advances in Agronomy*. Academic Press, Burlington.

Moens S., Schlöter M., Vanderleyden J. 1996 Expression of the structural gene, *laf1*, encoding the flagellin of the lateral flagella in *Azospirillum brasilense* Sp7. *J. Bacteriol.* 178:5017–5019.

Möglich A., Ayers R. A., and Moffat K. 2009. Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim Domains Structure. *Elsevier.* 17:1282-1294.

Molina-Favero C., Creus C.M., Lanteri M.L., Correa-Aragunde N., Lombardo M.C., Barassi C.A., Lamattina L. 2007. Nitric oxide and plant growth promoting rhizobacteria: common features influencing root growth and development. *Adv Bot. Res* 46:1–33

Molina-Favero C., Creus C.M., Simontacchi M., Puntarulo S. and Lamattina L. 2008. Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *Mol Plant-Microbe Interact.* 21:1001–1009.

Monds R. D., y O'Toole G. A. 2009. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol.* 17(2):73–87.

Mougel C. and Zhulin I.B. 2001. CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends Biochem Sci.* 26(10): 582–584.

Newell P.D., Boyd C.D., Sondermann H., O'Toole G.A. 2011. A c-di-GMP effector system controls cell adhesion by inside-out signaling and surface protein cleavage. *PLoS Biol.* 1; 9(2):e1000587. doi: 10.1371/journal.pbio.1000587.

Okon Y., Cakmakci L., Nur I., Chet I. 1980. Aerotaxis and chemotaxis of *Azospirillum brasilense*. *Microb Ecol.* 6(3):277–280.

Okon Y., Labandera-Gonzalez C.A. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26:1591-1601.

Okon Y., Vanderleyden J. 1997. Root-associated *Azospirillum* species can stimulated plants. *ASM News.* 63:366–370.

O'Toole G., Kaplan H. B., and Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 54:49-79.

Pal A., Paul A., 2008. Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian J. Microbiol.* 48:49-64.

Pas J., Grotthuss M. V., Wyrwicz L. S., Rychlewski L. and Barciszewsk J. 2004. Structure prediction, evolution and ligand interaction of CHASE domain. *FEBS Letters.* 576:287–290.

Patriquin D.G. y Döbereiner J. 1978. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. *Can. J. Microbiol.* 24:734-742.

Paul R., Abel S., Wassmann P., Beck A., Heerklotz H., Jenal U. 2007. Activation of the diguanylate cyclase PleD by phosphorylation-mediated dimerization. *J. Biol. Chem.* 282:29170 –29177.

Pedraza O. R., Mentel I. M., Ragout L. A., Xiqui M.L., Segundo D., and Baca B. E. 2009 *Plant Growth-Promoting Bacteria: The Role of Chemotaxis in the Association Azospirillum Brasilense*. Nova Science Publishers, Inc. 2: 1-31.

Pedraza O. R, Motok J., Tortora M. L., Salazar S. L. and Díaz Ricci J. C. 2007. Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in strawberry plants. *Plant soil.* 295:169-178.

Peng G., Wang H., Zhang G. *et al.* 2006. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56:1263–1271.

Pereg-Gerk L., Gilchrist K., & Kennedy I. R. 2000. Mutants with Enhanced Nitrogenase Activity in Hydroponic *Azospirillum Brasilense*-Wheat Associations. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2175–2184

Pérez-Mendoza and Sanjuán. 2016. Exploiting the commons: cyclic diguanylate regulation of bacterial exopolysaccharide production. *Curr Opin Microbiol.* 30:36–43.

Philippot L., Raaijmakers J. M., Lemanceau P. & van der Putten W. H. 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology.* 11:789–799.

Phippen C.W., Mikolajek H., Schlaefli H.G., Keevil C.W., Webb J.S., Tews I. 2014. Formation and dimerization of the phosphodiesterase active site of the *Pseudomonas aeruginosa* MorA, a bi-functional c-di-GMP regulator. *FEBS Lett.* 24:4631-4636.

Plate L., Marletta M.A. 2013. Nitric oxide-sensing H-NOX proteins govern bacterial communal behavior. *Trends Biochem Sci.* 38:566-575.

Post J. C., Stoodley P., Hall-Stoodley L., and Ehrlich G. D. 2004. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 12:185-190.

Purevdorj B., Costerton J. W. and Stoodley P. 2002. Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4457–4464.

Rajkumar M., Ae N., Narasimha M., Prasad V., Freitas H. 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol* 28 (3):142–149.

Ramadan H. H., Sanclement H. A., and Thomas J. G., 2005. Chronic rhinosinusitis and biofilms. *Otolaryngol Head Neck Surg* 132: 414-417.

- Ramesh A. 2015. Second messenger - Sensing riboswitches in bacteria. *Semin Cell Dev Biol.* 47-48:3-8.
- Ramírez-Mata A., Fernández-Domínguez I. J., Nuñez-Reza K. J., Xiqui-Vázquez M. L. y Baca B. E. 2014. Redes de señalización en la producción de biopelículas en bacterias: quorum sensing, di-GMPc y óxido nítrico. *Asociación Argentina de Microbiología.* 46(3):242-255
- Ramírez-Mata A., López-Lara L. I., Xiqui-Vázquez M. L., Jijón-Moreno S., Romero-Osorio A., Baca B. E. 2016. The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense*. *Elsevier.* 167(3):190–201.
- Reguera G., McCarthy K. D., Mehta T., Nicoll J. S., Tuominen M. T., y Lovley D. R. 2005. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature.* 435: 1098-1101.
- Rehm B.H.A., 2010. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:578-592.
- Reinhold B., Hurek T., Fendrik I. *et al.* 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.
- Rodriguez-Navarro D. N., Dardanelli M.S., Ruíz-Saíñz J. E. 2007. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiol. Lett.* 272:127–136.
- Römling U., Galperin M.Y., Gomelsky M. 2013. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77:1-52.
- Russell M.H., Bible A.N., Fang X., Gooding J., Campagna S., Gomelsky M., Alexandre G. 2013. Integration of the second messenger c-di-GMP into the chemotactic signaling pathway promotes sensory adaptation. *MBio* 4(2):1-13.
- Ryjenkov D.A., Simm R., Römling U., Gomelsky M. 2006. The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP. The PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J. Biol. Chem.* 281:30310–30314.
- Sambrook E., Fritsch F. and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sauer K., Camper A. K., Ehrlich G. D., Costerton J. W. y Davies D. G. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 184:1140-1154.
- Sauer K., Cullen M. C., Rickard A. H., Zeef L. A., Davies D. G. and Gilbert P. 2004. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J. Bacteriol.* 186:7312–7326.
- Schneider R. P. and Marshall K. C. 1994. Retention of the Gramnegative marine bacterium SW8 on surfaces -- effects of microbial physiology, substratum nature and conditioning films, colloids and surfaces B: *Biointerfaces.* 2:387-396.
- Shan X., Yan J., Xie D. 2012. Comparison of phytohormone signaling mechanisms. *Plant Biol.* 15(1):84–91.
- Sheng G.-P., Yu H.-Q., Li X.-Y., 2010. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. *Biotechnol. Adv.* 28:882-894.
- Shrout J. D., Chopp D. L. Just C. L., Hentzer M., Givskov M., and Parsek M. R. 2006. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol. Microbiol.* 62:1264–1277.
- Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Zdrovenko E.L., Burygin G.L., Konnova S.A., Ignatov V.V. 2014. Characterization of the lipopolysaccharides of serogroup II *Azospirillum* strains. *Microbiology.* 83(4):326–334.
- Singh M., Tripathi A. K. y Klingmüller W. 1989. Identification of a regulatory *nifA* type gene and physical mapping of cloned new *nif* regions of *Azospirillum brasilense*. *Mol. Gen. Genet.* 219:235-240
- Singh C.S. 1992. Prevalence of *Azospirillum* within the stem nodules of *Aeschynomene* spp. and *Neptunia* sp. *Z. Mikrobiol.* 147:455-458.
- Singh P. K., Parsek M. R., Greenberg E. P., and Welsh M. J. 2002. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature.* 417: 552-555.
- Simões M., Simões L.C., Vieira M.J. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT -Food Sci. Technol.* 43:573-583.

Soh S., Byrska M., Grzybowska K. K. and Grzybowski B. A. 2010 Reaction -Diffusion Systems in Intracellular Molecular Transport and Control. *Angew Chem Int Ed Engl.* 25:4170–4198.

Somers E., Ptacek D., Gysegom P., Srinivasan M., Vanderleyden J. 2005. *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. *Appl Environ Microb.* 71(4):1803–1810.

Spaepen S., Van derleyden J., Remans R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31:425–48.

Spaepen S., Dobbelaere S., Croonenborghs A., Vanderleyden J. 2008. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant Soil.* 312:15-23.

Spaepen S., Vanderleyden J., Okon Y. 2009. Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *Adv. Bot. Res.* 51:283–320.

Steenhoudt O., & Vanderleyden J. *Azospirillum*, 2000. A Free-Living Nitrogen fixing Bacterium Closely Associated with Grasses: Genetic, Biochemical and Ecological Aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:487–506.

Stephens B.B., Loar S.N., Alexandre G. 2006. Role of CheB and CheR in the complex chemotactic and aerotactic pathway of *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol.* 188:4759–4768.

Strzelczyk E., Kampert M. y Li C. Y. 1994. Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiol. Res.* 149: 55-60.

Stevenson G., Andrianopoulos K., Hobbs M., and Reeves P. R. 1996. Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *J. Bacteriol.* 178:4885–4893.

Stoodley P., Sauer K., Davies D. G., y Costerton, J. W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev. Microbiol.* 56:187-209.

Sutherland I. W. 2001. The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* 9:222–227.

Tarrand J.J., Krieg N. R. y Döbereiner J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. *Can. J. Microbiol.* 24:967-980.

Tchigvintsev A., Xu X., Singer A., Chang C., Brown G., Proudfoot M., Cui H., Flick R., Anderson W. F., Joachimiak A., Galperin M. Y., Savchenko A. and Yakunin A. F. 2010. Structural insight into the mechanism of cyclic di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases. *J. Mol. Biol.* 402:524–538.

Thormann K. M., Saville R. M., Shukla S. and Spormann A. M. 2005. Induction of rapid detachment in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *J. Bacteriol.* 187:1014–1021.

Thomas J. G., and Nakaishi L. A. 2006. Managing the complexity of a dynamic biofilm. *J Am Dent Assoc.* 137:10-15.

Tian, Y., 2008. Behaviour of bacterial extracellular polymeric substances from activated sludge: a review. *Int. J. Environ. Pollut.* 32:78-89.

Tolker-Nielsen T., Brinch U. C., Ragas P. C., Andersen J. B., Jacobsen C. S. y Molin S. 2000. Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. Biofilms. *J. Bacteriol.* 182:6482-6489.

Tortora M.L., Díaz-Ricci J.C., Pedraza R.O. 2011. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Arch. Microbiol.* 193:275–286.

Ude S., Arnold D. L., Moon D. C., Timms-Wilson T., and Spiers A. J. 2006. Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. *Environ. Microbiol.* 8:1997–2011.

Uhlinger D. J., and White D. C. 1983. Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glycocalyx in *Pseudomonas atlantica*. *Appl Environ Microbiol* 45: 64-70.

Umali-Garcia M., Hubbell D.H., Gaskins M. H. y Dazzo F. B. 1980. Association of *Azospirillum* with grass roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:219-226.

Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud M.L., Touraine B., Moënné-Loccoz Y., Muller D., Legendre L.,

Wisniewski-Dyé F. and Combaret C. 2013. Plant growth- promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in plant science.* 4:1-19.

Van Bastelaere E., Lambrecht M., Vermeiren H., Van Dommelen A., Keijers V., Proost P., Vanderleyden J. 1999. Characterization of a sugar-binding protein from *Azospirillum brasilense* mediating chemotaxis to and uptake of sugars. *Mol. Microbiol.* 32:703–714.

Vanbleu E. and Vanderleyden J. 2003. *Molecular Genetics of rhizosphere and plant root colonization.* Kluwer Academics Publishers. Netherlands.

Vandenhove H., Merckx Van R., Steenbergen M. y Vlassak K. 1993. Microcalorimetric characterization, physiological stages y survival ability of *Azospirillum brasilense*. *Soil Biol. Biochem.* 25: 513-519.

VanderBroek A., Michiels J., Van Gool A., Vanderleyden J. 1993. Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial *nifH*-gene during association. *Mol. Plant Microbe Interact.* 6:592-600.

VanderBroek, A.V., and Vanderleyden J. 1995. The Role of Bacterial Motility, Chemo taxis, and Attachment in Bacteria-Plant Interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:800-810.

VanderBroek A., Lambrecht M., Vanderleyden J. 1998. Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense*. *Microbiology.* 144:2599-2606

Vu B., Chen M., Crawford R., Ivanova E., 2009. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* 14:2535-2554.

Wadhams G.H., Armitage J.P. 2004. Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:1024-1037.

Walker V., Bertrand C., Bellvert F., Moëne-Loccoz Y., Bally R., Comte G. 2011. Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. *New Phytol.* 189(2):494–506.

Walker V., Couillerot O., von Felten A., Bellvert F., Jansa J., Maurhofer M., Bally R., Moëne-Loccoz Y., Comte G. 2012. Variation of secondary metabolite levels in maize seedling roots induced by inoculation with *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Glomus* consortium under field conditions. *Plant Soil* 356:151–163

Wassmann P., Chan C., Paul R., Beck A., Heerklotz H., Jenal U., Schirmer T. 2007. Structure of BeF₃ -modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. *Structure.* 15:915–927.

Waters C. M. 2012. The meteoric rise of the signaling molecule cyclic di-GMP. *Microbe Wash DC.* 7(8): 353–359.

Whitney J.C., Colvin K.M., Marmont L.S., Robinson H., Parsek M.R., Howell P.L. 2012. Structure of the cytoplasmic region of PelD, a degenerate diguanylate cyclase receptor that regulates exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 287:23582–23593.

Wingender J., Neu, T. R., y Flemming H.-C. 1999. Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure, and function. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 623-633.

Wisniewski-Dyé 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., Zhulin I.B. 2011. *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. *PLoS Genet* 7(12): e1002430. doi:10.1371/journal.pgen.1002430

Wisniewski-Dyé F., Drogue B., Borland S., Prigent-Combaret C. 2013. *Azospirillum*-plant interaction: from root colonization to plant growth promotion. In: Rodelas González MB, González-López J (Eds) *Beneficial plant-microbial interactions: ecology and applications.* CRC Press, London.

Wood A. G., Menezes E. M., Dykstra C., and Duggan D.E. 1982. Methods to demonstrate the megaplasmids (or minichromosomes) in *Azospirillum*, p. 18. In W. Klingmu"ller (ed.), *Azospirillum I: genetics, physiology, ecology.* Burkha"user Verlag, Basel, Switzerland.

Wood P. & Fulcher R. 1978. Interaction of some dyes with cereal beta-glucans. *Cereal Chemistry.* 55: 952–966.

Wolfaardt G. M., Lawrence J. R., Robarts R. D., y Caldwell D. E. 1998. In situ Characterization of biofilm exopolymers involved in the accumulation of chlorinated organics. *Microb Ecol.* 35:213-223.

Xie C, Yokota A (2005) *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:1435–1438

Xiqui M.A., Romero A., Terán E., Soto L., Baca B. 2010. Nuevo sistema de señalización en bacterias.

Elementos. 80:21-29.

Yahalom E., Dovrat A., Okon Y. y Czosnek H. 1991. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strain Cd and *Rhizobium* on the root morphology of burr medic (*Medicago polymorpha* L.). Isr. J. Bot. 40:155-164.

Yashuda M., Isawa T., Shinozaki S., Minamisawa K., Nakashita H. 2009. Effects of colonization of a bacterial endophyte *Azospirillum* sp. B510 on disease resistance in rice. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73:2595-99.

Young C-C., Hupfer H., Siering C. et al. 2008. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oilcontaminated soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58:959–963.

Zhulin I. B. & Armitage J. P. 1993. Motility, chemokinesis, and methylation independent chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol. 175:952-958.

Zhou Y., Wei W., Wang X. 2009. *Azospirillum palatum* sp. nov. isolated from forest soil in Zhejiang province, China. J. Gen. Appl. Microbiol. 55:1–7.

Zhou S., Han L., Wang Y., Yang G., Zhuang L. and Hu P. 2013. *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. Int.J. Syst. Evol. Microbiol. 63: 2618-2624.

XIX. Anexo

Medios de Cultivo

MEDIO LB* (Luria Bertani Modificado)

Para un 1000 ml

- Extracto de levadura 5.0 g
- Cloruro de sodio (NaCl) 10mM 0.5344 g
- Pectona de caseína 10.0 g
- Sulfato de Magnesio (MgSO₄) 2.5 mM.....0.6162g
- Cloruro de Calcio (CaCl₂) 2.5 mM.....0.3675g

Ajustar el pH a 7 con NaOH al 20%

Para medio solido preparar agar bacteriológico al 1.5 %

Esterilizar a 15 libras, 121 °C por 20 minutos.

MEDIO D (Difco)

Para 1000 ml

- Nutriente Broth (Caldo Difco) 8.00 g
- MgSO₄ .7H₂O 0.25 g
- KCl .4H₂O 1.00 g
- MnCl₂ 0.01 g

Ajustar el pH a 6.8 con KOH al 20 %

Para preparar medio sólido, utilizar el agar bacteriológico al 1.5 %

Esterilizar a 15 Lb, 12°C durante 20 minutos.

Medio rojo Congo (RC)

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

Para 1000 ml

- DL-málico 5.0 g
- Extracto de levadura.....0.5g
- K_2HPO_4 10 % 5 ml
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10% 2 ml
- NaCl 10% 1ml
- $FeCl_3$ 1% 1.4 ml
- $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.1% 2 ml
- KOH 4.8 g
- rojo Congo 0.25% 15 ml
- Agar bacteriológico 1.5g/100ml

Esterilizar a 15 Lb, 12°C durante 20 minutos.

Medio K-Malato

Base para 1000 ml

- K_2HPO_4 (Fosfato de Potasio monobásico)..... 1.67 g
- KH_2PO_4 (Fosfato de potasio bibásico) 0.87g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.29 g
- NaCl..... 0.48g
- Ácido Málico..... 4.5326g

Esterilizar a 5 Lb, durante 30 minutos.

Reactivos para complementar

- $CaCl_2$ 0.7%..... 10 ml
- $FeCl_3$ 1%.....1ml
- $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.5%.....1ml
- NH_4Cl 20 %.....5ml
- Oligoelementos.....10ml

Oligoelementos (1000 ml)

- $MnSO_4$ (Sulfato de manganeso).....0.25g
- $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ (Sulfato de zinc heptahidratado).....0.07g
- $CoSO_4 \cdot 7 H_2O$ (Sulfato de cobalto heptahidratado).....0.014g
- $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ (Sulfato de Cobre).....0.0125g
- H_3BO_3 (Ácido Bórico).....0.003g

Esterilizar a 5 libras durante 30 min.

Finalmente, dejar a prueba de esterilidad a 30 °C toda la noche.

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 (Nitrogen Fixation Biological)

- Ácido málico.....3.70g
- K_2HPO_4 10%.....5ml
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10%.....2ml
- NaCl 10%.....1 ml
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1%.....2 ml
- Micronutrientes.....2 ml
- Fe-EDTA 1.64%.....4 ml

Fuentes de Nitrógeno para 1000ml

- KNO_3 1.390g
- NH_4Cl 0.378g

Stock de Micronutrientes

- $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.200ml
- $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.245g
- H_3BO_4 0.280g
- $CuSO_4$ 0.008g
- $ZnSO_4$ 0.024g
- H_2O 200ml

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

Ajustar el pH a 6.5 con KOH al 10%

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