



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

---

---

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en *Azospirillum brasilense* Sp7.**

Tesis que para obtener el grado de  
BIÓLOGO

PRESENTA:  
Viruega Góngora Víctor Iván

TUTOR: DR. ALBERTO RAMÍREZ MATA



## **DEDICATORIA**

A toda mi familia que siempre me ha apoyado, pero principalmente a mi madre María Angélica Góngora Abraján y a mi hermano Juan Carlos Viruega Góngora que me dan la fuerza para poder alcanzar todas mis metas.

Al Dr. Alberto Ramírez Mata quien superviso el desarrollo de esta tesis, al que le deseo el mejor de los éxitos al frente del laboratorio, así como por su paciencia, atención y asesoría.

A la Dra. Beatriz Eugenia Baca, por permitirme la oportunidad de ingresar a su equipo de trabajo ofreciéndome su apoyo, experiencia y conocimiento.

Al maestro Joaquín Aguilar y la Maestra Mari Xiqui, que me enseñaron como trabajar y desenvolverme en el laboratorio.

Con gran afecto y cariño a todos mis compañeros de laboratorio con los cuales disfruto cada día.

## **ÍNDICE**

<b>1 RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>2 INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
2.1 Genero <i>Azospirillum</i>	7
2.2 Colonización por <i>Azospirillum brasilense</i>	9
2.3 Biopelícula	10
2.4 Desarrollo de la biopelícula	12
2.5 Componentes de la biopelícula	12
<b>3 ANTECEDENTES</b>	<b>15</b>
<b>4 ANTECEDENTES DIRECTOS</b>	<b>16</b>
<b>5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>18</b>
<b>6 JUSTIFICACION</b>	<b>19</b>
<b>7 HIPÓTESIS</b>	<b>19</b>
<b>8 OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
8.1 OBJETIVOS PARTICULARES	19
<b>9 MATERIAL Y METODOS</b>	<b>20</b>
9.1 Extracción de proteínas de superficie bacteriana	20
9.2 Extracción de proteínas superficie a diferentes tiempos de acción mecánica.	21
9.3 Unidades Formadoras de Colonia UFC	21
9.4 Extracción de proteínas de superficie bacteriana en diferentes medios y tiempos para crecimiento bacteriano.	22
9.5 Extracción de proteínas de superficie bacteriana en biopelícula de <i>Azospirillum</i> .	22
9.6 Extracción de proteínas superficie a diferentes tiempos de acción mecánica.	22
9.7 Unidades Formadoras de Colonia UFC	23
9.8 Extracción de proteínas de superficie bacteriana en diferentes medios y tiempos para crecimiento bacteriano.	23

***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en Azospirillum brasilense Sp7***

---

9.9 Extracción de proteínas de superficie bacteriana en biopelícula de <i>Azospirillum</i> .	23
<b>10 RESULTADOS</b>	<b>25</b>
10.1 Estandarización de un método para extraer proteínas de superficie bacteriana de <i>Azospirillum brasilense</i>	25
10.2 Tiempos de acción mecánica	25
10.3 Unidades Formadoras de Colonias	26
10.4 Extracción de proteínas de superficie bacteriana en diferentes medios y tiempos de crecimiento bacteriano.	28
10.5 Extracción de proteínas de superficie bacteriana en biopelícula de <i>Azospirillum</i> .	29
10.6 Comparación con la metodología utilizada para extraer flagelos de <i>Aeromonas</i>	31
10.7 Secuenciación de proteínas de superficie por MALDI/TOF	32
<b>11 DISCUSIÓN</b>	<b>37</b>
<b>12 CONCLUSIONES</b>	<b>40</b>
<b>13 PERSPECTIVAS</b>	<b>40</b>
<b>14 AGRADECIMIENTOS</b>	<b>41</b>
<b>16 ANEXOS</b>	<b>42</b>
<b>15 BIBLIOGRAFIA</b>	<b>44</b>
<b>17 ABREVIATURA</b>	<b>48</b>

## **1 RESUMEN**

*Azospirillum brasilense* es una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPR) de cultivos económicamente importantes, con la capacidad de incrementar el crecimiento de la planta en un 5-30%. Para que este beneficio se lleve a cabo, primero es necesario que *Azospirillum* colonice a la planta que será su hospedero y posteriormente forme la biopelícula, la cual es una estructura que le otorga protección contra el ambiente y otros competidores, asegurando su estancia en la planta.

La estructura de la biopelícula está determinada por una matriz compuesta por las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) como: polisacáridos, ácidos nucleicos extracelulares, lípidos y proteínas. Aunque ya hay trabajos que comienzan a describir como las SPE, en especial las proteínas de superficie bacteriana están involucradas en la formación de la biopelícula en bacterias como *Escherichia* y *Pseudomonas* hasta la fecha se sabe poco cómo estas proteínas de superficie están implicadas en la formación de la biopelícula en *Azospirillum*. El objetivo del presente trabajo fue la estandarización de una técnica que permita obtener proteínas de superficie bacteriana de forma sencilla y rápida para su posterior estudio por inmunodetección en la biopelícula, esto nos permitirá demostrar la presencia de estas proteínas en la matriz de esta estructura.

La metodología estandarizada en este trabajo de tesis nos permitió obtener algunas proteínas de superficie de *Azospirillum brasilense* Sp7 de las cuales se eligieron 3 proteínas con pesos moleculares de 100 kDa, 40 kDa y 37 kDa; tal elección fue en base a que estas proteínas se encontraban presentes y en mayor concentración, tanto en extractos obtenidos de células plantónicas como de células en formación de biopelículas. Dichas proteínas se mandaron a secuenciar por espectrometría de masas MALDI/TOF. Los análisis arrojaron que la proteína de 100 kDa corresponde a la flagelina polar, la de 40 kDa a la flagelina lateral y la de 37 kDa a la porina OmaA todas de *A. brasilense*. Con estos datos obtenidos se podrá iniciar con la generación de anticuerpos policlonales en contra de estas proteínas, dichos anticuerpos servirán para posteriores análisis de

***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en Azospirillum brasilense Sp7***

---

inmunofluorescencia que nos muestren la presencia y localización de estas en biopelículas con diferentes grados de maduración.

## **2 INTRODUCCIÓN**

### **2.1 Género *Azospirillum***

El género *Azospirillum* (subclase  $\alpha$  de las proteobacterias) es altamente resistente a variaciones climáticas y ha sido ampliamente estudiado desde el punto de vista agrícola, ecológico y fisiológico, dado que pertenece al grupo de bacterias llamada PGPR (Rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta). Las bacterias PGPR promueven el crecimiento de los cultivos ayudando directamente al crecimiento e indirectamente suprimen a posibles patógenos para la planta (Chris *et al.*, 1993; Barahona *et al.* 2010). Entre los géneros de PGPR se encuentran los géneros *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Azoarcus*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Serratia* y *Azospirillum*, siendo a este último uno de los más estudiados. El efecto benéfico que aporta *Azospirillum* a los cultivos como cereales y gramíneas en regiones climáticas tropicales, subtropicales y templadas (Rivera, 2008) se debe a que es capaz de establecer una interacción mutualista bacteria-planta mediante mecanismos como: a) la secreción de sideróforos y fitohormonas (ácido indolacético, auxinas, giberelinas y citoquininas), lo cual ayuda al rendimiento de la planta, mejorando el crecimiento de la raíz y consecuentemente incrementar la tasa de absorción de agua y minerales, así como también un incremento en el rendimiento de semillas y biomasa (Cardenas *et al.*, 2010).; b) la capacidad de fijar nitrógeno ya que puede utilizar amonio, nitrato, nitrito, aminoácidos y nitrógeno molecular como fuente de nitrógeno (Steenhoudt y Vanderleyden 2000; Cardenas *et al.*, 2010) y c) la producción de nitritos que potencian la adquisición de minerales. Estas son las causas por las que se le atribuye a *Azospirillum* un incremento en la producción de cultivos de 5-30% (Bashan *et al.*, 2004). La asociación de *Azospirillum* a las raíces de las plantas inducen incrementos en porcentaje y tasa de germinación; aumentos en la altura, peso fresco total, longitud radicular, mayor número de pelos, raíces adventicias y secundarias; incrementos en área foliar, repercutiendo en mayores índices de fotosíntesis y consiguiente mayor producción; incrementos en floración,

## **Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en *Azospirillum brasilense* Sp7**

espigamiento y amarre de fruto; y aumento en niveles de nitrógeno, expresados en proteína en el follaje y grano (Rueda *et al.*, 2009). Para que estos efectos se presenten, son importantes las concentraciones de *Azospirillum* empleadas para la inoculación sobre la planta, debido a que concentraciones muy bajas tienen como resultado la ausencia de los beneficios de crecimiento, mientras que a concentraciones muy altas se puede observar un crecimiento inferior al normal. (Castañeda *et al.*, 2013).

Las bacterias de este género son gram-negativas; de forma bacilar con un diámetro de 1,0  $\mu\text{m}$  x 2,1-3,8  $\mu\text{m}$  que tienden a concentrarse en sitios laterales de emergencia de la cápsula de la raíz, pelos radiculares y punta de la raíz (Camelo *et al.*, 2011; Croes *et al.*, 1993); crecen en condiciones bajas de oxígeno y pH entre 6.8 a 7 (Rivera, 2008). (Figura 1)



Figura 1. Morfología celular de *Azospirillum brasilense*. (Rivera, 2008)

*Azospirillum* contiene cantidades elevadas de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), hasta 50% del peso seco celular que le permite tener una fuente de energía y carbono en periodos de inanición, además de conferir una mayor resistencia a la planta contra desecación, luz ultravioleta y choque osmótico (Steenhoudt y Vanderleyden 2000; Cholula, 2005)

## **Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en *Azospirillum brasilense* Sp7**

Una de las características fenotípicas más ampliamente usada como criterio para el reconocimiento tentativo del género *Azospirillum* sp., es el color rojo escarlata que toman las colonias al crecer en un medio adicionado del colorante rojo Congo (Rodríguez Cáceres, 1982).

Actualmente este género *Azospirillum* comprende varias especies conocidas, entre ellas están, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. doebereineriae*, *A. canadense*, *A. brasilense* etc. siendo esta última la especie más utilizada para estudiar la asociación bacteria-planta

### **2.2 Colonización por *Azospirillum brasilense***

Esta bacteria busca un ambiente adecuado para realizar su colonización a la planta por medio de la quimiotaxis, un fenómeno donde hay una búsqueda de concentraciones adecuadas de sustancias químicas que sirven como nutrientes y le permite alejarse de inhibidores y toxinas. La aerotaxis le permite buscar una concentración adecuada de Oxígeno que le permite tener un metabolismo óptimo (Barak *et al* 1982; Zhulinet *al* 1996). Esto le permite acercarse a las raíces de la planta, junto con los exudados radiculares que pueden ser utilizados como una fuente de carbono y energía para beneficio de la bacteria (Bible *et al.*, 2012)

Cuando *Azospirillum* encuentra a la planta, esta prosigue a colonizar las raíces (Figura 2) en dos pasos: adsorción y anclaje. Donde en el primer paso la bacteria se une a la raíz de forma reversible, lo cual dura dos horas para que dentro de 8 horas *Azospirillum* comience a unirse con más fuerza a la raíz y posteriormente de la hora 16 esta unión se volverá irreversible. La adsorción se debe a la interacción de adhesinas y al flagelo polar, que es una proteína de la superficie bacteriana (Levanony y Bashan, 1991; Michiels *et al.*, 1991), mientras que el de anclaje se debe a la interacción de polisacáridos (Camelo *et al.*, 2011). Una buena unión entre la bacteria y la planta es necesaria por tres razones: Si la bacteria no se une a las paredes de la planta, las sustancias excretadas por la bacteria se esparcirán en la rizosfera y serán consumidas por otros microorganismos. Sin una buena unión, las células pueden ser desplazadas por el agua, alejándolas de la rizosfera

## **Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en *Azospirillum brasilense* Sp7**

y perecer por falta de nutrientes y al no tener una asociación fuerte con la planta, la bacteria queda vulnerable ante otros competidores (Bashan *et al.*, 2004). Debido a estos problemas es importante que se lleve a cabo la adhesión, anclaje y posterior formación de la biopelícula, con lo cual podrá establecerse una interacción mutualista exitosa entre bacteria-planta.

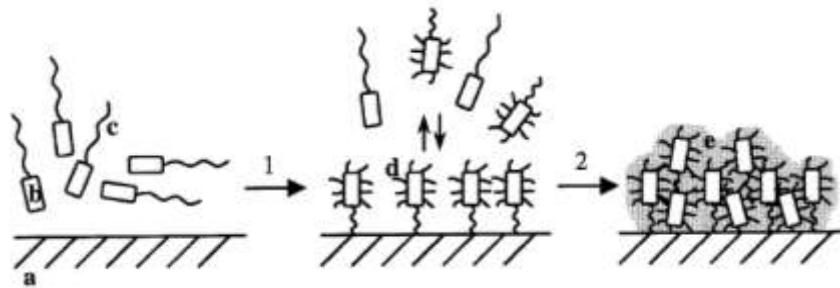


Figura 2. **Proceso de unión entre *Azospirillum brasilense* y la planta.** Paso 1 representa la adsorción reversible por la flagelina del flagelo polar. Paso 2 representa el anclaje irreversible donde los exopolisacáridos juegan un rol importante. Superficie de la planta (a), células de *A. brasilense* (b), flagelo polar (c), flagelo lateral (d) y exopolisacáridos (e). (Steenhoudt y Vanderleyden 2000).

### **2.3 Biopelícula**

La biopelícula consiste en la formación de un revestimiento bacteriano que puede estar conformada por una o varias especies, las bacterias se encuentran como comunidades sésiles irreversiblemente unidas a una superficie del ambiente, ya sea biótico o abiótico. En esta biopelícula las bacterias están unidas entre sí y al sustrato por una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (SPE), estas sustancias son secretadas por las células de la biopelícula a lo largo de su desarrollo (Ramey *et al.*, 2004). En la interacción mutualista entre bacteria y planta, la rizosfera presenta un ambiente idóneo para la formación de la biopelícula ya que hay presencia de humedad y nutrientes. Cuando la bacteria se une a la superficie de la planta, genera esta estructura que le sirve de protección ante otras bacterias competidoras (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007). La biopelícula es una estructura utilizada por un gran número de bacterias porque les confiere beneficios como estabilidad, resistencia a antibióticos y comunicación celular,

## **Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en *Azospirillum brasilense* Sp7**

permitiéndole tener una mayor probabilidad de colonizar y fijarse exitosamente a la planta.

Anteriormente se ha demostrado, que existe una expresión genética diferencial entre los microorganismos que forman la biopelícula y los microorganismos plantónicos que se encuentran suspendidos libremente en el medio (Donlan, 2002). El cambio de vida planctónico a sésil está definido por el segundo mensajero Ácido di (3´-5´) guanosin monofosfato (di-GMPc), cuando la concentración intracelular de este segundo mensajero incrementa se da el estilo de vida sésil, formación de biopelícula y expresión de componentes de la matriz extracelular. Mientras que, cuando el di-GMPc disminuye se da el estilo de vida planctónico. El nivel de concentración del di-GMPc está regulado enzimáticamente por la diguanilato ciclasa (DGCs), que es una proteína con el dominio GGDEF y por las fosfodiesterasas con cualquiera de los dominios EAL o HD-GYP (Xiqui *et al.*, 2003; Tamayo *et al.* 2005; Ryan *et al.*, 2006; Barahona *et al.* 2010).

La formación de la biopelícula depende de las condiciones de su ambiente como: la superficie a la que se va adherir (hidrofobicidad), el medio en el que se encuentra (pH, temperatura, nutrientes) y las propiedades de la célula (hidrofobicidad de la superficie, SPE y presencia de flagelos o fimbrias) (Donlan, 2002)

Es necesario conocer ampliamente la estructura y desarrollo de la biopelícula debido a la gran importancia que tiene en aspectos benéficos y perjudiciales a nivel clínico, por el papel que desempeña en enfermedades infecciosas; nivel industrial, por presencia de contaminación bacteriana en alimentos y en la tubería que transporta agua potable (Donlan, 2002); y nivel natural, ya que las PGPR suponen un gran potencial al utilizarlas para mejorar el rendimiento de cultivos de importancia económica.

## **2.4 Desarrollo de la biopelícula**

El desarrollo de la biopelícula consta de 5 etapas esenciales: 1) unión inicial donde participan proteínas de superficie (adhesinas), flagelos, fimbrias de tipo I, IV y Tad, permitiendo a las células unirse al sustrato 2) formación de una monocapa de células, una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia y secretando exopolisacáridos, 3) migración para formar colonias en multicapa, desarrollando una forma parecida a un hongo 4) producción de la matriz extracelular y síntesis de los EPS (exopolisacáridos) para generar una estructura dinámica con canales en su interior que permiten el flujo de nutrientes 5) maduración de la biopelícula y dispersión de las células, rompiéndose la matriz conformada por los SPE para la formación de una nueva biopelícula (Figura 3) (Maric y Vranes 2007; Wei y Ma 2013).

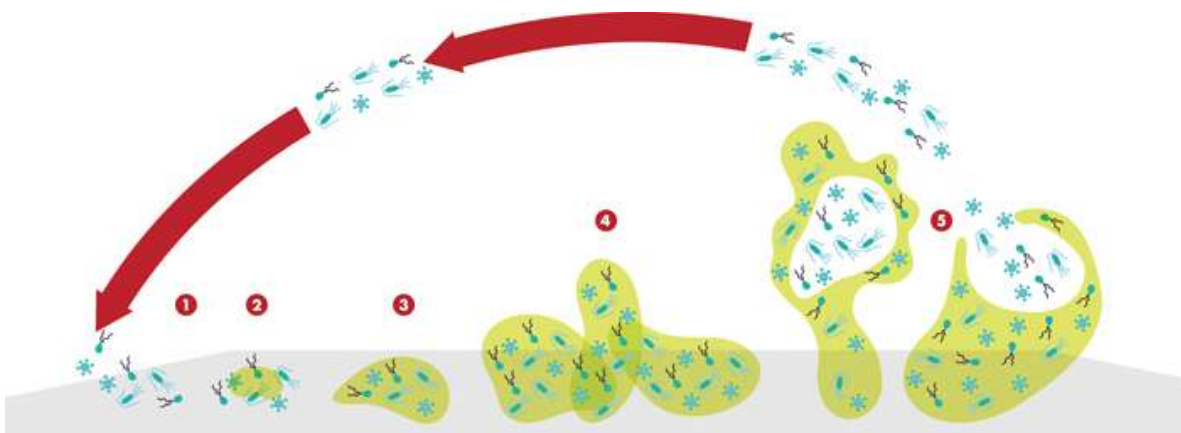


Figura 3. Formación de la biopelícula. 1.- unión de las bacterias a la superficie de la planta. 2.- formación de monocapas. 3.- formación de multicapas. 4.- formación de estructuras tridimensionales y 5.- posterior maduración de la biopelícula y dispersión de células hijas. (Maric and Vranes 2007).

## **2.5 Componentes de la biopelícula**

En muchos casos los microorganismos equivalen el 10% de la masa seca de la biopelícula, mientras que la matriz compone el otro 90%. La matriz de la

## ***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en *Azospirillum brasilense* Sp7***

---

biopelícula está conformada principalmente por las SPE, estas últimas están compuestas por polisacáridos, ácidos nucleicos extracelulares, lípidos y proteínas. Las funciones que tienen cada uno de las SPE son específicas para el mantenimiento y dispersión de la biopelícula, así como también la unión de las bacterias al sustrato y la formación de la matriz que da estabilidad a la estructura hasta la retención de enzimas extracelulares

Los polisacáridos están implicados en factores como la adherencia de bacteria-sustrato y bacteria-bacteria; la formación de la matriz que le da soporte y forma a la biopelícula; protección contra agentes antimicrobianos como desinfectantes y antibióticos; acumulan, retienen y estabilizan enzimas.

El ADN presente en la biopelícula comparte funciones como la adhesión, formación de la matriz y transferencia horizontal de material genético entre las células de la biopelícula.

Las funciones que pueden desempeñar las proteínas en la biopelícula son variadas, debido a la presencia de distintos tipos de proteínas que se pueden encontrar como por ejemplo: proteínas extracelulares, proteínas de superficie bacteriana, etc. Entre las proteínas extracelulares se encuentran enzimas, cuya función en la biopelícula consiste en la degradación de celulosa, lípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos y otras proteínas con lo cual genera un sistema digestivo externo que secuestra y disuelve nutrientes que serán utilizados como fuente de energía, las enzimas también están implicadas en la etapa de dispersión de células para colonizar un nuevo lugar, en respuesta de variaciones ambientales como la falta de nutrientes, lo cual hace que sean secretadas nuevas enzimas y permitan la liberación de las células de la biopelícula. Otras proteínas extracelulares son las lectinas, las cuales se unen con los carbohidratos y ayudan en la estabilización de la matriz. En el caso de las proteínas de superficie bacteriana están implicadas en la formación y la estabilidad de la matriz (Flemming and Wingender, 2010). (Tabla 1).

***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en *Azospirillum brasilense* Sp7***

<b>Función</b>	<b>Relevancia para la biopelícula</b>	<b>SPE implicadas</b>
Adhesión	Permite el paso inicial de colonización al sustrato por la célula planctónica	Polisacáridos, proteínas y DNA
Agregación de células	Unión entre las células inmovilizándolas	Polisacáridos, proteínas y DNA
Cohesión de la biopelícula	Formación de la matriz de la biopelícula, mediando la estabilidad, determinación de la arquitectura y permitiendo la comunicación célula-célula.	Polisacáridos, proteínas y DNA
Retención de agua	Mantenimiento de microambiente hidratado alrededor de las células dando tolerancia a desecación.	Polisacáridos hidrofóbicos y proteínas.
Barrera protectora	Confiere resistencia contra hospederos, agentes antimicrobianos,	Polisacáridos y proteínas.
Sorción de componentes orgánicos.	Permite la acumulación de nutrientes del ambiente.	Polisacáridos hidrofóbicos y proteínas.
Sorción de iones inorgánicos.	Promueve la formación del gel de polisacáridos, intercambio de iones, formación de minerales y acumulación de iones metálicos tóxicos.	Polisacáridos y proteínas,
Actividad enzimática	Permite la digestión de macromoléculas externas para adquirir nutrientes y degradación de la matriz para la liberación de las células.	Proteínas.
Fuente de nutrientes	Actúa como fuente de Carbono, Nitrógeno y Fosforo	Potencialmente todos los EPS
Intercambio de información genética.	Facilita la transferencia horizontal de genes entre células de la biopelícula.	DNA
Donador y aceptador de electrones	Permite que se lleve a cabo la actividad redox en la biopelícula.	Proteínas
Almacenaje de exceso de energía.	Acumula exceso de Carbono	Polisacárido.
Unión de enzimas	Resulta en la acumulación, retención y estabilización de enzimas a través de su interacción con polisacáridos.	Polisacárido y enzimas.

Tabla.1 Función de las Sustancias poliméricas extracelulares (SPE) en la matriz de la biopelícula (Flemming and Wingender, 2010).

### **3 ANTECEDENTES.**

Estudios ultraestructurales han mostrado que la presencia de las SPE en las biopelículas favorece si bien la formación de una estructura ampliamente utilizada por varios microorganismos como una estrategia para tener mayor resistencia y asegurar su unión sobre un sustrato que le beneficie. La forma de la biopelícula y el tipo de SPE presentes (ADN extracelular, exopolisacaridos y proteínas) varía con respecto a proporción e importancia para cada microorganismo aunque tengan funciones similares.

Allesen-Holm y colaboradores describen el ADN extracelular (Allesen-Holm *et al.*, 2006) con características parecidas a una adhesina cuya presencia en la matriz de la biopelícula en *Pseudomonas aeruginosa* es de vital importancia para la formación de esta estructura. La forma de hongo que se presenta en la biopelícula de esta bacteria se debe a la gran cantidad de DNA extracelular que se une al pili IV de *Pseudomonas aeruginosa*. Estos datos fueron comprobados haciendo ensayos de formación de biopelícula con DNAasa I (Whitchurch *et al.*, 2012), lo que a su vez demostró que esta macromolécula está implicada en el paso de unión entre *Pseudomonas aeruginosa* y su sustrato.

Los trabajos realizados por Branda y colaboradores mencionan que los exopolisacaridos y la proteína TasA (proteína de superficie bacteriana) están presentes en la estructura de la matriz de la biopelícula de *Bacillus subtilis*. Ambas macromoléculas están implicadas en la unión de la matriz de la biopelícula y presentan también actividad antibacteriana. Esto lo demuestran por medio de observaciones en un microscopio electrónico, comparando la cepa silvestre junto con mutantes donde no expresaban la proteína TasA y/o los exopolisacaridos, llevando a cabo mutaciones por delección del gen *tasa* y del gen *eps* respectivamente. Las mutantes presentaban una biopelícula disgregada en comparación de la cepa silvestre

## **Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en *Azospirillum brasilense* Sp7**

Por último se ha visto que las proteínas cumplen con varias funciones como: enzimas, aportan resistencia, mantienen la estructura de la matriz de la biopelícula, unen a las células entre si, etc. Por ejemplo en el trabajo de Cucarella y colaboradores 2001 demostraron que la proteína de superficie Bap que expresa *Staphylococcus aureus* está implicada en la adherencia bacteria-sustrato, así como también en la agregación célula-célula durante la formación de la biopelícula.

Serra y colaboradores en el 2013 observaron el rol que desempeña el flagelo en la biopelícula de *E. coli* por medio de vistas en el microscopio electrónico de barrido, comparando las 3 cepas de *E. coli*: 1) La cepa silvestre, 2) una mutante que no expresa flagelos al hacer una delección en el gen *fliCy* 3) una mutante sin movilidad, donde solo se afecta al rotor flagelar, por medio de una delección en el gen *motA*. Se observó que la biopelícula de la mutante sin flagelos estaba disgregada en comparación a la de las otras dos cepas, demostrando que el flagelo mantiene unida la matriz de la biopelícula en *E. coli*.

### **4 ANTECEDENTES DIRECTOS**

Se ha observado el crecimiento de la biopelícula de *Azospirillum brasilense* en sustratos bióticos (Guerrero-Molina *et al.*, 2011) y abióticos (Arruebarrena *et al.*, 2012; Palacios Castañeda F., 2014) (Figura 4). Donde se puede observar la misma red fibrilar que en *E coli* y *Bacillus subtilis*. En base a esto en el laboratorio de la Interacción Bacteria-Planta del CICM (Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas) observó la presencia del ADN exógeno y la función que desempeña en la biopelícula por medio de microscopia de epifluorescencia. Utilizando los marcadores fluorescentes DAPI y GFP (Palacios Castañeda F., 2014). Se demostró que la importancia del ADN exógeno en mantener unida a la matriz de la biopelícula, al agregar 1 U de enzima DNAasa I a la biopelícula de *Azospirillum brasilense* Sp 7 con un crecimiento de 7 días. Se obtuvo una biopelícula disgregada en comparación al ensayo sin DNAasa I.

***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en Azospirillum brasilense Sp7***

A



B

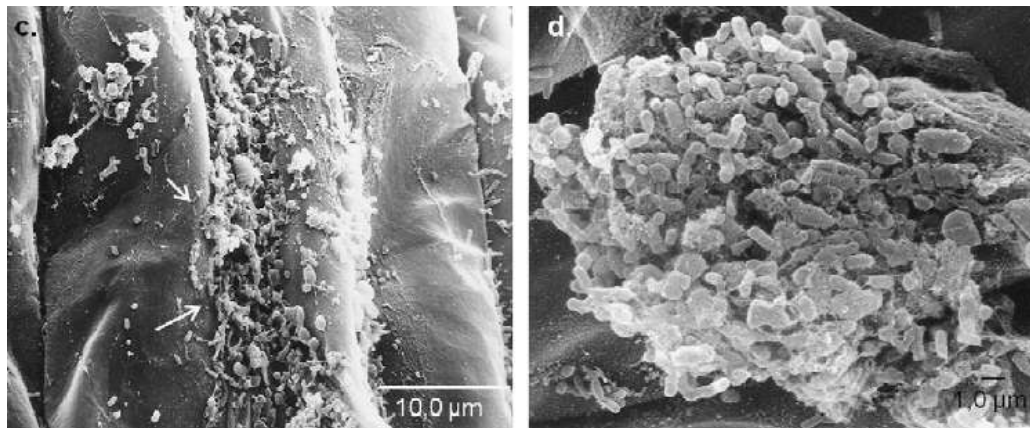


Figura 4. . Microscopia electrónica de barrido de *Azospirillum brasilense* e en condiciones bióticas y abióticas. Crecimiento en condiciones abióticas (vidrio) tomado de Arruebarrena et al., 2012 (A). Crecimiento en fresa (condiciones bióticas) tomado de Guerrero-Molina et al., 2011 (B).

## **5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Aunque existen evidencias de que el ADN extracelular es una pieza fundamental para el mantenimiento de la matriz de la biopelícula no es posible asegurar que esta macromolécula sea la que se encuentre en mayor proporción, generando los filamentos observados en *Azospirillum brasilense* cuando forma biopelículas en sustratos bióticos o abióticos debido a que estos pudieran ser también exopolisacáridos o proteínas.

Como un primer acercamiento, el objetivo del presente trabajo fue el de estandarizar una metodología, la cual nos permita obtener e identificar proteínas de superficie bacteriana en *Azospirillum brasilense* para hacer posteriores análisis de inmunodetección sobre biopelícula de *Azospirillum brasilense*. Esto nos permitirá observar si los filamentos observados son de naturaleza proteica y más específicamente si son proteínas de superficie bacteria. Ya que se ha visto en otros microorganismos como *E coli*. que éstas son las responsables de formar los filamentos, actuando como adhesinas y uniendo a las células dentro de la biopelícula.

## **6 JUSTIFICACION**

La biopelícula representa una estrategia fundamental de los microorganismos que la utilizan, otorgando protección ante el ambiente. Siendo *Azospirillum brasilense* una PGPR cuyos beneficios hacia los cultivos se presentan solo cuando esta coloniza y posteriormente forma la biopelícula en la planta de forma exitosa, es fundamental conocer ampliamente el desarrollo de la biopelícula. Aunque se conoce bien el proceso de la formación de biopelícula en bacterias como *E. coli* con respecto a la función que desempeñan las SPE a lo largo de la formación y maduración de esta estructura, poco se sabe el papel que desempeñan estas macromoléculas en la biopelícula de *Azospirillum brasilense*. Por este motivo como primer acercamiento se busca estandarizar un método el cual nos permita obtener las proteínas de superficie bacteriana de *Azospirillum brasilense* para posteriores análisis de inmunodetección en la biopelícula

## **7 HIPOTESIS**

Las proteínas de superficie bacteriana presentes en *Azospirillum brasilense* participan en la formación de la biopelícula.

## **8 OBJETIVO GENERAL**

Obtener e identificar proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelícula de *Azospirillum brasilense* sp7.

### **8.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Estandarizar un método de obtención de proteínas de superficie bacteriana en *Azospirillum brasilense* Sp7
- 2.- Identificación de proteínas de superficie bacteriana por MALDI/TOF

## ***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en Azospirillum brasilense Sp7***

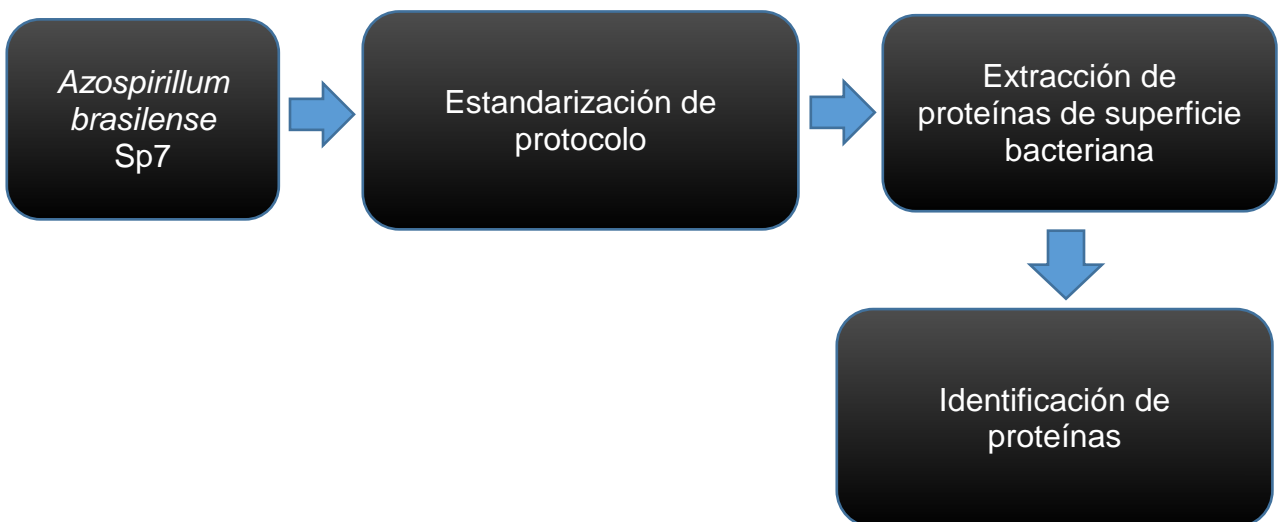
### **9 MATERIAL Y METODOS**

El material biológico que se utilizó fue la cepa silvestre *Azospirillum brasilense* Sp7 (Tabla 2.)

<b>Cepa</b>	<b>Características</b>	<b>Referencia</b>
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	Cepa silvestre ATCC29154	Tarrand <i>et al.</i> , 1978

**Tabla 2.-** Cepa bacteriana empleada en este estudio

#### **Esquema de trabajo**



#### **9.1 Extracción de proteínas de superficie bacteriana**

Se cultivó la cepa *Azospirillum brasilense* Sp7 en medio K-malato en agitación constante por 18 horas a 30 grados centígrados. De éste cultivo se inocularon 500 µl en 2 placas de Petri de vidrio (18.5 cm de diámetro) con 150 ml de medio LB enriquecido en con 0.7% agar y se dejaron crecer por 48 horas a 30°C. Se colectaron las células y se resuspendieron en 10ml de amortiguador 10mM Tris/HCl pH 8.0 para cada placa. Las células fueron colectadas por centrifugación a 8,000 rpm por 5 minutos (centrifuga BECKAM, modelo J2-21), recuperando el pellet en 10 ml del mismo amortiguador para posteriormente agitar con un vortex (vortex genie-2 g560) a máxima potencia por 2 periodos de 5 minutos y posterior

## ***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en Azospirillum brasilense Sp7***

---

centrifugación a 8,000 rpm por 5 minutos. Se tomó el sobrenadante y se agregó 0.1 mM de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo). Después se juntaron las 2 muestras y se centrifugaron a 25,000 rpm por 1:30 horas (centrifuga BECKAM, modelo L8-60) para resuspender la pastilla en 1 ml de amortiguador 10mM Tris/HCl pH 8.0

### **9.2 Extracción de proteínas superficie a diferentes tiempos de acción mecánica.**

Para comprobar que el tiempo de agitación en vortex fuera el adecuado para la obtención de proteínas de superficie bacteriana se realizaron extracciones de proteínas con la técnica ya estandarizada, donde se cambió el tiempo de acción mecánica utilizado 40 segundos, 5 minutos, 10 minutos, 25 minutos y 40 minutos. Posteriormente se llevó a cabo una extracción adicional, donde se sustituyó el paso de la acción mecánica, y en cambio se lisaron las células hirviéndolas por 5 minutos (muestra control).

### **9.3 Unidades Formadoras de Colonia UFC**

Se realizó un ensayo de unidades formadoras de colonia para corroborar que no hubiera lisis. Utilizando la metodología estandarizada, se tomaron 3 alícuotas de 1 ml en diferentes etapas de la metodología. La alícuota 1 se tomó antes de la agitación a máxima potencia; la alícuota 2 se tomó después de los 10 minutos de agitación y después la muestra se llevó al vortex hasta llegar al tiempo de los 25 minutos para tomar la tercera alícuota. De estas alícuotas se hicieron diluciones con solución PBS y se inocularon en placas de rojo Congo con 1.5% de agar dejándose crecer por 48 horas. Las unidades formadoras de colonias de calcularon de la siguiente manera:

$$\text{UFC/ml} = (\text{promedio de colonias}) (10^{\text{dilución}}) (10^{\text{volumen de la gota}})$$

#### **9.4 Extracción de proteínas de superficie bacteriana en diferentes medios y tiempos para crecimiento bacteriano.**

Se llevaron a cabo extracciones de proteínas de superficie bacteriana con la técnica estandarizada, utilizando diferentes medios y distintos tiempos para el crecimiento bacteriano. Se realizaron ensayos de extracciones de proteínas de superficie para los medios LB enriquecido (medio rico) y medio NFb (medio mínimo). Ambos con agar al 0.7% y dejándose crecer en cámara húmeda a 30°C por 2 y 5 días para cada medio.

#### **9.5 Extracción de proteínas de superficie bacteriana en biopelícula de *Azospirillum*.**

La formación de biopelícula se realizó siguiendo la técnica cuantitativa de cristal violeta (Arruebarrena *et al.*, 2012) con modificaciones. La cepa se creció en medio K-malato en agitación a 30°C hasta obtener una densidad óptica (D.O.) a 540 nm de 1.1-1.4. Una vez que el cultivo alcanzó esta D.O. las bacterias se obtuvieron por centrifugación a 7500 rpm por 2 min. Las células se resuspendieron en el amortiguador de fosfatos (BF) 66mM para llegar a una D.O.=2.

Estos cultivos se diluyeron 1/100 en medio NFB fresco con una relación Carbono – Nitrógeno = 2 usando ácido málico a 27.6 mM como fuente de carbono y KNO<sub>3</sub> a 13.8 mM como fuente de nitrógeno. Se agregaron 30 ml en 8 placas de Petri para cada una. Se colocaron las placas en cámara húmeda a 30°C por 5 días para posteriormente llevar a cabo la extracción de proteínas de superficie bacteriana conforme a la técnica estandarizada.

#### **9.6 Comparación con la metodología utilizada para extraer flagelos de *Aeromonas*.**

Se cultivó la cepa *Azospirillum brasilense* Sp7 en medio K-malato en agitación por 18 horas a 30°C. De este precultivo, se inocularon 125 ml a 30 placas de medio LB enriquecido con 0.7% de agar, las cuales se dejaron crecer por 48 horas a 30°C. Posteriormente se recogió el crecimiento bacteriano de las 30 placas y se resuspendió en 50 ml de Buffer Tris-HCl 20mM pH 8.0. Los flagelos se separaron

## ***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en *Azospirillum brasilense* Sp7***

---

de la suspensión bacteriana por homogenización en hielo con una Batidora Braun durante 5 minutos. El homogenado se centrifugó a 10,000 rpm por 30 minutos a 4°C., se recuperó el sobrenadante y se filtró a través de una membrana de 0,2 µm de poro. La proteína filtrada se concentró por la adición de sulfato de amonio sólido a una concentración del 20%. La solución se mantuvo en agitación durante toda la noche a 4°C y el precipitado se recuperó mediante centrifugación a 20,000 rpm por 30 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en 1 ml de tampón Tris-HCl 20mM pH 8,0 y se dializó contra el mismo tampón para eliminar el exceso de sales.

### **9.7 Determinación de proteínas totales por el Método de Bradford**

Se llevó a cabo una curva estándar para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford, haciendo diferentes diluciones con albumina sérica bovina (1 µg/ml, 2.5 µg/ml, 5 µg/ml, 7.5 µg/ml, 10 µg/ml, 12.5 µg/ml, 15 µg/ml, 17.5 µg/ml, 20 µg/ml) a partir de un concentrado de 1 mg/ml. Una vez obtenidos los datos de la curva, se prosiguió a cuantificar las proteínas de la muestra por duplicado. En un microtubo se agregaron 15 µl del extracto de proteína con 785 µl de agua y 200 µl del reactivo de Bradford. Para el blanco se agregaron 10 µl de 10mM Tris/HCl pH 8 y .1 mM de PMSF, 790 µL de agua y 200 µL de reactivo de Bradford. Todas las muestras se leyeron a una absorbancia de 595 nm.

### **9.8 Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE**

Para poder observar el perfil proteico que se obtuvo después de cada ensayo, se llevaron a cabo geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) al 8% y 10% de acrilamida. Se tiñeron los geles con azul de Coomassie R-250 y se destiñeron con una solución de ácido acético 10% y metanol 50%.(Laemmli, 1979)

### **9.9 Secuenciación por espectrofotometría de masas (MALDI/TOF)**

Antes de mandar a secuenciar, todo el material y reactivos necesarios se esterilizaron, así como también se utilizó ácido sulfúrico para limpiar todo el material de vidrio. Las proteínas que se seleccionaron se obtuvieron cortando las

### ***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en *Azospirillum brasilense* Sp7***

---

bandas de los geles de poliacrilamida con un bisturí estéril y se guardaron en microtubos con 500 µl de solución para desteñir. Posteriormente se mandaron al Protein and Nucleic Acid Facility (PAN) en Stanford California donde se determinaron la identidad de las proteínas por medio de la técnica de espectrometría de masas MALDI/TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight). Donde primero digirieron a las proteínas con tripsina para después identificarlas por MALDI/TOF que es una técnica de ionización suave utilizada para determinar la masa intacta de biomolecular y polimeros. Se denomina MALDI por sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (desorción/ionización láser asistida por matriz) y TOF por el detector de iones que se acopla al MALDI y cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés Time-Of-Flight.

## **10 RESULTADOS**

### **10.1 Estandarización de un método para extraer proteínas de superficie bacteriana de *Azospirillum brasilense***

Para extraer las proteínas de superficie bacteriana de la cepa *Azospirillum brasilense* Sp7, se utilizó la técnica para extraer los flagelos laterales y polar reportado por (Camargo, 2005), con algunas modificaciones que nos permitieran obtener proteínas de superficie de la bacteria de una forma fácil y reproducible; sin lisar a la bacteria y evitar la contaminación con proteínas citoplasmáticas. Para tal efecto, se probaron tiempos de acción mecánica, medios de cultivo, tiempos de incubación y viabilidad bacteriana.

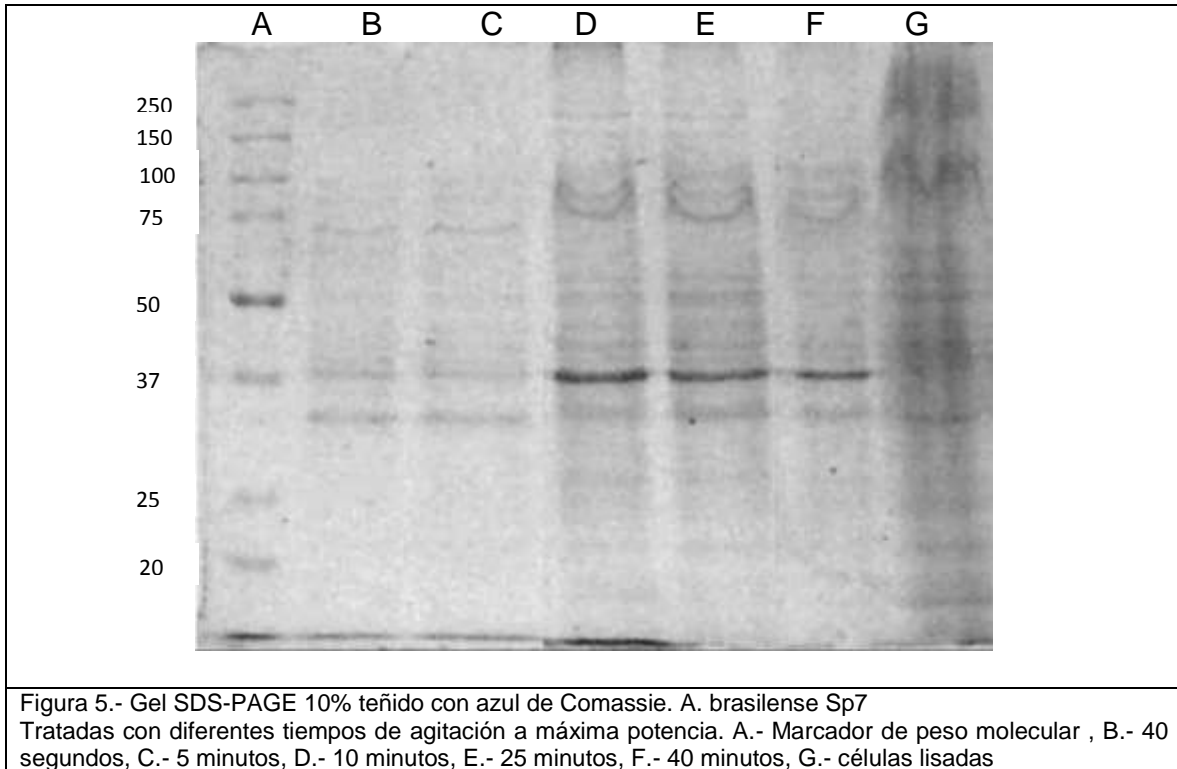
### **10.2 Tiempos de acción mecánica**

Con el objetivo de observar si la cantidad de proteínas de superficie variaba con respecto al tiempo de acción mecánica (agitación), se llevaron a cabo ensayos de extracción de proteínas de superficie bacteriana, utilizando distintos tiempos de agitación (40 segundos, 5 minutos, 10 minutos, 25 minutos y 40 minutos). Un extracto adicional de células lisadas se utilizó como blanco, para comparar el perfil proteico de proteínas totales con el perfil obtenido de proteínas de superficie de *Azospirillum*. Para analizar dichos perfiles, las muestras se corrieron en una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE al 10% (Figura 5).

Los datos encontrados, nos muestran que 10 minutos de agitación son suficientes para obtener una buena cantidad de proteínas de superficie bacteriana ya que el perfil proteico no cambia con respecto a los otros tiempos de acción mecánica (25 y 40 minutos respectivamente). En estos 3 tiempos de acción mecánica podemos observar la presencia de al menos 3 proteínas enriquecidas entre otras en menor proporción lo que sugiere que a través de este proceso podemos obtener proteínas de superficie bacteriana ya que al comparar estos perfiles con los patrones proteicos de bacterias lisadas no se observa un perfil similar que nos hable de lisis celular en los diferentes tiempos de agitación utilizados. Sin

## ***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en *Azospirillum brasilense* Sp7***

embargo, no podemos asegurar que estos tiempos de agitación no estén lisando a las bacterias por lo cual se llevó a cabo un ensayo de unidades formadoras de colonias para observar la viabilidad de las células.



### **10.3 Unidades Formadoras de Colonias**

Para comprobar que el tiempo seleccionado de agitación no causara lisis bacteriana, que contamine el extracto de proteínas de superficie con proteínas citoplasmáticas, se llevaron a cabo ensayos de Unidades Formadoras de Colonia (UFC). Para lo cual se realizó una extracción de proteínas de superficie bacteriana siguiendo el mismo protocolo. Se tomaron 3 alícuotas a lo largo del procedimiento. La alícuota 1 se tomó antes de iniciar la agitación; la alícuota 2 se tomó después de los 10 minutos de agitación y después la muestra se volvió a agitar hasta llegar al tiempo de 25 minutos para posteriormente tomar la tercera alícuota. Se determinó las unidades formadoras de colonias para cada alícuota (Tabla 3),

### ***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en *Azospirillum brasilense* Sp7***

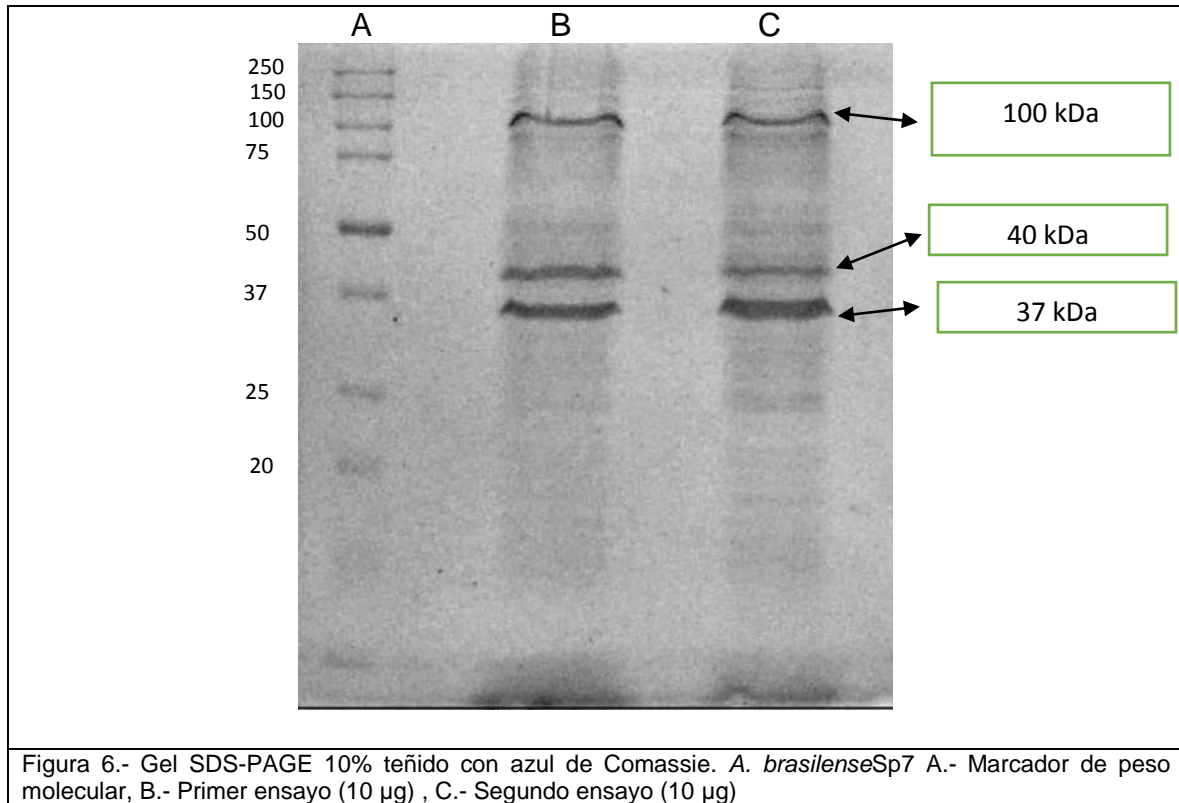
Los datos de UFC mostraron que tiempos mayores a 10 minutos de agitación, se obtiene un menor número de UFC, tal experimento demuestra que se disminuye la viabilidad de las bacterias, debido a que se pudiera estar debilitando la membrana celular y esta aumente el riesgo de lisis. Por lo tanto se decidió trabajar con 10 min de agitación ya que en este tiempo hay una menor disminución en el crecimiento celular en comparación con tiempos mayores de acción mecánica.

MUESTRA	UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC/ml)
Alícuota 1 (sin acción mecánica)	$4.9 \times 10^{15}$ UFC/ml
Alícuota 2 (10 minutos de acción mecánica)	$2.23 \times 10^{15}$ UFC/ml
Alícuota 3 (25 minutos de acción mecánica)	$4.935 \times 10^{11}$ UFC/ml

Tabla 3.- Unidades formadoras de colonias obtenidas por cada alícuota tomada en la extracción de proteínas.

Al comprobar que la técnica estandarizada podría extraer a las proteínas de superficie bacteriana de forma óptima y viable, se prosiguió a determinar la reproducibilidad de la metodología, haciendo 2 extracciones de proteína de superficie independientes. Se cuantificaron las proteínas totales de ambos extractos por el método de Bradford y se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10%. (Figura 6). En este análisis se pudo observar que se obtiene el mismo perfil de proteínas para cada una de las extracciones, lo que demuestra que es un método fácil y reproducible de obtener proteínas de superficie bacteriana. Un dato importante es que se obtienen 3 bandas de proteína, las cuales se encuentran enriquecidas. Estas proteínas presentan un peso molecular de 100, 40 y 37 kDa. El hallazgo de estas proteínas las sugiere como un blanco importante para identificarlas por espectrometría de masas ya que al obtenerse en mayor proporción podemos saber si son de superficie bacteriana conocer qué papel juegan en la formación y mantenimiento de biopelículas. Estas mismas también se expresan en otros medios de cultivo como por ejemplo NFB que sabemos es el medio en el cual *Azospirillum* forma biopelículas. Crecimos a la bacteria en medio NFB a diferentes tiempos y en condición de formación de biopelículas.

## ***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en Azospirillum brasilense Sp7***



### **10.4 Extracción de proteínas de superficie bacteriana en diferentes medios y tiempos de crecimiento bacteriano.**

Para corroborar que el tiempo de crecimiento y medios seleccionados fueron los adecuados para el crecimiento bacteriano para la obtención de proteínas de superficie bacteriana. Se utilizó la metodología estandarizada con distintos medios de cultivo. El medio LB enriquecido con 0.7% de agar (medio rico) y el medio NFb con 0.7% de agar (medio mínimo). Para cada medio se hicieron 2 ensayos, donde se creció la bacteria por distintos tiempos (2 y 5 días). Posteriormente se llevó a cabo la extracción de proteínas de superficie, se cuantificaron las proteínas totales por el método de Bradford y se corrieron las muestras en un gel de poliacrilamida al 10%. (Figura 7). Se observó que ni el cambio de medio, ni el uso de distintos tiempos para el crecimiento bacteriano, repercuten en la extracción de las proteínas de superficie ya que se observaron los mismos perfiles proteicos en el gel, en los cuales se observan en mayor proporción las mismas tres proteínas de 100, 40 y 37 kDa.

## ***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en *Azospirillum brasilense* Sp7***

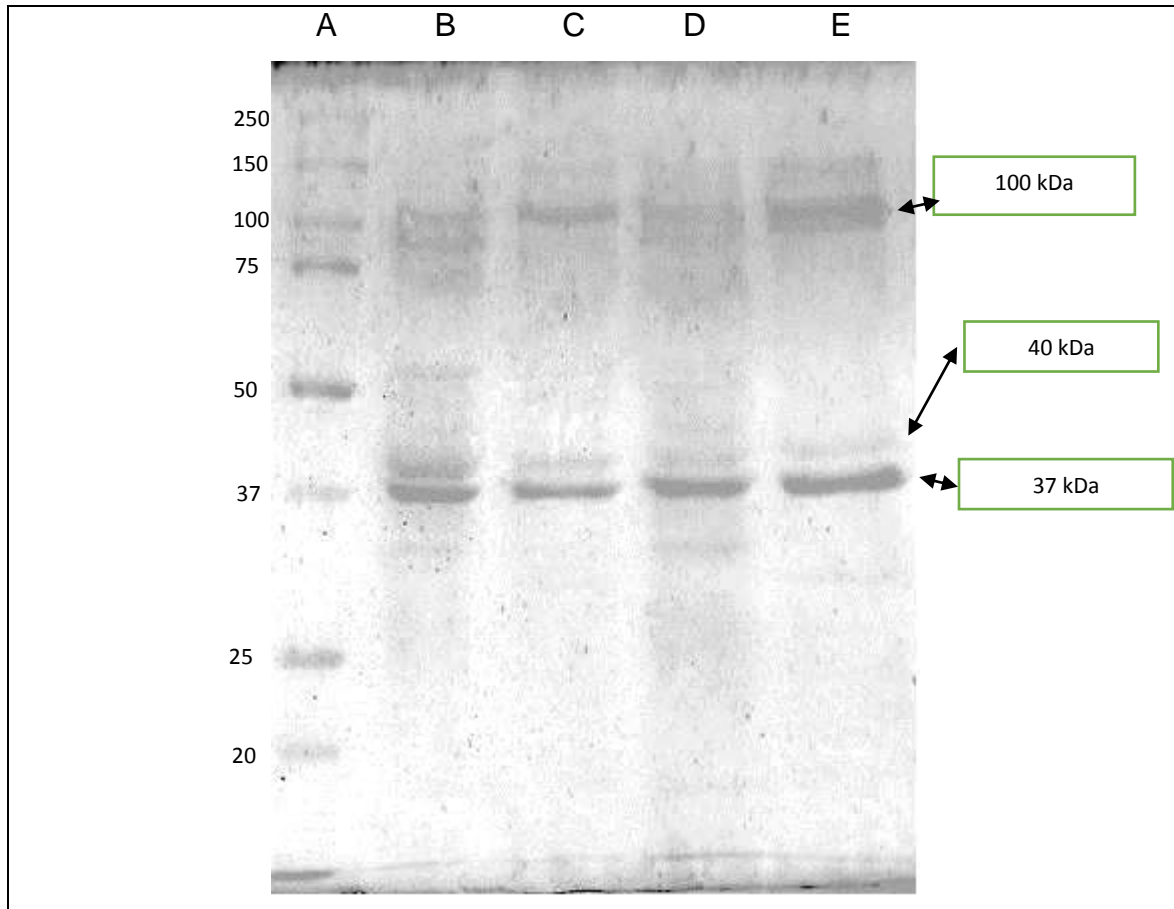


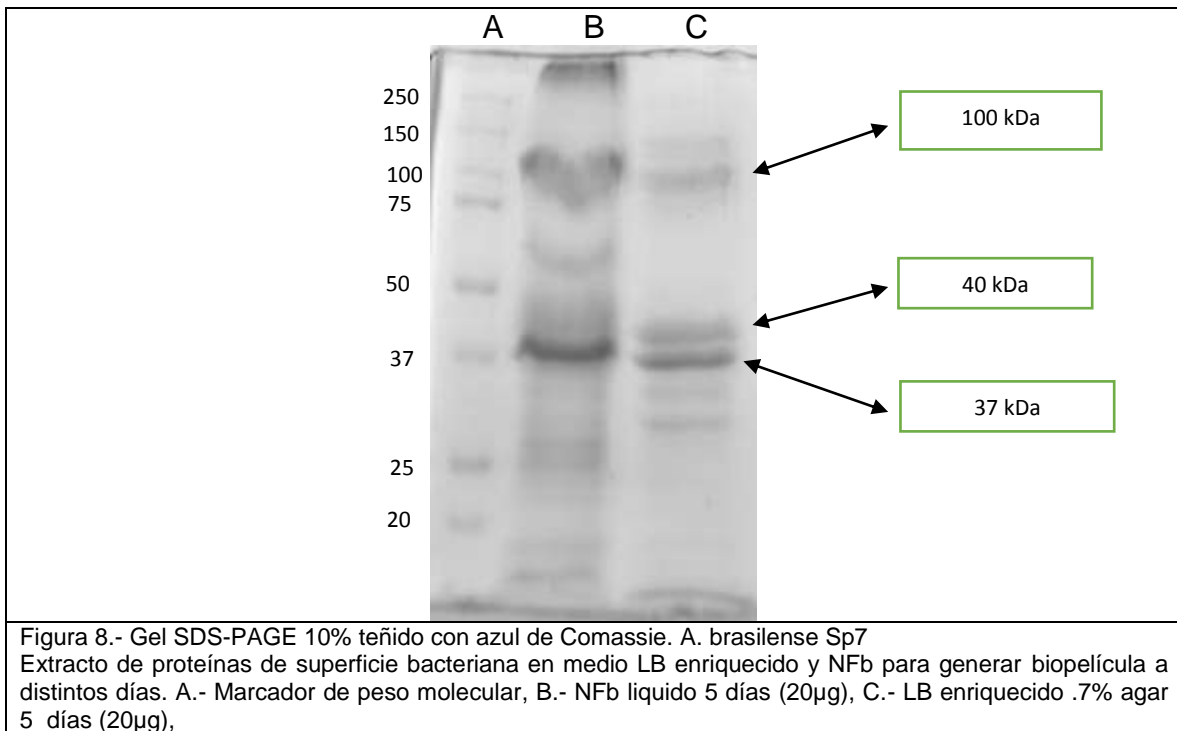
Figura 7.- Gel SDS-PAGE 10% teñido con azul de Coomassie. A. *brasilense* Sp7 Extracto de proteínas de superficie bacteriana en medio LB enriquecido y NFb para generar biopelícula a distintos días. A.- Marcador de peso molecular, B.- NFb 2 días (10µg), C.- LB enriquecido 2 días (10µg), D.- NFb 5 días (10µg), E.- LB enriquecido 5 días (10µg).

### **10.5 Extracción de proteínas de superficie bacteriana en biopelícula de *Azospirillum*.**

Para comprobar que las proteínas obtenidas por la técnica estandarizada también las expresa *Azospirillum* cuando genera la biopelícula, se hicieron extracciones de proteínas de superficie en condiciones de formación de biopelícula. La biopelícula se formó siguiendo la metodología descrita y utilizada en el laboratorio por Romero, 2012 y Palacios, 2014, dejándola incubar por 5 días, para después realizar la extracción de proteínas de superficie. A esta muestra se le cuantificó la cantidad de proteínas totales por el método de Bradford y se corrió en una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, junto con una extracción donde las

## ***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en *Azospirillum brasilense* Sp7***

bacterias se dejaron crecer por 5 días en medio LB enriquecido con 0.7% de agar (Figura 8).

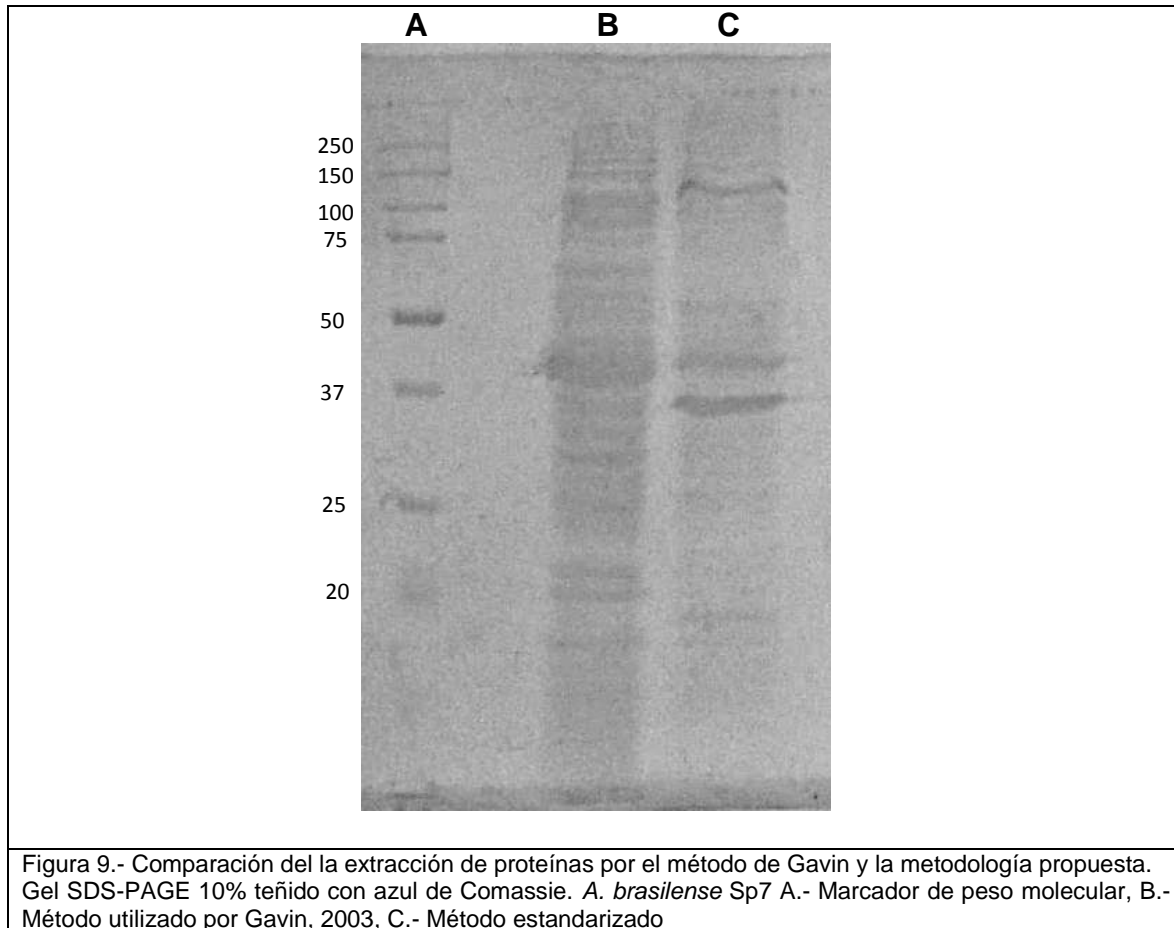


En el gel SDS-PAGE se puede ver que aunque el perfil proteico entre ambos extractos es diferente, todavía se presentan las mismas bandas (100, 40 y 37 kDa). Estos datos demuestran que estas tres proteínas se encuentran enriquecidas tanto en condiciones planctónicas como en formación de biopelícula por lo cual se cortaron del gel y se mandaron a analizar por espectrometría de masas (MALDI/TOF) con el objetivo de demostrar si son proteínas de superficie bacteriana. Por otro lado, en el perfil proteico obtenido en condiciones de biopelícula se observan otras bandas de proteína que podrían tener un papel en la formación de las biopelículas generadas por *Azospirillum*.

### **10.6 Comparación con la metodología utilizada para extraer flagelos de *Aeromonas***

Se comparó la metodología estandarizada con la técnica utilizada por Gavin 2003, empleada para la extracción de flagelos en *Aeromonas*. Para llevar a cabo esto, se realizaron ambas extracciones utilizando la cepa de *Azospirillum brasilense* Sp7. Posteriormente las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10% (Figura 9). En esta imagen se pueden observar perfiles proteicos diferentes para cada extracción, observándose mayor cantidad de proteínas en el extracto obtenido por la metodología de Gavin 2003. Sin embargo, no podemos determinar si todas estas proteínas obtenidas sean solo de superficie bacteriana para ello, habría que hacer ensayos de unidades formadoras de colonia para mostrar si no ocurrió lisis bacteriana y que sea por eso que se obtiene un número mayor de proteínas o de lo contrario esta sería otra técnica importante para la obtención de proteínas de superficie ya que se obtiene un número mayor y variado de proteínas. No continuamos con la estandarización de esta técnica debido a que esperábamos obtener flagelina un tanto más homogénea como la que se obtiene con la bacteria *Aeromona*. Esto lo podemos explicar debido a que son géneros bacterianos diferentes y que en el caso de *Azospirillum* esta se pudiera lisar con esta metodología motivo por el cual se obtiene gran cantidad de proteínas

## ***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en Azospirillum brasilense Sp7***



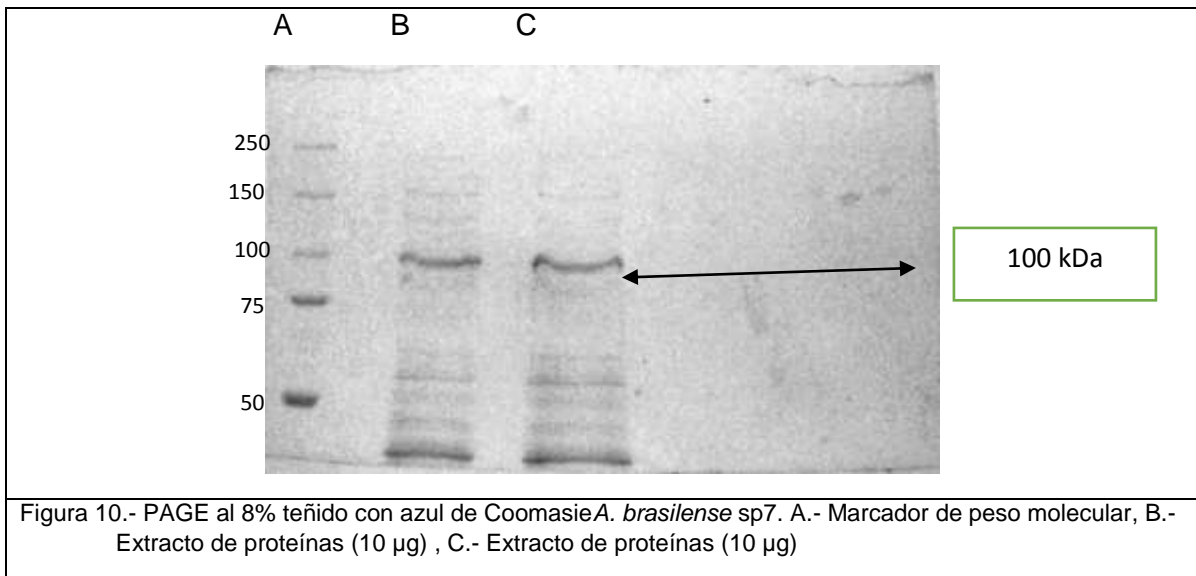
### **10.7 Secuenciación de proteínas de superficie por MALDI/TOF.**

Las proteínas de 100, 40, 37 kDa, obtenidas por medio de agitación mecánica con vortex y en amortiguador 10mM Tris/HCl pH 8.0 se mandaron al Protein and Nucleic Acid Facility (PAN) en Stanford, California para su secuenciación mediante espectrometría de masas MALDI/TOF.

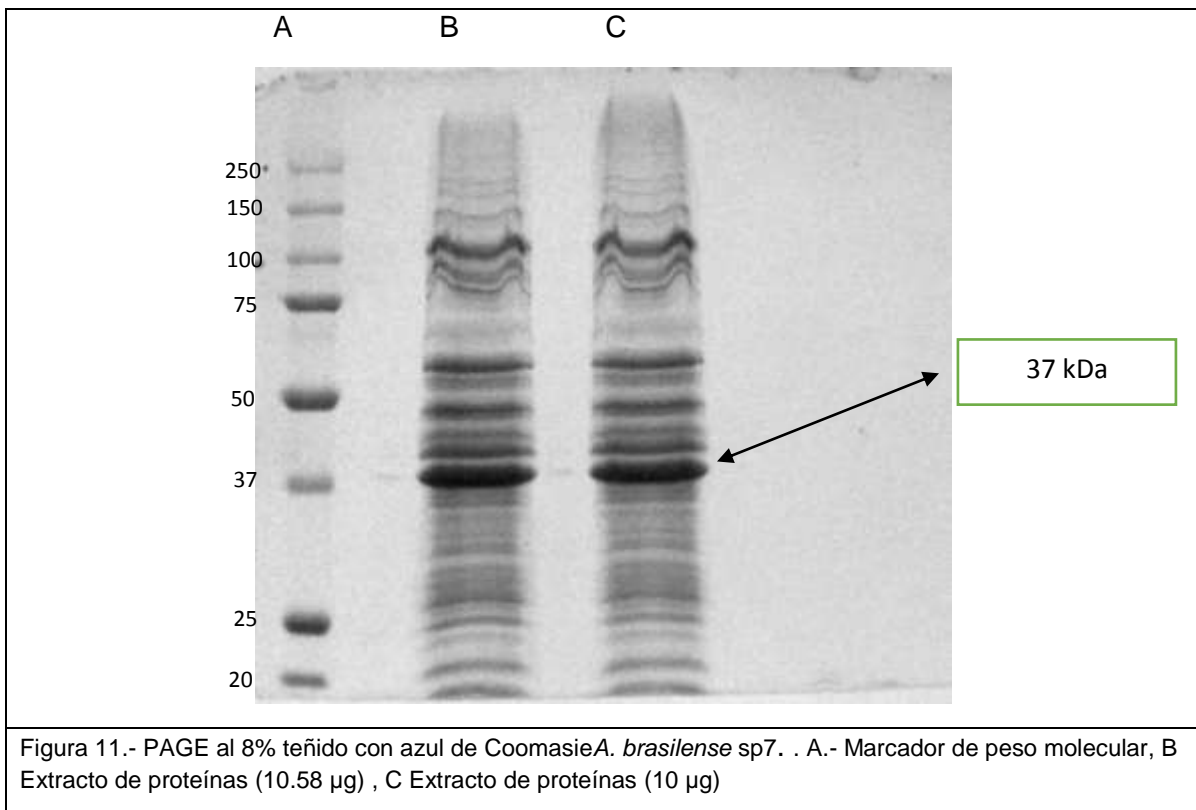
A partir de la electroforesis (PAGE-SDS) de proteínas se eligieron las bandas que presentaron una mayor cantidad de proteína en el gel de poliacrilamida (Figura 6). Se utilizaron soluciones estériles y preparadas en recipientes de vidrio, todo el material de vidrio se limpió con ácido sulfúrico así como los vidrios para hacer los geles de poliacrilamida SDS-PAGE. Esto con el objetivo de evitar la contaminación con queratinas que son las proteínas que principalmente contaminan a las muestras proteicas. Para la primera muestra (100 kDa) se corrió un gel SDS-PAGE al 8% (Figura 10) que se dejó correr por más tiempo para separar la

***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en Azospirillum brasilense Sp7***

muestra de otras proteínas que tuvieran un peso molecular muy cercano que complicara la identificación de la muestra.



La segunda muestra (37 kDa) se corrió en un gel SDS-PAGE al 10% (Figura 11)



***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en Azospirillum brasilense Sp7***

Posteriormente se volvió hacer en un gel SDS-PAGE al 10% con las mismas muestras pero dejando correr el gel por más tiempo, con esto se observaron otras muestras (40 kDa y 38 kDa), que también se mandaron a secuenciar. (Figura 12)

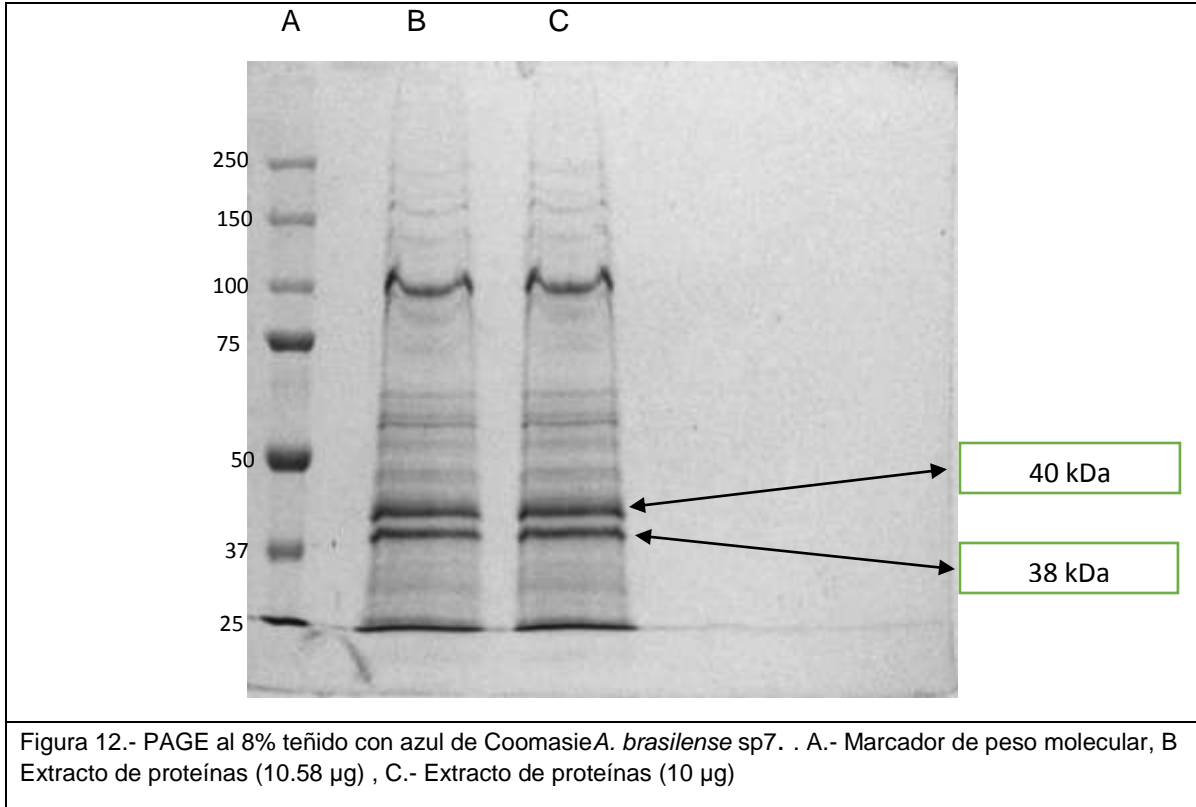


Figura 12.- PAGE al 8% teñido con azul de Coomasie *A. brasilense* sp7. . A.- Marcador de peso molecular, B Extracto de proteínas (10.58 µg) , C.- Extracto de proteínas (10 µg)

## ***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en *Azospirillum brasilense* Sp7***

Los resultados de la espectrometría de masas mostraron que todas las muestras que se mandaron a analizar son proteínas de *Azospirillum* sin presentar impurezas de algún tipo. La primera muestra (100 kDa) se identificó como una flagelina (Figura 13), la cual corresponde con el flagelo polar que expresa *Azospirillum*.



MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User : dw  
Email : dwinant@stanford.edu  
Search title : Project: User Project\Ken\2014\July, Spot Set: User Project\Ken\2014\July\20140712A, Label: B15,  
Database : NCBInr 20140323 (38032689 sequences; 13525028931 residues)  
Timestamp : 15 Jul 2014 at 20:15:17 GMT  
Protein hits : [gi|392378761](#) putative flagellin [*Azospirillum brasilense* Sp245]

Figura 13.-Resultado de la espectrometría de masas de la muestra “100 kDa”

La segunda muestra (40 kDa) se identificó como la flagelina que correspondería con el flagelo lateral que expresa *Azospirillum* en condiciones semisólidas (Figura 14).



MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User : dw  
Email : dwinant@stanford.edu  
Search title : Project: User Project\Ken\2014\July, Spot Set: User Project\Ken\2014\July\20140712A, Label: B14,  
Database : NCBInr 20140323 (38032689 sequences; 13525028931 residues)  
Timestamp : 15 Jul 2014 at 20:12:07 GMT  
Protein hits : [gi|1173510](#) flagellin Laf1 [*Azospirillum brasilense*]

Figura 14.-Resultado de la espectrometría de masas de la muestra “40kDa”

## ***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en *Azospirillum brasilense* Sp7***

La muestra (38 kDa) arrojó una correspondencia con 2 proteínas: La proteínas de superficie bacteriana OmaA y su precursor. (Figura 15)

### Mascot Search Results

```
User : dw
Email : dwinant@stanford.edu
Search title : Project: User Project\Ken\2014\July, Spot Set: User Project\Ken\2014\July\20140712A, Label: B13,
Database : NCBI nr 20140323 (38032689 sequences; 13525028931 residues)
Timestamp : 15 Jul 2014 at 20:08:54 GMT
Protein hits : gi|10798859 major outer membrane protein OmaA precursor [Azospirillum brasilense]
               gi|374998053 Major outer membrane protein OmaA [Azospirillum lipoferum 4B]
```

Figura 15.-Resultado de la espectrometría de masas de la muestra “38kDa”

Para la última muestra (37 kDa) se identificaron a la proteína de superficie bacteriana OmaA tanto como su precursor (Figura 16)

### Mascot Search Results

```
User : dw
Email : dwinant@stanford.edu
Search title : Project: User Project\Ken\2014\July, Spot Set: User Project\Ken\2014\July\20140712A, Label: B12,
Database : NCBI nr 20140323 (38032689 sequences; 13525028931 residues)
Timestamp : 15 Jul 2014 at 20:04:00 GMT
Protein hits : gi|10798859 major outer membrane protein OmaA precursor [Azospirillum brasilense]
               gi|374998053 Major outer membrane protein OmaA [Azospirillum lipoferum 4B]
```

Figura 16.-Resultado de la espectrometría de masas de la muestra “37kDa”

Estos datos demuestran que todas las proteínas identificadas corresponden a proteínas de superficie bacteriana de manera que la metodología de extracción empleada es eficiente para la obtención de este tipo de proteínas por lo cual en estudios posteriores se podrá enriquecer la muestra para identificar más proteínas de superficie bacteriana.

## **11 DISCUSION**

La formación de la biopelícula es una estrategia empleada por la mayoría de las bacterias, ya que les confiere una gran resistencia ante el medio y otros organismos contra los que compiten por colonizar al sustrato. Esta estructura la presentan tanto organismos que son beneficios como las PGPR hasta los que son perjudiciales, como los relacionados con áreas como la medicina (infecciones), la industria en general (biocorrosión, pérdida de rendimiento), la industria alimentaria (contaminación microbiana de alimentos), el biodeterioro de patrimonios culturales, entre otros. Es por esto que es importante conocer las macromoléculas que conforman esta estructura. Hoy en día hay estudios donde reportan que los exopolisacáridos, DNA exógeno, lípidos, fimbrias, proteínas de adherencia, pilus y proteínas de superficie bacteriana que biosintetiza la bacteria al estar en condiciones que le permitan formar la biopelícula, son las responsables en formar la matriz que une a las células unas con otras, además de dar forma y resistencia a la biopelículas. Aunque las funciones de estas macromoléculas son similares en las biopelícula de todas las bacterias, su presencia y cantidad varía con respecto al microorganismo. Por lo cual el objetivo de este trabajo fue en estandarizar una metodología que nos permitiera obtener las proteínas de superficie bacteriana de *Azospirillum brasilense* Sp7 presentes en la biopelícula, para posteriores análisis donde se estudiará la función que desempeñan estas proteínas a lo largo del desarrollo de la biopelícula de *Azospirillum*.

Con estos ensayos pudimos estandarizar una metodología viable, fácil y reproducible capaz de extraer proteínas de superficie bacteriana en base a los 10 minutos de agitación vigorosa, los cuales mostraron ser suficientes para desprender la mayoría de las proteínas que se encuentran en la superficie. Los resultados mostraron la presencia de 3 proteínas enriquecidas en la biopelícula se *Azospirillum brasilense* Sp7, las cuáles se mandaron a secuenciar por medio de espectrometría de masas MALDI/TOF para comprobar su identidad (Figura 6).

Para la muestra con 100 kDa se identificó el monómero de flagelina, el cual forma el flagelo polar en *Azospirillum brasilense* (Figura 13). Esta es una glicoproteína

## **Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en *Azospirillum brasilense* Sp7**

constitutiva con un diámetro de 18 nm. Expresada por el gen *fla* que le permite a la bacteria moverse en medios líquidos por el movimiento de nado. Aunque ya se ha demostrado la importancia del flagelo polar en el paso de adsorción donde *Azospirillum* coloniza a la planta adhiriéndose a la superficie que colonizará la bacteria (Croes *et al.*, 1993; Alexandre *et al.*, 1999; Steenhoudt y Vanderleyden 2000; Merino *et al.*, 2005), hasta la fecha se desconoce el papel que juega en el desarrollo de la biopelícula. Hoy en día hay propuestas que mencionan que los niveles intracelulares del segundo mensajero Acido di (3'- 5') guanosin monofosfato (di-GMPc) modulan el ensamblado de las proteínas que conforman la estructura del flagelo, o bien interfieren con la función del motor flagelar inmovilizando el flagelo. Al encontrarse una elevada poza de di-GMPc estimula la producción de funciones asociadas a la producción de la biopelícula y detiene la síntesis de los flagelos ya que resulta en un gasto de energía innecesario. También, puede detener el motor del flagelo impidiendo que se mueva, posiblemente para su uso como una adhesina que mantenga el entramado que le da soporte a la biopelícula. En base a esto, la segunda teoría concuerda con nuestros datos obtenidos, ya que como se puede observar en la figura 11, cuando se lleva a cabo la extracción de proteínas de superficie en la biopelícula de *Azospirillum*, se observa que la banda con el peso de 100 kDa (flagelo polar), se expresa en gran medida en comparación a lo que se esperaría si la formación de la biopelícula detuviera la síntesis de esta proteína. Aunque falta hacer ensayos de inmunodetección de esta proteína sobre la biopelícula de *Azospirillum brasilense* Sp7 sugerimos que el flagelo polar se sigue expresando en todas las etapas de la biopelícula y su función consiste en la de actuar como una adhesina que mantiene a las células unidas. Esto concuerda con Serra y colaboradores en el 2013 quienes demuestran que el flagelo de *E. coli* está implicado en mantener la estabilidad de a la matriz de la biopelícula.

La muestra con 40 kDa se identificó como el monómero de flagelina que conforma a los múltiples flagelos laterales presentes en *Azospirillum brasilense* (Figura 14). Estos flagelos son inducibles (solo se expresan en medios sólidos y semisólidos)

## **Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en *Azospirillum brasilense* Sp7**

cuyo tamaño, longitud de onda y diámetro son menores al flagelo polar. Son expresados por el gen *laf1* cuando la bacteria se encuentra en un medio viscoso. Estos flagelos le permiten a la bacteria moverse sobre un medio sólido o semisólido (swarming), para buscar medios favorables. Una vez que *Azospirillum* coloniza la superficie de la planta, los flagelos laterales le permiten moverse a lo largo de la superficie de la planta para expandirse a nuevas zonas. (Croes *et al.*, 1993; Moens *et al.*, 1995; Alexandre *et al.*, 1999; Steenhoudt y Vanderleyden 2000; Merino *et al.*, 2005). Aunque no se sabe si este flagelo tiene la misma función que el polar en lo que respecta a la unión entre la bacteria y la planta. Su presencia en el extracto nos sugiere que juega un papel en la biopelícula (Figura 11), posiblemente esté implicado en la formación de la matriz de la biopelícula, como se sugirió para el flagelo polar.

La proteína OmaA que se identificó en la muestra con 37 kDa se ha reportado como una porina (Figura 15 y 16) importante para la adhesión de *Azospirillum* en cereales y que representa el 60% de las proteínas que se encuentran en la superficie bacteriana (Burdman *et al.*, 2000). Así como también está involucrado en la producción de ácido indolacético (Xie *et al.*, 2005). Aunque hasta la fecha no se sabe nada acerca de su función en la biopelícula. En base a los resultados obtenidos, al hacer los extractos de proteínas en la biopelícula (Figura 8) se observó una banda de 37 kDa cuya alta expresión nos sugiere que esta proteína OmaA tiene una gran importancia para el mantenimiento de esta estructura.

Para poder comprobar nuestras propuestas acerca de la función que desempeñan las 3 proteínas sobre la biopelícula, es necesario hacer posteriores ensayos de inmunodetección para lo cual se deberán generar anticuerpos en contra de estas proteínas y por medio de un marcador fluorescente distinto para cada proteína, observar su presencia en las diferentes etapas de la biopelícula.

## **12 CONCLUSIONES**

La metodología estandarizada sirve para la extracción de proteínas de superficie bacteriana en *Azospirillum brasilense Sp7*

Las proteínas que se expresan en *Azospirillum brasilense Sp7* son diferentes en comparación en estado de vida libre a cuando esta genera la biopelícula

Las proteínas OmaA (porina) y las flagelinas que conforman los flagelos polar y lateral de *Azospirillum brasilense Sp7* están presentes en la biopelícula

## **13 PERSPECTIVAS**

Generar anticuerpos en contra de las proteínas obtenidas por la técnica estandarizada para posteriormente hacer ensayos de inmunofluorescencia en distintas etapas de desarrollo de la biopelícula

Correr un gel de poliacrilamida 2D del extracto para identificar todas las proteínas que están presentes

#### **14 AGRADECIMIENTOS**

Este proyecto fue realizado con el financiamiento de la beca PROMEP con número PTC-363 103.5/13/8869.

Agradecimiento al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla (Concytep) por el incentivo económico otorgado, mismo que permitió satisfactoriamente la elaboración y conclusión de la tesis titulada.

***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en Azospirillum brasilense Sp7***

---

**15 ANEXOS**

Medio LB (Luria Bertani) 1l.

Reactivos	Cantidad
Peptona de caseína	10 gr.
Extracto de levadura	5 gr.
NaCl	5 gr.
Agar	1.5 gr./100mL.

Medio K-Malato

Este medio se prepara en dos tiempos, el primero es la realización de la base K y la segunda es la complementación de la base con sales y oligoelementos

Solución base para 1l.

Reactivos	Cantidad
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	.87 gr.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.67 gr.
MgSO <sub>4</sub>	.29 gr.
NaCl	.48 gr.
Ácido Málico	4.5326 gr.

Esterilizar a 15 libras por 20 minutos y complementar con sales y oligoelementos

Sales para 1 l de solución base		Oligoelementos para 1 l de solución base	
CaCl <sub>2</sub> al .7%	10 ml.	0.025 gr.	MnSO <sub>4</sub>
FeCl <sub>3</sub> al 1%	1 ml	0.7 gr.	ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O al .5 %	1ml.	0.014 gr.	CoSO <sub>4</sub>
NH <sub>4</sub> Cl	20ml	0.0125 gr.	CuSO <sub>4</sub>
		0.03 gr.	H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>

Medio NFb concentración C/N 1:2 para 1l

Ácido Málico	3.7 gr.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> al 10 %	5ml

***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en Azospirillum brasilense Sp7***

---

MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O al 10%	2ml.
NaCl al 10%	1ml.
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	2ml
Solución de micronutrientes	2ml
Fe EDTA al 1.64%	4ml
Adicionar una de las fuentes de carbono	
KNO <sub>3</sub>	1.39gr.
NH <sub>4</sub> Cl	0.7389gr.

Solución de micronutrientes para 200ml.

Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	.200gr.
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	.235gr.
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	.280gr.
CuSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	.008gr.
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	.024gr.

Esterilizar a 15 libras por 20 minutos

Solución PBS (solución reguladora de fosfatos) para 1l.

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10mM	1.36gr.
K <sub>2</sub> HPO <sub>2</sub> 10mM	1.74gr.

Agua destilada para el litro

Azul de Coomassie R-250 para 100ml.

Azul de comassie R-250	0.125%
Metanol	50%
Ácido Acético	10%
Agua destilada para los 100ml.	

## 16 REFERENCIAS

1. Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M. & Tolker-Nielsen, T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology* 59, 1114–1128.
2. Alexandre G., Rohr R., Bally R. (1999). A Phase Variant of *Azospirillum lipoferum*, Lacks a Polar Flagellum and Constitutively Expresses Mechanosensing Lateral Flagella. *Molecular Microbiology*. 65(10), 4701–4704
3. Arruebarrena D-P. A, Pereyna. C., Moreno Ramírez L., Xiqui Vázquez ML., Baca B.E., Pereyna M. A., Lamattina L., Creus C.M. (2012). Denitrification derived nitric oxide modulates (or enhances) biofilm formation in *A. brasilense*. *FEMS Microbiol Lett.* 22. doi: 10.1111/1574-6968.
4. Arun S.J. y Krishnappa G. (2004). Antigenic Analysis of Outer Membrane Proteins of Biofilm and Free Cells of *Pasteurella multocida* A: 1 in Comparison with Local Isolate. *J. of Poultry Science*. 3 (8): 517-521
5. Barahona E, Navazo A, Yousef C. F, Aguirre C. A, Martinez G. F, (2010) Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens* 113 mutants unable to form biofilms on abiotic surfaces. *Environmental Microbiology* 12 (12), 3185–3195.
6. Barak, R., Nur, I., Okon, Y. and Henis, Y. (1982) Aerotactic response of *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 152(2):643.
7. Bashan, Y. Holguin G. (1997). *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.* 43: 103-121
8. Bible, A., Russell, M. H., and Alexandre, G. (2012). The *Azospirillum brasilense* Che1 Chemotaxis Pathway Controls Swimming Velocity, Which Affects Transient Cell-to-Cell Clumping. *J. Bacteriol.* 194: 3343–3355
9. Burdman S., Dulguerova G., Okon Y., Jurkevitch E. (2000). Purification of the major outer membrane protein of *Azospirillum brasilense*, its affinity to plant roots, and its involvement in cell aggregation. *MPMI* 14(4) 555-561.
10. Branda S. S., Chu F., Kearns D. B., Losick R., Kolter R., (2006). A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular Microbiology* 59 (4), 1229–1238
11. Camargo D. N., (2005) Tesis de Maestría. Análisis de la función del flagelo en la colonización de *Azospirillum brasilense* Sp7 al trigo BUAP.
12. Camelo, M. R., Vera, S. P. M., Bonilla, R. R. B. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Rev. Corpoica*. 12(2), 159-166.
13. Cardenas, D. M., Garrido, M. F., Bonilla, R. R. y Baldani, V. L. (2010). Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. En pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar Isolation and identification of *Azospirillum* sp. in Guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.) of the Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes*. 33. 1-1.

***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en Azospirillum brasilense Sp7***

---

- 14 Castañeda S. M. C., Gómez G. G., Tapia C. E., Núñez M. O., Barajas P. J. B. y Rujano S. M. L. (2013). EFECTO DE *Azospirillum brasilense* Y FERTILIZACIÓN QUÍMICA SOBRE EL CRECIMIENTO, DESARROLLO, RENDIMIENTO Y CALIDAD DE FRUTO DE FRESA (*Fragaria x ananassa*Duch). INTERCIENCIA. 39 (10) 737-744.
- 15 Cholula C. L. P., (2005). Tesis de Maestría. Estudio se la producción de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) en *Azospirillum brasilense* Sp7. Instituto Politécnico Nacional. Tamaulipas.
- 16 Croes, C., Moens, S., Van Basteleare, E., Vanderleyden, J., and Michiels, K., (1993). The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. J. Gen. Microbiol. 139, 226 1-2269.
- 17 Cucarella C., Solano C., Valle J., Amorena B., Lasa Í. y Penadés J. R.(2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. Bacteriology, 183 (9), 2888–2896
- 18 Donlan R. M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Emerg Infect Dis 8: 881-890. doi:10.3201/eid0809.020063. PubMed: 12194761.
- 19 Flemming H.C. and Wingender J.(2010). The biofilm matrix. Nature. volume 8.
- 20 Guerrero-Molina M. F., Winik B. C., Pedraza R. O. (2011). More than rhizosphere colonization of strawberry plants by *Azospirillum brasilense*. ELSEVIER. 1608; 8.
- 21 Gavin M. R., (2003). Tesis Doctoral. Caracterización genética y fenotípica de flagelo de *Aeromonas*. Universidad de Barcelona. Departamento de Microbiología.
- 22 Karatan E y Watnick P. (2009). Signals, regulatory networks, and material that build and break bacterial biofilms. Microbiology Molecular and Biol. Rev. 73: 310-347
- 23 Laemmli, U.K. (1979) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- 24 Lemon K. P., Earl A. M., Vlamakis H. C., Aguilar C., Kolter R. (2008). Biofilm Development with an Emphasis on *Bacillus subtilis*. *Microbiol Immunol*.322: 1–16.
- 25 Levanony, H., and Bashan, Y. (1991). Active attachment of *Azospirillum brasilense* to root surface of non-cereal plants and to sand particles. Plant and Soil 137: 91-97,
- 26 Maric S., Vranes J. (2007). Characteristics and significance of microbial biofilm Formation. PERIODICUM BIOLOGORUM. 109(2).
- 27 Merino S., Shaw J. G., Tomas J. M.(2006). Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. FEMS DOI:10.1111/j.1574-6968.2006.00403
- 28 Michiels, K. W., Chris, L. Croes and Vanderleyden. (1991). Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. J. Gen. Microbiol. 137, 224 1-2246.
- 29 Moens S., Michiels K., Keijers V., Van Leuven F., Vanderleyden J. (1995). Cloning, Sequencing, and Phenotypic Analysis of *laf1*, Encoding the Flagellin of the Lateral Flagella of *Azospirillum brasilense* Sp7. Bacteriology. 177(19): 5419–5426

***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en Azospirillum brasilense Sp7***

---

- 30 Palacios Castañeda F. (2014). Papel de la Diguanylatociclasa A (*dgcA*) de *Azospirillum brasilense* en la formación de biopelícula y en la colonización de trigo. Tesis de Licenciatura. CICM, ICUAP
- 31 Wei Q., Ma L. Z., (2013). Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Mol. Sci. Int. J. Mol. Sci
- 32 Ramey, Bronwyn E.; Koutsoudis, Maria; von Bodman, Susanne B.; and Fuqua, Clay, "Biofilm Formation in Plant-Microbe Associations" (2004). *Plant Science Articles*. Paper 18.
- 33 Romero Osorio A. (2012). Estudio de la formación de la Biopelícula en *Azospirillum brasilense*. Tesis de Maestría. Posgrado en microbiología CICM, ICUAP
- 34 RODRÍGUEZ-CÁCERES, E. A. (1982) Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. Applied and Environmental Microbiology, 44: p. 990-991.
- 35 Rodriguez-Navarro, D. N., Dardanelli, M. S., Ruiz-Sainz, J. E. (2007) Attachment of bacteria to the roots of higher plants. MicrobiolLett 272 127–136
- 36 Rivera Botia, D. M. (2008). Tesis de Licenciatura Optimización de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en *Azospirillum brasilense* C16. Universidad Francisco de Paula Santander. San Jose de Cocuta.
- 37 Rueda PE, Barrón HJ, Hallman J (2009) *Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal*. 1ª ed. Plaza y Valdés. México. 141 pp.
- 38 Ryan, R. P., Fouhy, Y., Lucey, J. F., Crossman, L. C., Spiro, S., He, Y. W., Zhang, L. H., Heeb, S., Camara, M., Williams, P., Dow. J. M. (2006). Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 6712–6717.
- 39 Serra D. O., Richter A. M., Klauck G., Mika F., Hengge R. (2013). Microanatomy at Cellular Resolution and Spatial Order of Physiological Differentiation in a Bacterial Biofilm. mBio. 4(2): doi:10.1128/mBio.00103-13.
- 40 Steenhoudt, O., Vanderleyden J., (2000). *Azospirillum* a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. Microbiology. 24:487-506.
- 41 Tamayo, R., Tischler, A. D., Camilli, A. (2005). The EAL domain protein VieA is a cyclic diguanylate phosphodiesterase. J. Biol. Chem. 280:33324–33330.
- 42 Whitchurch C. B., Tolker-Nielsen T., Ragas P. C., Mattick J. S. (2012). Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. SCIENCE 295. 1487
- 43 Xie B., Xu K., Zhao H. Z., Chen S. F. (2005). Isolation of transposon mutants from *Azospirillum brasilense* Yu62 and characterization of genes involved in indole-3-acetic acid biosynthesis. FEMS MicrobiolLett. 248 doi:10.1016/j.femsle.2005.05.020
- 44 Xiqui M.A., Romero A., Terán E., Soto L., Baca B. (2010). Nuevo sistema de señalización en bacterias mediado por el (3'5') guanosín-monofosfato-cíclico (di-gmpc). Elementos 80. 21-29

***Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en Azospirillum brasilense Sp7***

---

- 45 Zhulin, I. B., Bespalov, V. A., Johnson, M. S., Taylor, B. L. (1996). Oxygen Taxis and Proton Motive Force in *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol. 178(17):5199.

## **17 ABREVIATURAS**

**di-GMPc:** Ácido di-(3'-5') guanosin monofosfato, segundo mensajero involucrado en el sedentarismo de las bacterias gram-negativas, está formado por dos moléculas de GTP.

**DGC:** diguanilato ciclasa, enzima con dominio característico GGDEF que sintetiza di-GMPc.

**PDE:** Fosfodiesterasa, enzima con dominio característico EAL o HD-GYP

**NFB:** medio de cultivo con relación 2/1 de carbono-nitrógeno que induce la formación de biopelícula.

**PGPR:** Rizobacterias Promotoras del Crecimiento en Plantas.

**SPE:** sustancias poliméricas extracelulares, componentes de la matriz de la biopelícula.