



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
PUEBLA**



INSTITUTO DE CIENCIAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS  
POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**Estudio del papel de la vía SagS-HptB involucrada en la  
síntesis de alginatos en *Azotobacter vinelandii***

**TESIS**

PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)  
CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

**PRESENTA:**

Q.F.B Claudia Mondragón Albarrán

**DIRECTOR DE TESIS:**

D.C. Miguel Castañeda Lucio

**ASESORES DE TESIS:**

D.C Beatriz Eugenia Baca

D.C. Liliana López Pliego

D.C. Luis Ernesto Fuentes Ramírez

D.C. Alberto Ramírez Mata

Puebla, Pue. a 6 de febrero 2024.

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

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de tesis de maestría de la alumna **Claudia Mondragón Albarrán**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

**“Estudio del papel de la vía SagS-HptB involucrada en la síntesis de alginatos en *Azotobacter vinelandii*”**

A nuestro juicio, la alumna **Claudia Mondragón Albarrán** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.  
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”

 D.C. Beatriz Eugenia Baca		 D.C. Luis Ernesto Fuentes Ramírez
 D.C. Liliana López Pliego		 D.C. Alberto Ramírez Mata

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a papá y mamá por ser mi guía, mis ángeles, por no dejarme caer; han sido, son y serán mi más grande motor para salir adelante en esta vida.

Gracias a mi hermano, Josúe, a mi Komi por siempre estar al tanto de mí y cuidarme siempre. Gracias a Tatis, Kokis, y Keny por su amor y apoyo en todo lo que he hecho.

Gracias a Ara, Fer, Itzel por compartir momentos alegres en el laboratorio y apoyarme cuando lo necesite. Gracias Lili por ser una guía y estar siempre al tanto de nosotros.

Gracias al Dr. Miguel por haber creído en mí, por su paciencia y sobre todo por su apoyo incondicional durante todo este tiempo, sin usted nada de esto habría sido posible.

Gracias a Lau y Josué porque sin ustedes no habría podido terminar esta gran aventura, cuidaron de mí aún sin conocerme y me hicieron sentir en casa siempre, jamás podré pagar lo que hicieron por mí. Son unos ángeles en mi vida.

Gracias a Riki y a Leo por mantenerme cuerda en los peores momentos y llenarme de amor.

Gracias a mí, por ser valiente y arriesgarme a esta aventura que ha sido de las experiencias más fascinantes de mi vida.

Gracias a CONACyT, la VIEP, el ICUAP y al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas por todo el apoyo y becas otorgadas.



# ÍNDICE

## RESUMEN

<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>6</b>
1.1 Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i>	6
1.2 Alginatos	8
1.2.1 Síntesis de alginatos	9
1.3 Sistema de doble componente	12
1.3.1 Sistema de doble componente GacS/GacA	14
<b>2 ANTECEDENTES</b>	<b>16</b>
<b>3 JUSTIFICACIÓN</b>	<b>18</b>
<b>4 HIPÓTESIS</b>	<b>18</b>
<b>5 OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
5.1 Objetivo general	18
5.2 Objetivos específicos	18
<b>6 MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>19</b>
6.1 Material biológico	19
6.2 Medios de cultivo y soluciones	21
6.2.1 Medio Luria-Bertani (LB)	21
6.2.2 Medio Burk-Sacarosa (BS)	21
6.2.3 Medio de competencia (CM)	21
6.2.4 Medio para conjugación (BSLB)	22
6.2.5 Solución de ácido sulfúrico-boratos	22
6.2.6 Solución de carbazol 0.1%	22
6.3 Metodologías	23
6.3.1 Preparación de células competentes de <i>E.coli</i>	23
6.3.2 Preparación de células competentes de <i>A.vinelandii</i>	23
6.3.3 Extracción de plásmido por lisis alcalina	23
6.3.4 Extracción de plásmido por perclorato	24
6.3.5 Extracción de plásmido por MAXIPREP	25
6.3.6 Transformación de <i>A. vinelandii</i>	25
6.3.7 Transformación de <i>E.coli</i>	25

6.3.8	Extracción de ADN genómico (total) de <i>A. vinelandii</i> .....	26
6.3.9	Extracción de banda de gel de electroforesis .....	26
6.3.10	Conjugación <i>A. vinelandii</i> – <i>E.coli</i> .....	27
6.3.11	Cuantificación de alginato por el método del carbazol .....	28
6.3.12	Cuantificación de proteína por el método de Lowry .....	29
6.3.13	Condiciones de amplificación de PCR .....	29
<b>7</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
7.1	Construcción del plásmido integrativo pUMATcsagS para la complementación en cis .....	30
7.2	Obtención y comprobación de la cepa complementada en cis .....	32
7.3	Construcción del plásmido integrativo pBBR1MCS-2-sagS para la complementación en trans .....	37
7.4	Obtención y comprobación de la cepa complementada en trans .....	38
7.5	Obtención y comprobación de la cepa sobreexpresada ( <i>E</i> sagS <sup>+</sup> ) .....	41
7.6	Obtención y comprobación de la cepa <i>E</i> hptB <sup>+</sup> /sagS .....	42
7.7	Ensayos de doble híbrido cuantitativo de SagS y HptB .....	46
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>48</b>
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>48</b>
<b>10</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>49</b>

## RESUMEN

La producción de los polímeros poli- $\beta$ -hidroxibutirato y alginatos en *A. vinelandii* se encuentra controlado por el TCS (sistema de doble componente) GacS/GacA. Es ya conocido que en *A. vinelandii* dicho sistema forma parte de sistema de multikinases (MKN), dentro del cual podrían existir ramas accesorias capaces de interactuar con la vía principal de la red de multikinases constituida por GacS/GacA. Una de estas ramas es la llamada “rama HptB”, sobre la cual se enfocó este trabajo.

Previamente dentro del grupo de trabajo se inició la caracterización de la rama GacS/A-HptB estudiando a la cinasa SagS (anteriormente nombrada como GacS2 por su similitud parcial con GacS). Se encontró que en *A. vinelandii* *sagS* podía actuar como un regulador negativo de la síntesis de alginatos, además de que en esta regulación podría estar implicado el regulador HptB, del que también se encontró interactúa con SagS.

En este trabajo se determinó que los niveles de aireación del cultivo afectan la síntesis de alginato en las diferentes cepas estudiadas. Tanto SagS y HptB parecen ser sensibles a O<sub>2</sub>. La mutación de *sagS* parece no tener efecto cuando el cultivo tiene una mayor disponibilidad de oxígeno. De igual forma, cuando existen condiciones de mayor oxigenación, el efecto de la sobreexpresión de *hptB* es mayor (produciendo cerca de tres veces más cantidad de alginato en comparación con la cepa silvestre, lo cual coincide con lo previamente reportado). De forma interesante el efecto de sobreexpresión de HptB se pierde cuando se muta *sagS*, lo que sugiere que SagS tiene una mayor jerarquía genética que HptB.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Generalidades de *Azotobacter vinelandii*

*Azotobacter* es un género perteneciente al filo *Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Pseudomonadales*, familia *Pseudomonadaceae*; junto con *Azomonas* y *Pseudomonas*. (Kennedy, C., et al, 2015)

El género está compuesto por siete especies que, morfológicamente van desde una forma bacilar, pasando por bacilos con extremos redondeados, hasta una forma cocoide dependiendo de las condiciones de cultivo; con un tamaño alrededor de 2µm de diámetro y hasta 4 µm de longitud. Hay especies móviles (*A. vinelandii*) por medio de flagelos peritricos o polares (Frioni, L, 2005), e inmóviles (*A. beijerinckii* y *A. nigricans*). (Kennedy, C., et al, 2015). Todas forman estructuras de resistencia, llamadas quistes, que son menos resistentes que las endoesporas bacterianas. (Frioni, L, 2005)

La forma más frecuente en la que se presentan es en pares y son Gram-negativas, aunque es posible que aparezcan como Gram-variable, son aerobios estrictos, sin embargo, pueden crecer y fijar N<sub>2</sub> bajo presión reducida de O<sub>2</sub>, catalasa positiva y de vida libre. (Frioni, L, 2005; Jnawali, A.D., et al 2015)

*Azotobacter vinelandii* fue descubierta en 1903 en Vineland, New Jersey (Kennedy, C., et al, 2015) (Noar, J y Bruno-Bárcena, J.M., 2018), es una bacteria aerobia obligada con una velocidad de respiración de las más altas en comparación con otras bacterias (Castillo, T et al., 2020; Noar, J y Bruno-Bárcena, J.M., 2018), con un tiempo de generación de 2.5 -3 horas en medio Burk (Sadoff, H, 1975), móvil (flagelos peritricos), pleomórfica dependiendo de su estado fisiológico y de las condiciones ambientales (Noar, J y Bruno-Bárcena, J.M., 2018), puede tener un tamaño aproximado de 1.6-2.5 x 3-5 µm (Kennedy, C., et al, 2015); forma quistes como medio de resistencia en cultivos viejos o cuando se adiciona butanol (Kennedy, C., et al, 2015), para lo cual es capaz producir diferentes compuestos (PHAs - polihidroxicanoatos-, alginatos), es una bacteria diazotrófica (es decir, fijadora de nitrógeno) (Plunkett, M et al, 2020) que posee tres diferentes versiones de la enzima

nitrogenasa (Mo, V, Fe). La nitrogenasa particular es activada dependiendo de las condiciones de crecimiento; dentro de las aplicaciones en la agricultura, se ha encontrado que *A. vinelandii* es capaz de producir ácido indol acético (IAA), hormona que promueve el crecimiento de las plantas. Este microorganismo ha sido también utilizado como agente de control antifúngico (Noar, J y Bruno-Bárcena, J.M., 2018).

*A. vinelandii* puede usar una gran variedad de compuestos como fuente de carbono (Noar, J y Bruno-Bárcena, J.M., 2018) pero el uso de ramnosa y fenol son distintivos de la especie (Kennedy, C., et al, 2015).

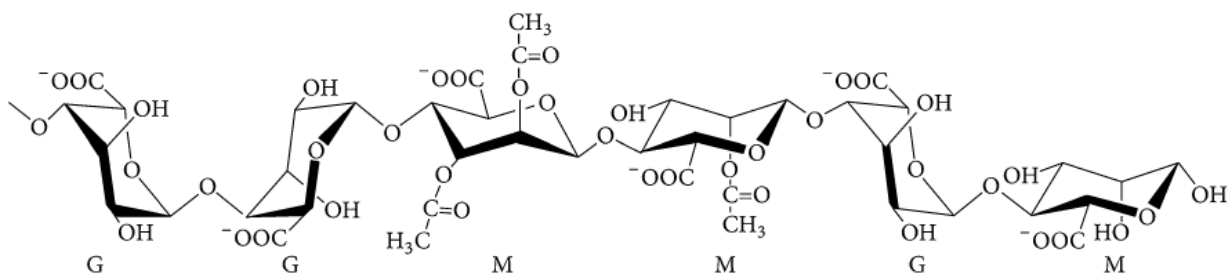
*A. vinelandii* tiene un genoma con un tamaño de 4.6 Mb (Kennedy, C., et al, 2015), es una bacteria poliploide con alrededor de 80 copias del genoma/célula en la fase estacionaria. (Nagpal, P, et al, 1989; Noar, J y Bruno-Bárcena, J.M., 2018)

Por medio de microscopía electrónica se ha podido reconocer dos capas que forman al quiste, la intina y la exina; la intina (capa interna) está compuesta por carbohidratos, lípidos y proteínas, además de  $\text{Ca}^{+2}$ . Por su parte la exina (capa externa) está compuesta por un complejo lipídico de lipoproteínas y lipopolisacáridos, siendo el  $\text{Ca}^{+2}$  el principal mineral; la composición es similar a la de la pared celular de los gram-negativos. (Frioni, L. 2005; Sadoff, H, 1975; Page, W. et al, 1975). Durante el proceso de enquistamiento se produce un cuerpo central compuesto mayoritariamente de PHB; los quistes representan alrededor de la mitad del tamaño de la célula en estado vegetativo. (Sadoff, H, 1975)

El estudio de *A. vinelandii* se ha centrado en su potencial biotecnológico relacionado con características como la producción de hidrógeno, la fijación de nitrógeno, así como la producción de polímeros naturales (polihidroxialcanoatos- PHA's- y alginatos) que son biodegradables y que pueden ser usados dentro de la industria de dispositivos médicos al ser biocompatibles. (Noar, J y Bruno-Bárcena, J.M., 2018; Castillo, T et al., 2020; (Ahumada-Manuel, C.L., et al, 2020)

## 1.2 Alginatos

Los alginatos son polisacáridos lineales (Ahumada-Manuel, C.L., et al, 2020) de elevado peso molecular (Franklin, M., 2011) compuestos por dos unidades de carbohidratos ácidos en cantidades variables: (Noar, J y Bruno-Bárcena, J.M., 2018; Galindo, E., 2007) (1-4)- $\beta$ -D-ácido marurónico, denominado M y su epímero  $\alpha$ -L-ácido gulurónico, denominado G, dicha epimerización es importante para determinar la estructura del polímero y, por ende, sus propiedades. (Urtuvia, V. et al, 2017; Clementi, F., 1997), cabe resaltar que no todas las cepas de *A. vinelandii* son capaces de producir alginatos (Noar, J y Bruno-Bárcena, J.M., 2018)



**Figura 1. Estructura química del alginato. M: ácido marurónico, G: ácido gulurónico.** Tomado de Urtuvia, V. et al, 2017

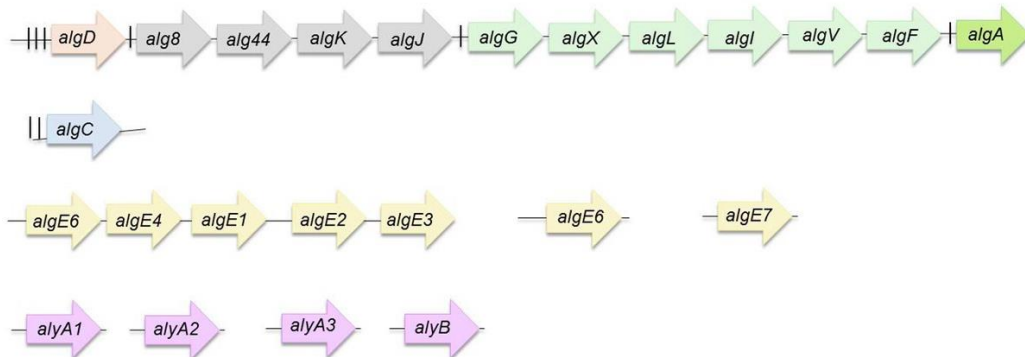
*A. vinelandii* es de especial interés biotecnológico por su producción de alginatos (Galindo, E. et al, 2007; Urtuvia, V et al. 2017); los alginatos sirven como un agente viscosante y gelificante (Castillo, T et al., 2020) en la industria alimenticia, farmacéutica, médica, cosmética, agroquímica, ambiental, entre otras (Noar, J y Bruno-Bárcena, J.M., 2018; Hernández-Carmona, G. et al, 2012). El alginato es sintetizado durante la fase de crecimiento y en el proceso de enquistamiento (cepas que no producen alginatos tampoco son capaces de formar quistes) (Clementi, F, 1997; Noar, J y Bruno-Bárcena, J.M., 2018). Este polímero es utilizado como un mecanismo de resistencia a la desecación producida por factores ambientales con la finalidad de mantener la célula lo suficientemente hidratada e incluso funciona como barrera contra la toxicidad inducida por metales pesados, así como contra exceso de O<sub>2</sub> (Urtuvia, V. et al, 2017). Representa cerca del 32% del peso seco en

la capa interna (intina) y 13% en la capa externa (exina) de los quistes maduros. (Page, W. et al, 1975)

*A. vinelandii* es capaz de producir diferentes tipos de alginatos en cuanto a composición y características (distribución G/M, pesos moleculares y grados de acetilación) (Ponce, B. et al, 2021). La principal fuente de obtención de alginatos es a partir de las algas marinas pardas (feofíceas), en las cuales, tiene la función de dar fuerza y flexibilidad al alga (Hernández-Carmona, G., et al, 2012); sin embargo, los alginatos de algas son mezclas de polímeros que tienen diferentes masas moleculares y composición debidas a que no es posible controlar las condiciones ambientales puesto que son cosechadas del mar lo que hace que su uso sea muy limitado. (Galindo, E., et al, 2007)

### 1.2.1 Síntesis de alginatos

La biosíntesis de alginatos se da de forma similar en *P. aeruginosa* como en *A. vinelandii* (Castillo, T., 2013); la mayoría de los genes biosintéticos se encuentran agrupados en el cluster *algD-8-44-K-J-X-L-I-V-F-A* y sólo *algC* se encuentra en un locus separado (Nuñez C, et. al., 2022)



**Figura 2. Genes involucrados en la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*.** Modificado de Nuñez C, et. al., 2022.

La biosíntesis de alginato puede dividirse de forma general en tres pasos: i) formación del precursor del ácido GDP-manurónico, ii) la polimerización y iii) modificación, transporte y secreción. (Franklin, M., et al, 2011; Galindo, et al, 2007) Se requiere de carbohidratos previamente activados con enlaces de alta energía

que, en el caso de alginatos es GDP (Franklin, M., et al, 2011) por lo que comienza a partir de fructosa-6-fosfato (F6P) que es convertido a manosa-6-fosfato (M6P) catalizado por AlgA (fosfomanosa isomerasa); M6P es después convertido a manosa-1-fosfato (M1P) por medio de AlgC (fosfomanomutasa) seguido por la conversión a GDP-manosa por medio de AlgA (GDP-manosa pirofosforilasa) que es oxidado por AlgD (GDP-manosa deshidrogenasa) a GDP-ácido manurónico (paso irreversible de la primera fase de la vía), todo esto ocurre en el citosol (Franklin, M., et al, 2011; Urtuvia, V. et al, 2017; Galindo, E. et al, 2007).

El segundo paso, la polimerización, es llevada a cabo por las proteínas Alg8 y Alg44 (enzimas localizadas en la membrana interna y que forman parte del complejo de la polimerasa) (Urtuvia, V, et al, 2017; Ponce, B, et al, 2021), la primera enzima tiene una actividad manuronato polimerasa (Galindo, E. et al, 2007) y consta de cuatro dominios transmembrana y un dominio citoplasmático, mientras que Alg44 sólo posee un dominio citoplasmático en el que el segundo mensajero c-di-GMP puede unirse (dominio PilZ). Sin embargo, la forma en la que dichas proteínas interactúan para lograr la polimerización no se conoce con precisión (Franklin, M., et al., 2011), pero se sugiere que el dominio PilZ puede tener un papel regulador. (Galindo, E. et al, 2007). Alg44 puede interactuar con AlgK (localizada en la membrana externa) para estabilizar el complejo de la polimerasa y ayudar en la localización de la proteína AlgJ (porina) (Urtuvia, V. et al., 2017)

En el tercer paso de la biosíntesis de alginatos ocurre la modificación del polimanuronato; este paso sucede en el periplasma y comprende la modificación del ácido polimanurónico al polímero de alginato por una serie de enzimas que incluyen al complejo de acetilación y que está conformado por las proteínas AlgI, AlgV, AlgF y AlgX (AlgI, AlgJ y AlgF en *P. aeruginosa*) y la epimerasa polimanurónica (AlgG) (Galindo, E., et al, 2007; Urtuvia, V. et al, 2017)

AlgI es la proteína encargada de transportar grupos acetyl-CoA desde el citoplasma hacia el espacio periplásmico donde AlgF, AlgX y AlgV se encargan de acetilar las subunidades M, las subunidades M que no se acetilan sufren una epimerización que

da lugar a las subunidades G por lo que dicha epimerización está influenciada por el grado de acetilación (Clementi, F., 1997; Urtuvia, V. et al, 2017)

Para la translocación y secreción del polímero se requiere de AlgK (en *P. aeruginosa*), el cual, tiene una estructura en la cual una porción lipídica ancla la proteína a la membrana externa; AlgJ (AlgE en *P. aeruginosa*) es una proteína de la membrana externa capaz de formar un canal aniónico específico para que el polímero pueda ser secretado. (Franklin, M., et al., 2011; Galindo, E., et al, 2007). En el caso de *A. vinelandii*, una vez que el polímero ha sido secretado es convertido a la molécula final de alginato por una familia proteica compuesta por siete epimerasas manurónicas extracelulares denominadas AlgE1-7 que pueden modificar las subunidades M que no se encuentren acetiladas y las cuales son vitales para la formación de quistes maduros y que no se encuentran presentes en *P. aeruginosa* (Galindo, E., et al, 2007; Urtuvia V. et al, 2017).

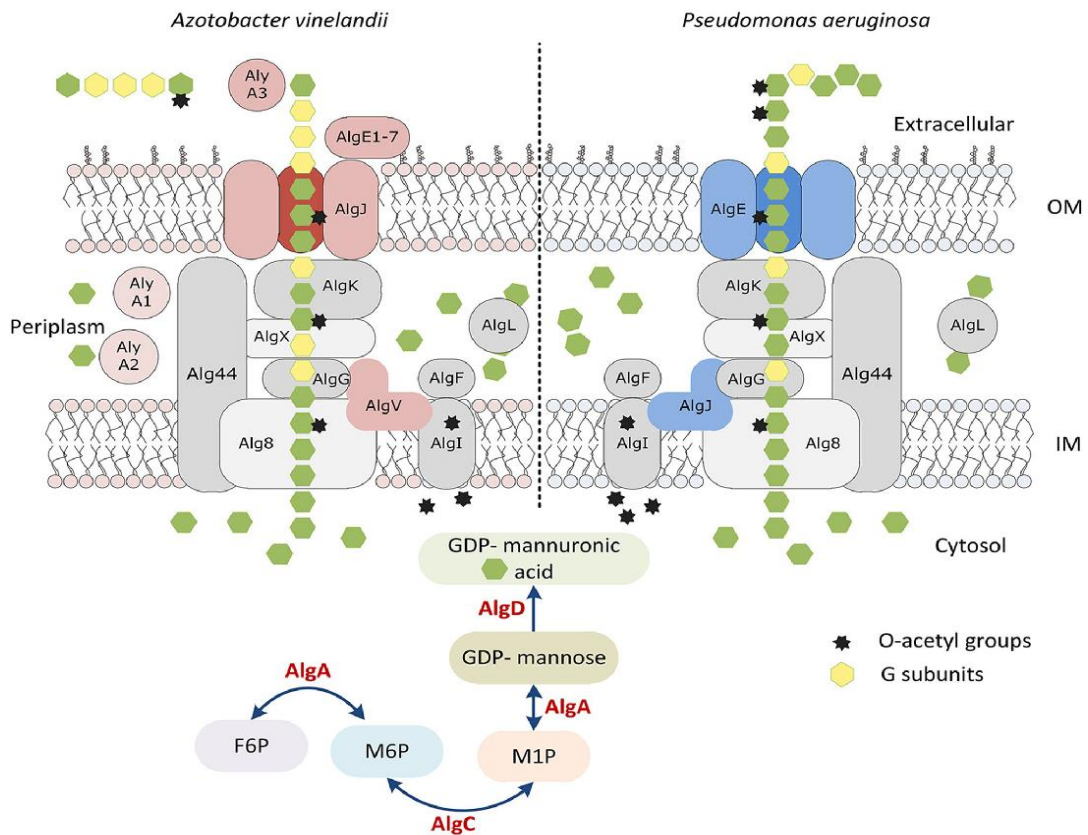


Figura 3. Comparación de la síntesis de alginatos entre *A. vinelandii* y *P. aeruginosa*.

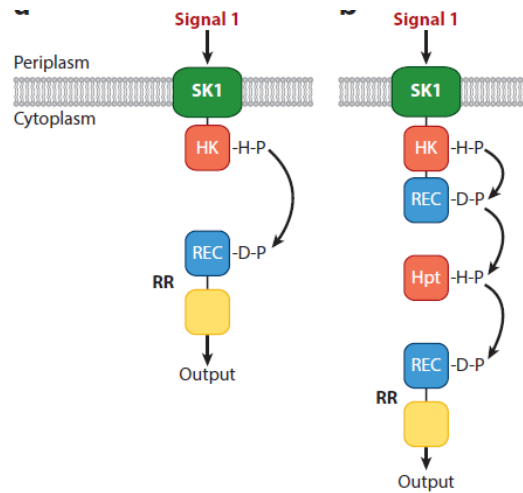
Tomado de Urtuvia, V. et al, 2017.

### 1.3 Sistema de doble componente.

Tanto en eucariontes inferiores como en procariotas existen cascadas de señalización que actúan mediante fosforilaciones consecutivas de proteínas en residuos específicos y que han sido denominadas como sistemas de doble componente TCSs (por sus siglas en inglés, *two-component systems*). Dichos sistemas son capaces de percibir de forma directa o indirecta (Stock, A., Robinson, V., Goudreau, P., 2000) señales (tanto físicas como químicas) del medio ambiente y traducir dicha señal en una respuesta celular (Jacob-Dubuisson, F. et al., 2018) con la finalidad de adaptarse a las nuevas condiciones de una forma rápida (Jean-Pierre, 2017). Esos sistemas están compuestos por una proteína sensora transmembrana (denominada HK *-histidine kinase*) que puede “sensar” las condiciones ambientales y puede actuar como receptor celular y otra proteína reguladora citoplasmática (denominada RR *-response regulator*) que es capaz de activar o reprimir la transcripción de genes blanco o modificar los niveles de segundos mensajeros (Galicia-Jiménez, M, et al, 2017, Jacob-Dubuisson, F, 2018) después de ser fosforilado por el *sensor*. La fosforilación se realiza en residuos de histidina y aspartato respectivamente. (Barba-Ostria, C, 2013; Francis, V, et al, 2019; Castañeda, M., et al, 2000; Castañeda, M., et al, 2001)

La HK tiene la propiedad de alternar entre la función de cinasa (al ser capaz de autofosforilarse en un residuo de His y efectuar la transferencia a un residuo de Asp dentro del dominio de salida -REC-) y la de fosfatasa (al desfosforilar el dominio REC, no todas las HK tienen esta propiedad) (Jacob-Dubuisson, F. et al., 2018). Estas proteínas pueden dividirse de forma general en cinasas ortodoxas e híbridas; las HK híbridas realizan el fosforelevo en varios pasos (Stock, A., Robinson, V., Goudreau, P., 2000). Otra forma de clasificarlas es de acuerdo a la topología que presentan y se tienen tres grandes grupos: 1) las HK clásicas que poseen dominio sensor extracitoplasmático donde la señal es trasladada a través de la membrana; 2) en este grupo se clasifican a las HK's que poseen entre 2-20 hélices transmembranales sin poseer un dominio extracelular y 3) poseen un dominio

sensor citoplasmático por el cual pueden percibir estímulos internos (Gao, R., Stock, A., 2009)

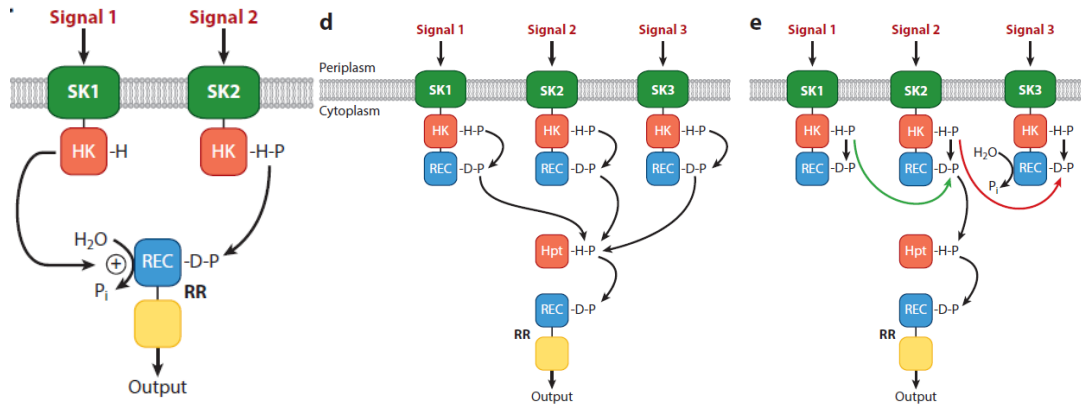


**Figura 4. HK's ortodoxas (izquierda) e híbridas (derecha).** Modificado de Francis, V (2019)

El RR consta de dos dominios, un dominio receptor conservado (denominado REC) localizado en el extremo N-terminal y que contiene el residuo de Asp que participa en la transferencia del grupo fosforilo desde el residuo de His del dominio transmisor de la HK, así como actividad de auto desfosforilación (Gao, R., Stock, A., 2009) y; un dominio efector variable o de salida, localizado en el extremo C-terminal que puede actuar como un factor de transcripción. (Galicia-Jiménez, M, 2017; Barba-Ostria, C, 2014). Se ha señalado que RR es capaz de realizar fosfotransferencia de forma independiente al estado de fosforilación de la proteína HK a través de otras moléculas fosfodonadoras, sin embargo, es una cantidad mínima si se compara con la actividad de una HK (Stock, A., Robinson, V., Goudreau, P., 2000; Gao, R., Stock, A., 2009)

Existen dos tipos de TCSs: los sistemas simples, los cuales están limitados tanto por la respuesta producida como por el corto rango de ligandos que lo pueden activar y los sistemas o redes multicinasas (MKN) que tienen varias HK's relacionadas entre sí por fosfoseñalización que permiten a la célula detectar y responder a diferentes estímulos. Por ejemplo, la esporulación (*B. subtilis*), el quorum sensing (*Vibrio spp.*), la virulencia (*P. aeruginosa*), control de la respiración

por nitratos/nitritos (*E. coli*), estrés celular (*B. anthracis*), rotación flagelar (*E. coli*), entre muchos otros (Francis, V, et al, 2019).



**Figura 5. Diferentes tipos de MKN's.** De izquierda a derecha: TCS simple (interacción entre una única SK y un RR); MKN conformada por tres SK's híbridas que comparten una proteína Hpt y el RR; MKN conformada por tres SK's híbridas, pero con sólo una capaz de fosforilar a Hpt mientras que las dos restantes actúan sobre esta última regulando los niveles de fosforilación de forma positiva (flecha verde) y negativa (flecha roja). Modificado de Francis, V (2019)

### 1.3.1 Sistema de doble componente GacS/GacA.

Fue en 1994 cuando Rich *et. al* proporcionaron la primera evidencia de que GacS y GacA formaban un sistema de doble componente; GacS fue descrita por primera vez en *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* como un regulador de patogenicidad (Hrabak, E.M, Willis, D.K.,1992), mientras que GacA fue descrita en *Pseudomonas fluorescens* CHA0 como un regulador de metabolitos antifúngicos (Laville, et al., 1992) y, hasta los 2000's pudo establecerse una conexión entre el TCS GacS/GacA y el regulador postranscripcional RsmA/CsrA con sRNAs en *P. fluorescens* (Lapouge, K. et al. 2007).

*P. aeruginosa* tiene un TCS denominado GacS, el cual tiene una regulación por medio de interacciones entre HK-HK. El sistema está compuesto por GacS (HK) y su RR (GacA), el cual regula la expresión de dos RNAs reguladores denominados

RsmY y RsmZ, estos RNAs secuestran a dos reguladores postranscripcionales denominados RsmA y RsmN, provocando un cambio en la expresión genética que, en *P. aeruginosa* promueve una sobrerregulación de las características que inducen la virulencia crónica; sin embargo, también se puede expresar la forma aguda, resultado de la unión de RsmA y RsmN a mRNA's. (Francis, V, et al, 2019; Lapouge, K., 2008).

GacS actúa como regulador positivo en la biosíntesis de alginatos y regula la acumulación de PHB en *A. vinelandii*, (Castañeda, M., et al, 2000; Castañeda, M., et al, 2001)

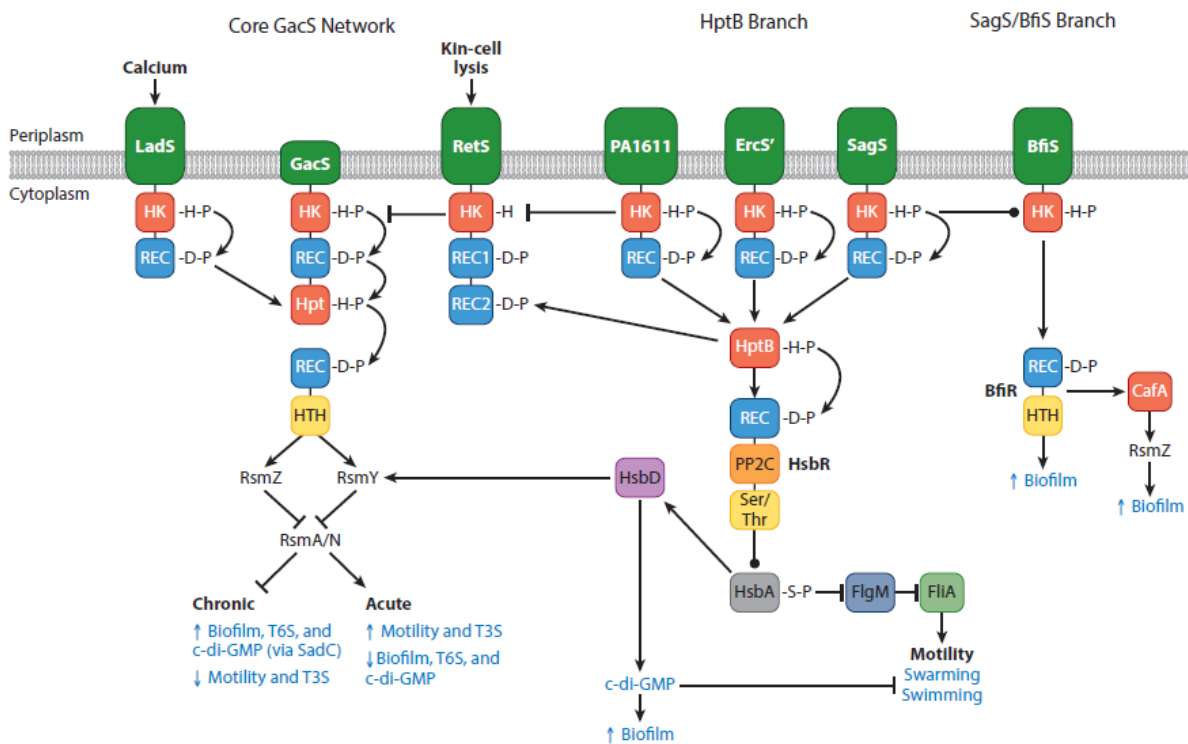


Figura 6. MKN GacS/GacA en *P. aeruginosa*. Tomado de Francis, V (2019)

## 2 ANTECEDENTES

Dingemans, L en 2019 demostró en *P. aeruginosa* que mutantes de SagS presentan afectación en la formación de biofilm y presentan una disminución en la tolerancia a antimicrobianos por diferentes mecanismos, lo que sugiere que en dicho modelo podría ser una diana terapéutica prometedora.

En *P. aeruginosa*, SagS está conformado por tres dominios: un dominio de detección periplásmico N-terminal (HmsP) que está flanqueado por dos hélices transmembranales; un dominio histidín cinasa (HisKA) y, un dominio fosforeceptor C-terminal (Rec) (Dingemans, J, 2019)

Se ha demostrado que en *P. aeruginosa*, SagS puede regular tanto a RsmY como a RsmZ por separado, siendo dependiente de HptB la regulación transcripcional sobre RsmY e independiente de HptB la regulación postranscripcional de RsmZ; Jean-Pierre, F et al en 2017 demostraron que dicha regulación diferencial depende de las condiciones de crecimiento

HptB es una proteína que consta de un único dominio Hpt y que es capaz de transmitir un grupo fosfato a PA3346-PA3347 (HsbR-HsbA); es fosforilada por ErcS', SagS y PA1611 y, ya fosforilado puede fosforilar a RetS. Parece ser que HptB regula solamente la expresión de *rsmY* (Petrova, O, et al, 2011; Francis, V, et al, 2019). Se ha descrito que *hptB* está relacionado con genes involucrados en la virulencia, formación de biofilm, movilidad (twitching, swimming y swarming), quimiotaxis y síntesis de alginatos mediante la acción sobre la expresión de genes flagelares y mediante la interacción con la vía Gac/Rsm. (Bhuwan, M et al., 2012; Valentini, M et al., 2016)

En *A. vinelandii*, Hernández-Campos (2019) describió la presencia de un homólogo de la HK SagS, el cual, está codificado por el gen *Avin\_15460*, al que originalmente se le llamó GacS2, por su parecido en su dominio transmisor con GacS. Se creó una mutante de *gacS2(sagS)* y se observó que existía una disminución en la producción de alginato. En este estudio se planteó la hipótesis que SagS podría estar relacionada con la rama en la que interviene HptB.

En este trabajo, aunque la complementación de la mutante restauró el fenotipo mucoide no se cuantificó la producción de alginato. También se pudo establecer que el blanco de regulación de *sagS* (nombrado previamente como *gacS2*) es el gen que codifica para el pequeño RNA regulador RsmY. Por otra parte, Meneses-Carbajal realizó el estudio de HptB como intermediario en la regulación de la biosíntesis de alginato generando una mutante *hptB*, encontrando que la mutación producía una disminución en la síntesis de alginatos. Además, se realizó un experimento de sobreexpresión del gen *hptB*, lo que resultó en un aumento en la producción de alginatos. De forma similar a lo encontrado para *SagS*, se reportó un efecto regulador de HptB sobre RsmY, sugiriendo una interacción de las vías de regulación de *SagS* y HptB, lo cual se probó estructuralmente mediante ensayos cualitativos de doble híbrido.

### **3 JUSTIFICACIÓN**

En *A. vinelandii*, solo se conoce parcialmente de la función de SagS y HptB en la biosíntesis de alginatos. No se conoce a cabalidad a) la interacción entre ellas y, b) como se relacionan con el sistema de doble componente GacS/GacA conformando el sistema de multikinases encabezado por GacS.

### **4 HIPÓTESIS**

SagS actúa sobre HptB estableciendo la rama HptB del sistema de multikinases GacS que en *A. vinelandii* controla la biosíntesis de alginatos.

### **5 OBJETIVOS**

#### **5.1 Objetivo general**

- Estudiar la histidín-kinasa SagS involucrada en la síntesis de alginato en *A. vinelandii*.

#### **5.2 Objetivos específicos**

- Complementar genéticamente a la mutante *EsagS*
- Determinar el efecto de la sobre-expresión de *sagS* en la cepa silvestre E
- Confirmar cuantitativamente la interacción entre SagS y HptB
- Establecer la jerarquía genética entre SagS y HptB

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Material biológico

CEPA	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA	CULTIVO
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> , $\Delta$ <i>lacU169</i> , <i>hsdR17</i> , <i>resA1</i>	Gibco BRL	LB / 37°C
<i>E. coli</i> S17	<i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> , <i>hsdM<sup>t</sup></i> , <i>recA</i> RP4 2-Tc::Mu-Km::Tn7(Tp <sup>R</sup> /Sm <sup>R</sup> ) $\lambda$ - pir	Wilson et al, 1995	LB/37°C/ Sm <sup>20</sup>
<i>Azotobacter vinelandii</i> AEIV (E)	Cepa tipo Nal <sup>R</sup>	Larsen y Haugh (1971)	BS / 30°C / Nal <sup>10</sup>
AEIV <i>sagS</i> ::Gm	Derivada de la cepa AEIV la cual tiene una inserción en el gen <i>sagS</i> de un casete de resistencia a gentamicina.	Hernández- Campos, 2019	BS / 30°C / Nal <sup>10</sup> , Gm <sup>0.5</sup> .
AEIV <i>sagS</i> ::Gm <i>melA</i> :: <i>sagS</i>	Derivada de la mutante AEIV <i>sagS</i> ::Gm donde se integró el vector pUMATc <i>sagS</i> . Cepa complementada en cis.	Este trabajo.	BS / 30°C / Nal <sup>10</sup> , Gm <sup>0.5</sup> , Tc <sup>40</sup> .
AEIV <i>sagS</i> ::Gm pBBR1MCS-2- <i>sagS</i>	Derivada de la mutante AEIV <i>sagS</i> ::Gm donde se incorporó el vector pBBR1MCS- 2- <i>sagS</i> . Cepa complementada en trans.	Este trabajo.	BS / 30°C / Nal <sup>10</sup> , Gm <sup>0.5</sup> , Km <sup>2</sup> .
AEIV <i>sagS</i> <sup>+</sup>	Derivada de la cepa AEIV donde se incorporó el vector pBBR1MCS-2- <i>sagS</i> . Cepa sobreexpresada del gen <i>sagS</i> .	Este trabajo.	BS / 30°C / Nal <sup>10</sup> , Km <sup>2</sup> .
AEIV <i>hptB</i> <sup>+</sup>	Derivada de la cepa AEIV. Cepa sobreexpresada del gen <i>hptB</i> .	Meneses- Carbajal, 2019.	BS / 30°C / Nal <sup>10</sup> , Km <sup>2</sup> .
AEIV <i>sagS</i> ::Gm/ <i>hptB</i> <sup>+</sup>	Derivada de la cepa AEIV <i>hptB</i> <sup>+</sup> donde se incorporó el plásmido mutagénico pGEM <i>sagS</i> ::Gm	Este trabajo.	BS / 30°C / Nal <sup>10</sup> , Gm <sup>0.5</sup> , Km <sup>2</sup> .

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
pJET	Vector de clonación, Amp <sup>R</sup>	ThermoFisher Scientific
pUMATc	Vector integrativo que permite recombinar material genético en el locus neutro <i>melA</i> de <i>A. vinelandii</i> . Derivado del pUMA. Tc <sup>R</sup>	Cocotl-Yáñez (2014)
pBBR1MCS-2	Vector de expresión, con múltiples sitios de clonación y amplio rango de hospedero. Km <sup>R</sup>	Kovach et al. 1995
pRK2013	Para movilización de plásmidos no transmisibles por sí solos. Km <sup>R</sup>	Ditta, Stanfield, Corbin, & Helinski, 1980

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA	LONGITUD (pb)
gacS2com Fw	5'- CCAGGGTGCGGCTCCAGTCG -3'	20
gacS2D	5'- TCGCCCTCGTCCTGCTGGTGGTGT -3'	24
GmFw_140	5'- GTGCAAGCAGATTACGGTGA -3'	20
GmRv_308	5'- GCATCATTCGCACATGTAGG -3'	20
gacS2R	5'- TCGAGGGGCGGCGGGCTGAGG -3'	20
gacS2 Th Rv	5'- GAGCTCTCATGTGGCATTTCGCCCC -3'	24
gacS2 Th Fw	5'- GGATCCCGGATGCTGACCCGGCCG -3'	24
gacS2com Rv	5'- GGGAGGGCCGGGTGGTCA -3'	18
M13F	5'- GTTTTCCCAGTCACGAC -3'	17
M13F23	5'- CCCAGTCACGACGTTGTAAAA -3'	21
Tc Rv	5'- GCTAGCAGCACGCCATAGTGA -3'	21

## 6.2 Medios de cultivo

### 6.2.1 Medio Luria-Bertani (LB)

Reactivo	Cantidad (g/L)
NaCl	5.0
Extracto de levadura	5.0
Peptona de caseína	10.0
Agar (para medio sólido)	15.0

### 6.2.2 Medio Burk-Sacarosa (BS)

Reactivo	Cantidad (g/L)
$K_2HPO_4$	8.0
$KH_2PO_4$	2.0
Sacarosa	200.0
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7.3
$Na_2SO_4$	18.3
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	16.0
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5.0
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.2
Agar (para medio sólido)	15.0

### 6.2.3 Medio de competencia (CM)

Reactivo	Cantidad (g/L)
$K_2HPO_4$	8.0
$KH_2PO_4$	2.0
Sacarosa	200.0
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7.3

Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18.3
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	16.0
Agar (para medio sólido)	15.0

#### 6.2.4 Medio para conjugación (BSLB)

Reactivo	Volumen (ml)
BS sólido preparado	125.0
LB sólido	35.0
Glucosa 20%	1.6
Acetato de amonio 1.5M	1.6

#### 6.2.5 Solución de ácido sulfúrico- boratos.

Reactivo	
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	975 ml
Solución de Boratos (para 100ml)	25.0 ml
- Ácido bórico	24.7g
- KOH	10.09g

#### 6.2.6 Solución de carbazol 0.1%

Reactivo	
Carbazol	0.1g
Etol	100ml

## 6.3 Metodologías

### 6.3.1 Preparación de células competentes de *E.coli*

- Transferir una colonia de una placa fresca crecida 16-20 hrs a 37°C a 5 ml de LB contenido en un tubo e incubar toda la noche (12-18 horas) con agitación.
- Inocular 50 ml de medio LB contenido en un matraz de 125 ml con 0.5 ml del cultivo.
- Incubar aproximadamente 3 horas a 37°C hasta que la  $DO_{650nm}$  sea de 0.4-0.5.

NOTA: siempre mantener en hielo las células. Nunca vortexear las células, para resuspender se debe hacer suavemente con la punta de la misma micropipeta, succionando repetidas veces.

- Transferir el cultivo a tubos de polipropileno, enfriar en hielo durante 10 min.
- Recuperar las células por centrifugación, 4000 rpm/10 min.
- Resuspender el cultivo en 15 ml de  $CaCl_2$  0.1M frío y reposar en hielo 15 min.
- Centrifugar a 4000 rpm 10 min a 4°C.
- Resuspender la pastilla en 1.5 ml de  $CaCl_2$  0.1M 14% de glicerol frío por cada 25 ml de cultivo original\*
- Alicuotar 0.2 ml y almacenar a -70°C.

### 6.3.2 Preparación de células competentes de *A. vinelandii*

- A partir de una placa fresca de la cepa, inocular una placa de medio CM e incubar 48 horas a 30°C (primer pase).
- Realizar segundo pase masivo en placa de CM e incubar a 30°C por 48 horas.
- Recuperar las células y realizar lavado con  $MgSO_4$  10 mM a 13000rpm por 10 minutos.

### 6.3.3 Extracción de plásmido por lisis alcalina

- Inocular 3 ml de medio LB (con el antibiótico necesario) con la cepa de interés e incubar overnight a 37°C y 200 rpm.

- Centrifugar el cultivo y lavar la pastilla celular con 1 ml de  $\text{MgSO}_4$  10 mM.
- Adicionar 100  $\mu\text{l}$  de solución I (Glucosa 50 mM, EDTA 10 Mm, 25  $\mu\text{l}$  TRIS a pH8).
- Adicionar 200  $\mu\text{l}$  de solución II preparada al momento (80%  $\text{H}_2\text{O}$ , 10% NaOH 2N, 10% SDS) y mezclar suavemente por inversión, dejar reposar en hielo por 10 minutos.
- Adicionar 150  $\mu\text{l}$  de solución III (40 ml de  $\text{CH}_3\text{COOK}$  3 M, ajustar a pH 4.8 con ácido acético glacial), dejar reposar por 10 minutos y centrifugar 15 minutos a 13000 rpm.
- En un tubo nuevo recuperar el sobrenadante y adicionar 10  $\mu\text{l}$  de sílica.
- Reposar 10 minutos y centrifugar 2 minutos a 13000 rpm.
- Lavar el pellet con 500  $\mu\text{l}$  de New Wash (tres veces).
- Secar y resuspender en 30  $\mu\text{l}$  de RNAsa diluida, incubar 1 hora a 37°C.

#### **6.3.4 Extracción de plásmido por perclorato**

- Centrifugar 3 ml de cultivo. Resuspender en 1 ml de  $\text{MgSO}_4$  10 mM, centrifugar y decantar.
- Resuspender completamente en 175  $\mu\text{l}$  de TES.
- Agregar 25  $\mu\text{l}$  de lisozima.
- Mantener 20 minutos en hielo.
- Adicionar 400  $\mu\text{l}$  de agua helada.
- Incubar 15 minutos a 73°C.
- Centrifugar 15 minutos a 12000 rpm. Mantener en hielo por 5 minutos.
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
- Adicionar 60  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaClO}_4$  5 M y 600  $\mu\text{l}$  de isopropanol; mezclar.
- Centrifugar 15 minutos a 12000 rpm. Mantener en hielo por 5 minutos.
- Lavar el pellet con etanol al 70%, completar 3 lavados.
- Secar y resuspender en 30  $\mu\text{l}$  de RNAsa diluida e incubar 1 hora a 37°C.

### **6.3.5 Extracción de plásmido por MAXIPREP**

- Partir de un cultivo de 40 ml con el antibiótico de selección.
- Centrifugar y lavar con MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Resuspender en 1.5 ml de solución I, agregar 3.5 ml de solución II y mezclar por inversión.
- Dejar reposar durante 10 minutos en baño de hielo, posteriormente adicionar 2.5 ml de solución III. Mezclar suavemente.
- Reposar 10 minutos en hielo y centrifugar por 10 minutos a 6000 rpm.
- Transferir el sobrenadante a tubos limpios y adicionar 5 ml de isopropanol, mantener 10 minutos en hielo y centrifugar a 6000 rpm.
- Decantar el sobrenadante y lavar la pastilla con etanol al 70% (tres veces)
- Dejar secar la pastilla y adicionar 200 µl de RNAsa diluida e incubar overnight a 37°C.

### **6.3.6 Transformación de *A. vinelandii***

- Mezclar 200 µl de células competentes con una cantidad adecuada de ADN plasmídico.
- Verter el volumen en una placa de CM, dejar secar e incubar 48 horas a 30°C.
- Recuperar el tapete celular y realizar lavados con MgSO<sub>4</sub> 10 mM hasta retirar el alginato.
- Resuspender la pastilla celular en MgSO<sub>4</sub> 10 mM o en medio BS líquido.
- Plaquear con ayuda de perlas en cajas de BS con el antibiótico de selección, dejar secar e incubar 48 horas a 30°C.
- Seleccionar posibles recombinantes.

### **6.3.7 Transformación de *E. coli***

- Mezclar 200 µl de células competentes con un volumen adecuado de ADN.
- Dejar reposar 30 minutos en hielo.
- Dar un choque de calor de 2 minutos a 42°C.
- Adicionar 1 ml de LB e incubar 1 hora a 37°C con agitación.

- Plaquear en medio de selección.

### **6.3.8 Extracción de ADN genómico (total) de *A.vinelandii***

- A partir de una placa fresca, cosechar las células y lavar con  $\text{MgSO}_4$  10 mM hasta retirar el alginato.
- Resuspender la pastilla en 450  $\mu\text{l}$  de TES 50/20 (TRIS EDTA), adicionar 50  $\mu\text{l}$  de lisozima e incubar 30 minutos a 37°C.
- Adicionar 30  $\mu\text{l}$  de proteasa e incubar 30 minutos a 37°C.
- Adicionar 50  $\mu\text{l}$  de SDS al 10% e incubar 15 minutos a 37°C.
- Adicionar 100  $\mu\text{l}$  de NaCl 5 M e incubar 10 minutos a 65°C, sin retirar adicionar 80  $\mu\text{l}$  de CTAB (previamente incubada a 65°C) e incubar durante 20 minutos.
- Extraer con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 y vortexear; centrifugar durante 5 minutos a 13000 rpm.
- Recuperar el sobrenadante y adicionar 10  $\mu\text{l}$  de sílica, dejar reposar durante 10 minutos y centrifugar 2 minutos a 13000 rpm.
- Lavar el pellet con 500  $\mu\text{l}$  de New Wash (tres veces).
- Secar y resuspender en 30  $\mu\text{l}$  de RNAsa diluida, incubar 1 hora a 37°C.

### **6.3.9 Extracción de banda de gel de electroforesis.**

- Correr en gel de electroforesis la muestra y teñirlo con BET.
- Visualizar el gel en el transiluminador a baja potencia y cortar la banda deseada.
- Colocar la banda en un tubo eppendorf previamente pesado y pesar la banda.
- Adicionar 3 volúmenes del peso de la banda de NaI 6M e incubar a 50°C hasta que la banda se haya disuelto completamente.
- Adicionar 10  $\mu\text{l}$  de sílica e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente (invertir 2-3 veces cada 2 minutos).
- Centrifugar 1 minuto a 13000rpm.

- Decantar el sobrenadante y agregar 500 µl de New Wash y resuspender suavemente. Repetir hasta completar 3 lavados.
- En el último centrifugado quitar el exceso de solución.
- Dejar secar la pastilla y resuspender en un volumen adecuado.

### **6.3.10 Conjugación *A. vinelandii* – *E. coli***

- Día 1:
  - o Realizar un pre-inóculo de la cepa receptora de *A. vinelandii* en 25 ml de BS adicionado con el antibiótico adecuado. Crecer el cultivo de 18-24 horas, 30°C y 200 rpm.
- Día 2:
  - o Inocular la cepa receptora de *A. vinelandii* en un matraz con 25 ml de BS sin antibiótico tomando 500µl del pre-inóculo del día anterior.
  - o Preparar un pre-inóculo de las cepas donadora y helper de *E. coli* en 5 ml de LB con antibiótico.
- Día 3:
  - o Inocular la cepa donadora y helper en 3 ml de LB sin antibiótico + 500 µl del pre-inóculo, incubar a 37°C con agitación durante 3 horas.
  - o Lavar las células de la cepa receptora de *A. vinelandii* con MgSO<sub>4</sub> 10 mM estéril hasta retirar el alginato.
  - o Preparar la siguiente mezcla:
    - Cepa receptora 300 µl
    - Cepa donadora 100 µl
    - Cepa helper\* 100 µl
  - o Verter la mezcla en medio de conjugación BSLB, incubar a 30°C de 24-48 horas.
- Cosechar el tapete celular con 1 ml de BS o MgSO<sub>4</sub> 10 mM estéril. Realizar diluciones e inocular en medio BS selectivo.

\*para conjugación triparental se utiliza el plásmido helper pRK2013; para biparental se omite el uso de la cepa helper.

#### **6.3.11 Cuantificación de alginato por el método de carbazol.**

- Inocular 25 ml de medio BS adicionado con el antibiótico correspondiente con cultivo fresco de *A. vinelandii* e incubar por 24 horas/30°C/200 rpm.
- A partir del pre-cultivo inocular 25 ml de medio sin antibiótico por triplicado. Incubar 48 horas/30°C/200 rpm.
- Centrifugar 3 ml del cultivo (depende de la cantidad de paquete celular que se obtenga) y colectar el sobrenadante; las células lavar con 1 ml de EDTA 0.01M, vortexear y centrifugar a 4000 rpm/10 min; colectar el sobrenadante con lo obtenido anteriormente.
- Las células usarlas para la determinación de proteína por el método de Lowry.
- Precipitar el sobrenadante con 2 volúmenes de isopropanol, centrifugar 4000 rpm/10 minutos.
- Dejar secar el precipitado y resuspender en un volumen adecuado de agua PISA.
- Colocar 1.5 ml de solución de ácido sulfúrico-boratos en tubos de ensaye de vidrio (previamente sumergido en hielo)
- Añadir cuidadosamente 175 µl de la solución problema. -Correr al mismo tiempo una curva estándar de alginato con las concentraciones 50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 µg de alginato/ml-.
- Adicionar 50 µl de carbazol 0.1% y vortexear suavemente.
- Colocar los tubos en un baño María a 50°C por 30 minutos. (debe desarrollarse un color violeta; si el color es café, el alginato está contaminado y se debe repetir la determinación).
- Calibrar el espectrofotómetro con el blanco a 530 nm. Leer la absorbancia para cada una de las muestras problema, así como de la curva estándar.
- Reportar en mg de alginato/mg de proteína.

### 6.3.12 Cuantificación de proteína por el método de Lowry.

- Lavar el paquete celular con  $\text{MgSO}_4$  10 mM y resuspender en 1 ml de la misma solución.
- Tomar un volumen adecuado de la solución problema y llevarlo a un volumen total de 200  $\mu\text{l}$  con  $\text{MgSO}_4$  10 mM. Al mismo tiempo correr una curva de calibración con BSA a las concentraciones de 50, 100, 200 y 400  $\mu\text{g/ml}$ .
- Adicionar 1 ml de solución reactiva recién preparada y dejar reposar por 10 minutos.
- Adicionar 100  $\mu\text{l}$  de reactivo de Folin (dilución 1:2 con agua) y reposar 30 minutos.
- Leer la absorbancia a 625 nm de cada muestra.

### 6.3.13 Condiciones de amplificación de PCR.

REACTIVO	VOLUMEN	REACTIVO	VOLUMEN
ADN molde	0.5 $\mu\text{l}$	ADN molde	0.5 $\mu\text{l}$
Buffer	2.5 $\mu\text{l}$	Buffer GC	5.0 $\mu\text{l}$
dNTP's 1.25 mM	4.0 $\mu\text{l}$	dNTP's 1.25mM	4.0 $\mu\text{l}$
Oligo Fw	0.5 $\mu\text{l}$	Oligo Fw	0.5 $\mu\text{l}$
Oligo Rv	0.5 $\mu\text{l}$	Oligo Rv	0.5 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	18 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O	15 $\mu\text{l}$
Dream TaqPol	0.2 $\mu\text{l}$	Phusion	0.2 $\mu\text{l}$

- Por 25 ciclos.

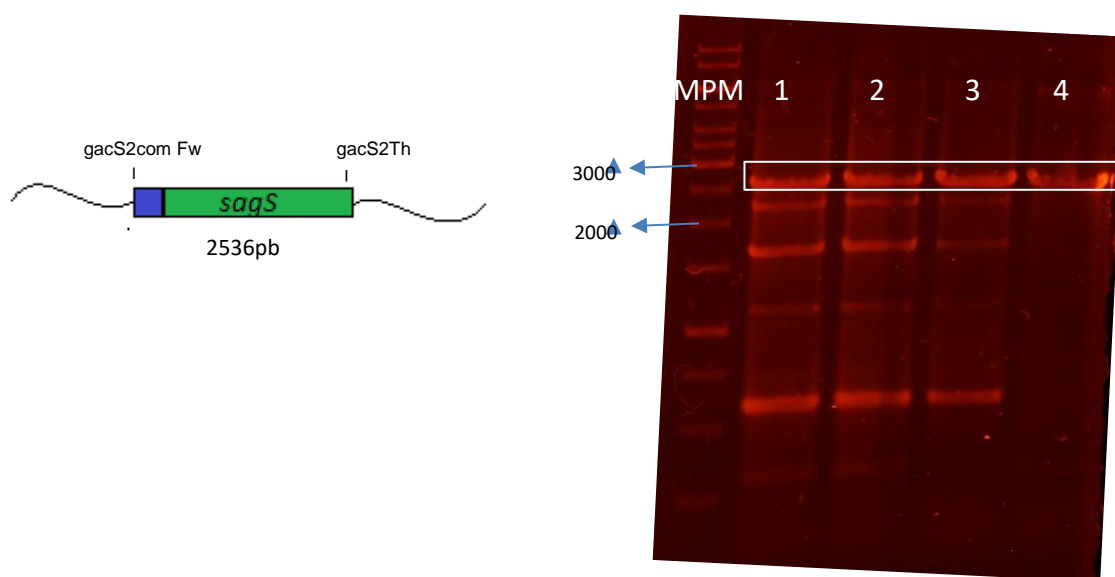
## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 7.1 Construcción del plásmido integrativo pUMATcsagS para la complementación en cis.

Se amplificó el gen *sagS* y su región reguladora a partir de la cepa E (Fig. 7) usando las siguientes condiciones:

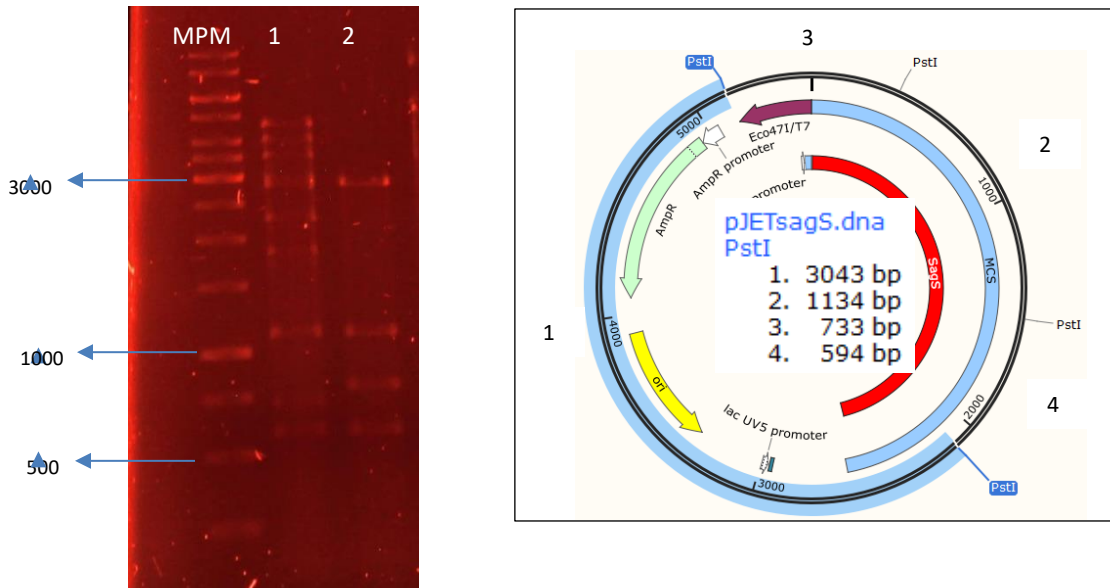
Oligonucleótidos	Tm	Tiempo de extensión	Fragmento esperado
gacS2com Fw gacS2Th Rv	56°C	1.5 minutos	2536 pb

NOTA: Se uso las condiciones para la enzima Phusion y la reacción fue adicionada con un 5% de DMSO



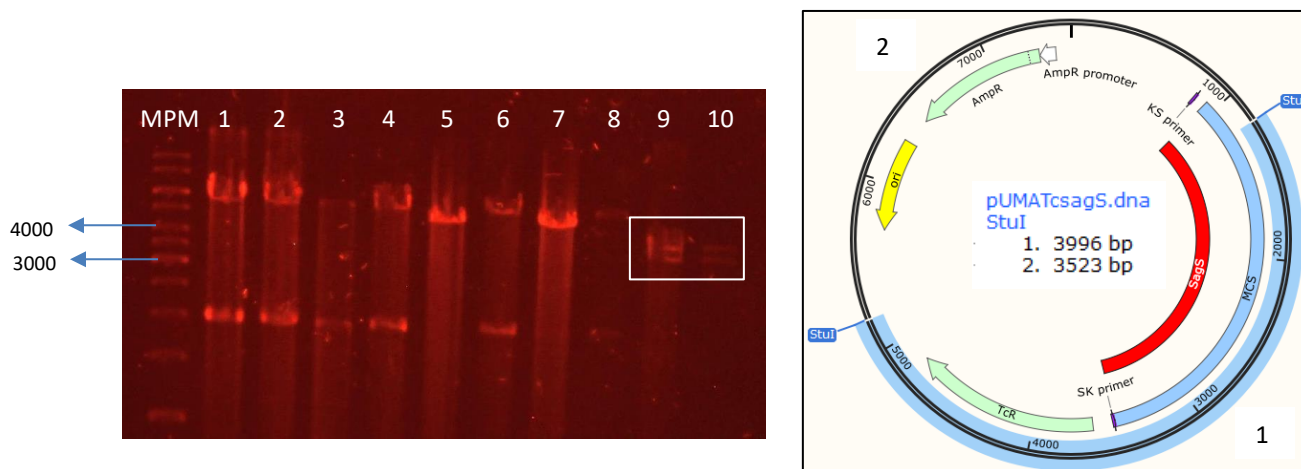
**Figura 7. Amplificación del gen *sagS* junto a su región reguladora.** Izquierda: esquema del gen *sagS* (verde) y de su región reguladora (azul). Derecha: MPM, marcador de peso molecular de 1 kb, carril 1-3: amplificación del gen *sagS* y su región reguladora a partir de la cepa E, carril 4: control positivo.

Después de la purificación de la banda, el amplicón se clonó en el vector de mantenimiento pJET y la construcción se comprobó mediante mapeo de restricción con *Pst*I.(Fig. 8)



**Figura 8. Patrón de restricción del plásmido pJETsagS con la enzima de restricción *Pst*I.** **Izquierda:** MPM, marcador de peso molecular de 1kb; **carril 1- 2:** pJETsagS. **Derecha:** Mapa de restricción de pJETsagS cortado con *Pst*I.

Posteriormente se realizó un corte con la enzima *Bgl*II para extraer el gen *sagS* junto a su región reguladora y subclonarlo en el plásmido integrativo pUMATc (previamente desfosforilado), generando el plásmido pUMATcsagS, comprobado mediante restricción con *Stu*I. En la Fig. 9 se observan los fragmentos correspondientes al corte con *Stu*I (3996 y 3523 pb).

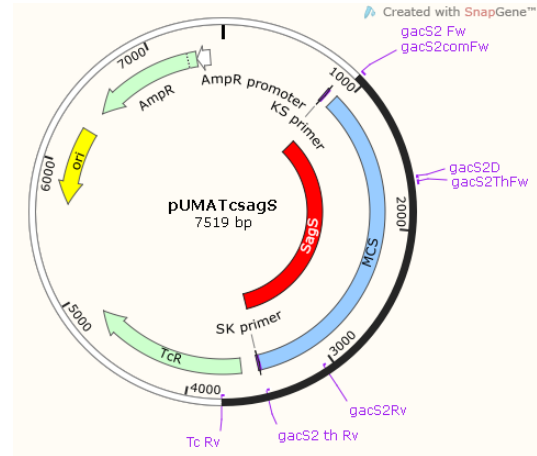
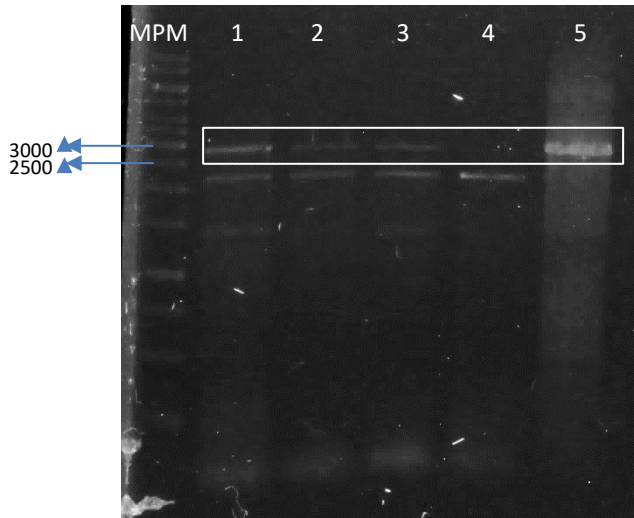


**Figura 9. Verificación de la construcción pUMATcsagS mediante mapeo de restricción con *StuI*.** Izquierda: MPM: marcado de peso molecular de 1kb. Carril 9 y 10: cepas candidatas pUMATcsagS con los fragmentos esperados. Derecha: Mapa de restricción de pUMATcsagS cortado con *StuI*.

## 7.2 Obtención y comprobación de la cepa complementada en cis.

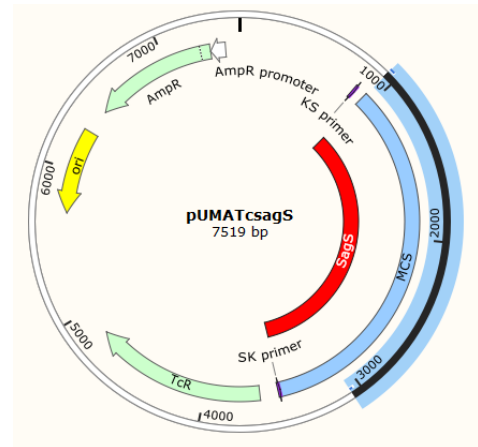
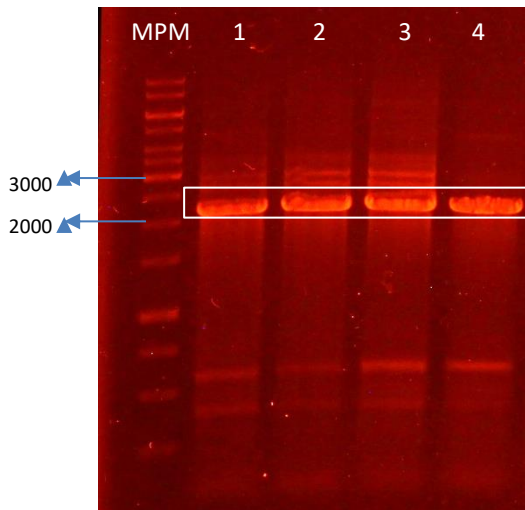
Se realizó la transformación del plásmido integrativo pUMATcsagS en células competentes de *EsagS::Gm*; se recuperaron transformantes en las que pudo establecerse recombinación del gen *sagS* en el locus neutro *meIA* de la cepa *EsagS::Gm*; se comprobó mediante análisis por PCR con un par de oligonucleótidos que hibridan con el gen *sagS* y con el casete de resistencia a tetraciclina (Fig. 10) y con otro par de oligonucleótidos que reconocen al gen *sagS* (Fig. 11) bajo las siguientes condiciones:

Oligonucleótidos	Tm	Tiempo de extensión	Fragmento esperado
gacS2 Fw Tc Rv	60°C	3.5 minutos	2830 pb



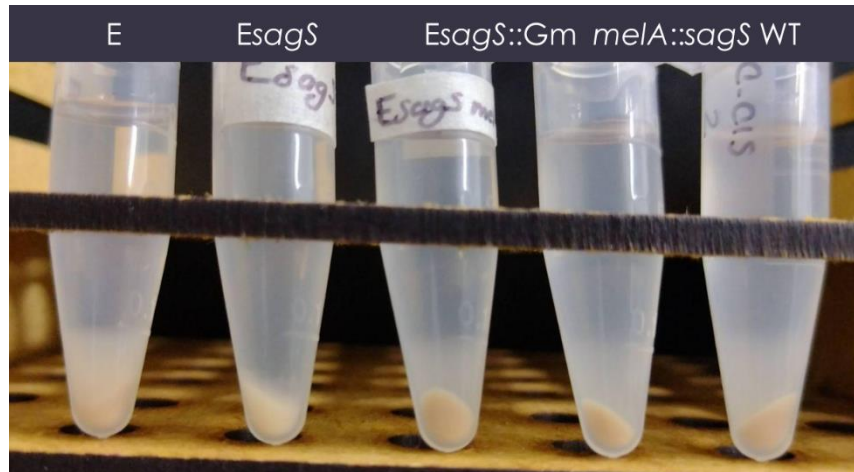
**Figura 10. Comprobación por PCR de la complementación en *cis* de la mutante *EsagS* con oligonucleótidos que reconocen parte del casete de resistencia de tetraciclina y del gen *sagS*.** **Izquierda:** MPM, marcador de peso molecular de 1 kb; **carril 1-3:** amplificación del fragmento entre los oligos *gacS2Fw* y *Tc Rv*; **carril 4:** control negativo de la amplificación; **carril 5:** control positivo de la amplificación (plásmido *pUMATcsagS*). **Derecha:** esquema del fragmento obtenido con las condiciones mencionadas anteriormente (fragmento resaltado en color negro).

Oligonucleótidos	Tm	Tiempo de extensión	Fragmento esperado
gacS2 Fw gacS2 Rv	69°C	3 minutos	2127 pb



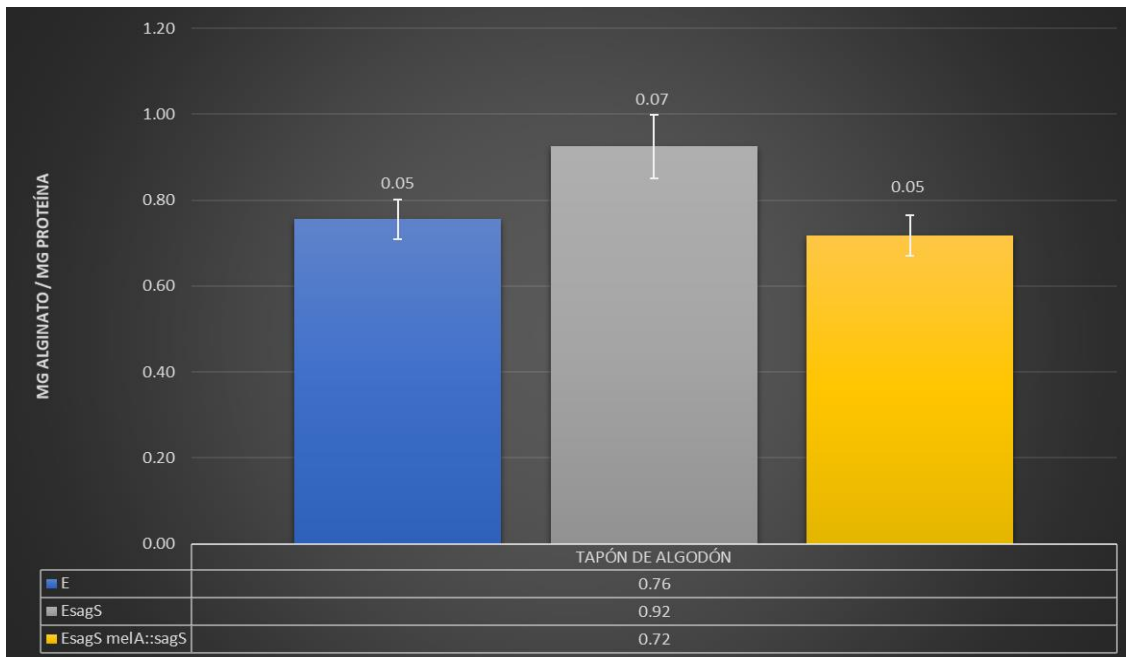
**Figura 11. Comprobación por PCR de la complementación en cis de la mutante *EsagS* con oligonucleótidos que se aparean con el gen *sagS*.** Izquierda: MPM, marcador de peso molecular de 1 kb, carril 1-3: amplificación del gen *sagS* (2127pb), carril 4: control positivo de la amplificación. **Derecha:** esquema del fragmento obtenido con las condiciones de amplificación mencionadas (fragmento resaltado en color negro y azul).

Se realizaron cultivos líquidos para poder determinar el fenotipo comparando el de la cepa silvestre con la mutante (Fig. 12).

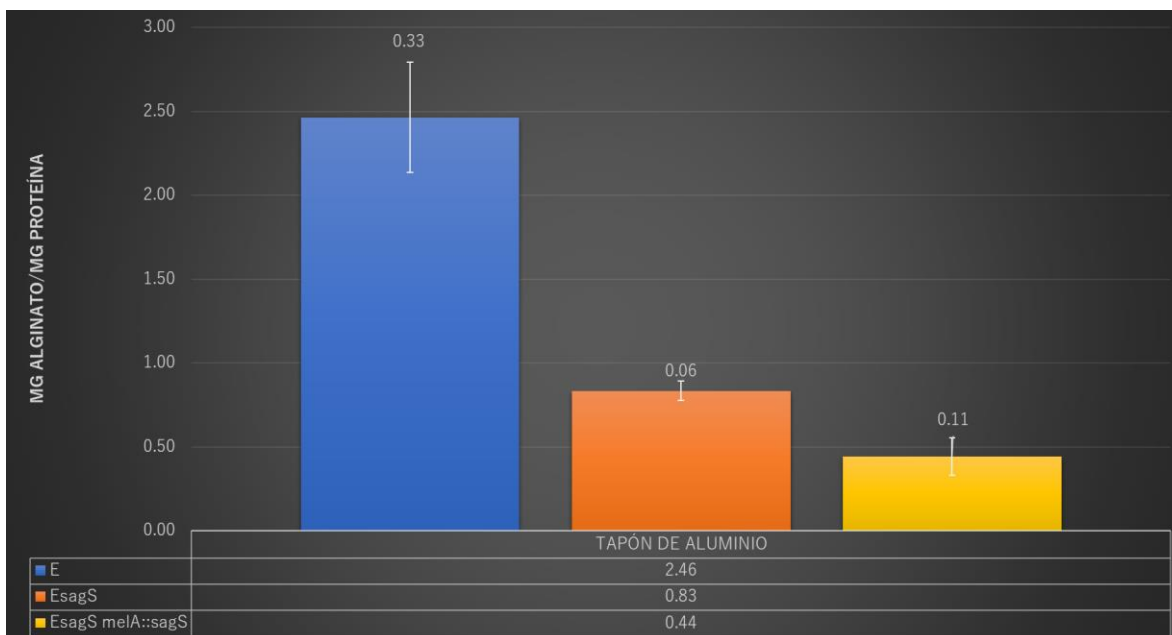


**Figura 12. Fenotipo de producción de alginato. De izquierda a derecha:** cepa silvestre, E, cepa mutante *EsagS* y, tres cepas complementadas en *cis*, *EsagS::Gm melA::sagS* WT.

La cuantificación de alginato se efectuó bajo dos condiciones de cultivo: con tapón de algodón, que promueve una mayor transferencia de oxígeno (Fig. 13), y tapón de aluminio donde el nivel de oxigenación es menor (Fig. 14). Se observó que la mutación en *sagS* no tiene efecto alguno cuando se realiza el cultivo con tapón de algodón (con una mayor transferencia de oxígeno), mientras que el efecto contrario se puede observar cuando el cultivo tiene una baja transferencia de oxígeno (tapón de aluminio). Esta observación se establece como una perspectiva de interés para futuros trabajos donde se pudiera explicar este hecho. Por otro lado, la mutante complementada en *cis* no restauró el fenotipo bajo ninguna condición, se tendría que revisar que el gen esté expresándose o que no tenga alguna mutación.



**Figura 13.** Cuantificación de alginato por el método de carbazol. Cepa silvestre, E, la cepa mutante, *EsagS* y la cepa complementada en cis, *EsagS melA::sagS* con tapón de algodón.



**Figura 14.** Cuantificación de alginato por el método de carbazol. Cepa silvestre, E, la cepa mutante, *EsagS* y la cepa complementada en cis, *EsagS melA::sagS* con tapón de aluminio.

### 7.3 Construcción del plásmido integrativo pBBR1MCS-2sagS para la complementación en *trans*.

El gen *sagS* junto con su región reguladora se clonó en el vector pBBR1MCS-2, la transformación se llevó a cabo en *E.coli* DH5 $\alpha$  y se comprobó mediante mapeo de restricción con *KpnI* (Fig. 16). Al momento de realizar la ligación pudieron obtenerse las dos orientaciones clonación de *sagS* (Fig. 15); la orientación no fue relevante puesto que *sagS* podía expresarse a partir de su promotor nativo o a partir del promotor del propio vector.

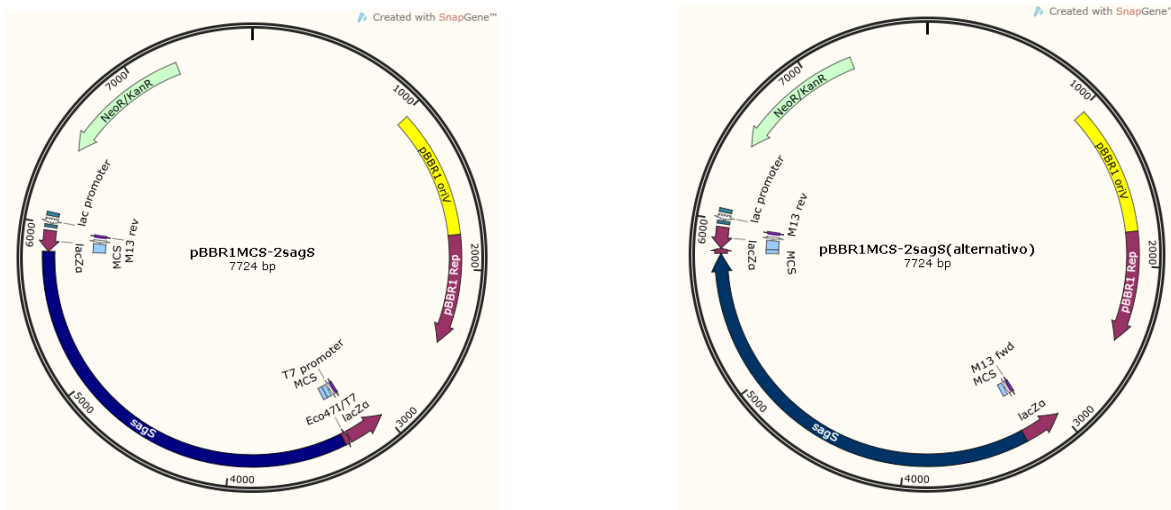
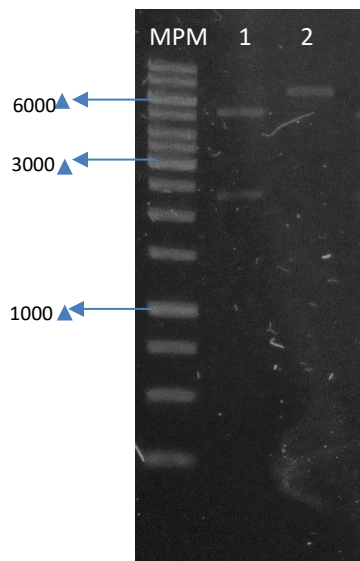
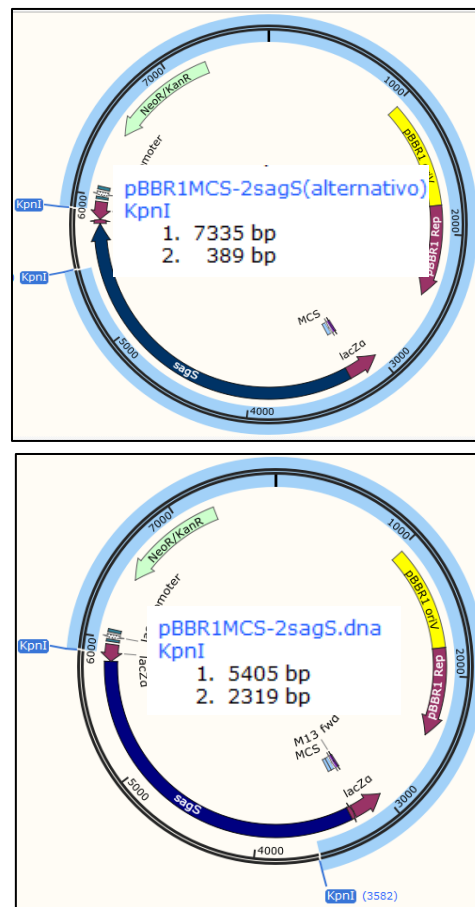


Figura 15. Mapas de las dos posibles orientaciones del gen *sagS* en el vector pBR1MCS-2.



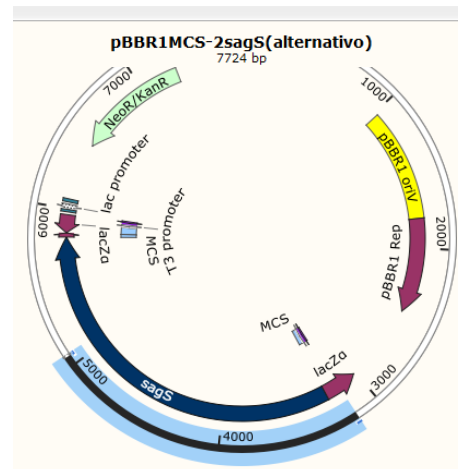
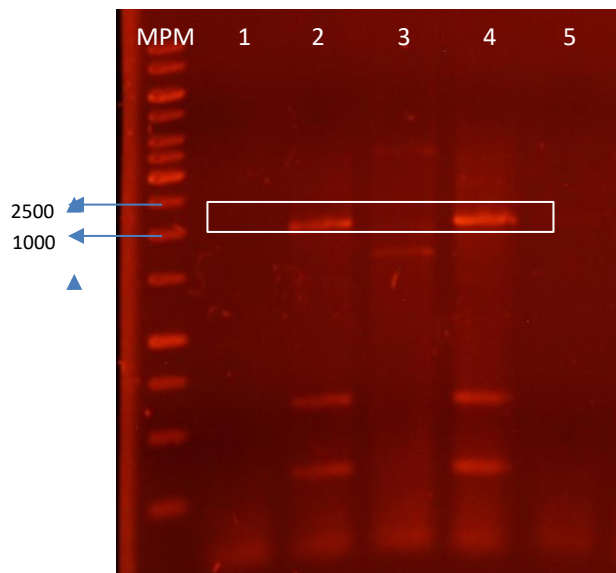
**Figura 16. Comprobación de la construcción pBBR1MCS-2sagS mediante restricción con *KpnI*.** Izquierda: MPM, marcador de peso molecular de 1 kb, carril 1 y 2: cepas con ambas orientaciones del gen *sagS* en el vector pBBR1MCS-2-*sagS*. Derecha: Mapa de restricción de pBBR1MCS-2-*sagS* (con *sagS* en ambas orientaciones) cortados con *KpnI*.



#### 7.4 Obtención y comprobación de la cepa complementada en *trans*.

El plásmido pBBR1MCS-2*sagS* se transformó en *E. coli* S17.1 y se realizó una conjugación biparental con la mutante *EsagS*, las transconjugantes candidatas se probaron mediante PCR (Fig. 15) con las siguientes condiciones:

Oligonucleótidos	Tm	Tiempo de extensión	Fragmento esperado
gacS2 Fw gacS2 Rv	55°C	2 minutos	1925 pb



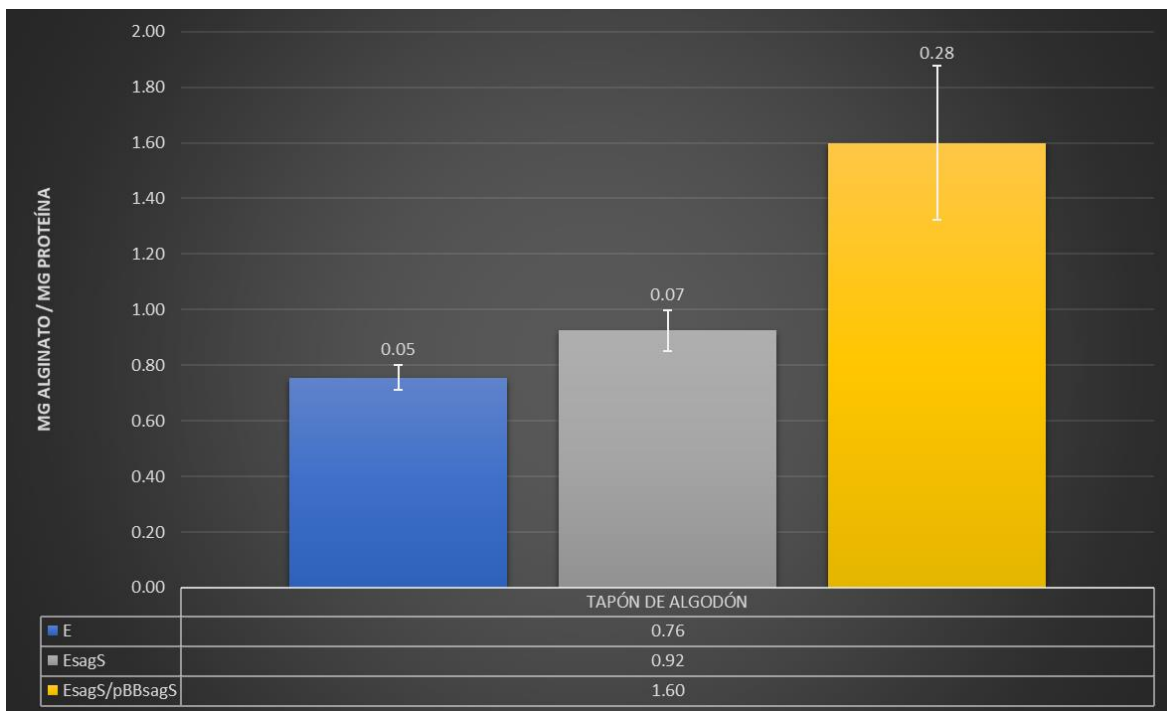
**Figura 17. Comprobación por PCR de la complementación en trans de la mutante E *sagS* con oligonucleótidos que reconocen parte del gen *sagS*.** Izquierda: MPM, marcador de peso molecular de 1 kb; carril 1-3: amplificación del gen *sagS* (1925 pb), amplificando sólo en el carril 2; carril 4: control positivo de la amplificación, carril 5: control negativo de la amplificación. **Derecha:** esquema del fragmento a amplificar con dicho par de oligonucleótidos (fragmento resaltado en negro y azul).

Posteriormente de la verificación genética, se realizaron cultivos líquidos para poder determinar el fenotipo y compararlo con los de las cepa silvestre y mutante (Fig. 18). Como puede verse en la figura 18 en la cepa complementada solo se ve una producción mínima de alginato. Es importante aclarar que los cultivos para este experimento se realizaron con tapones de aluminio.

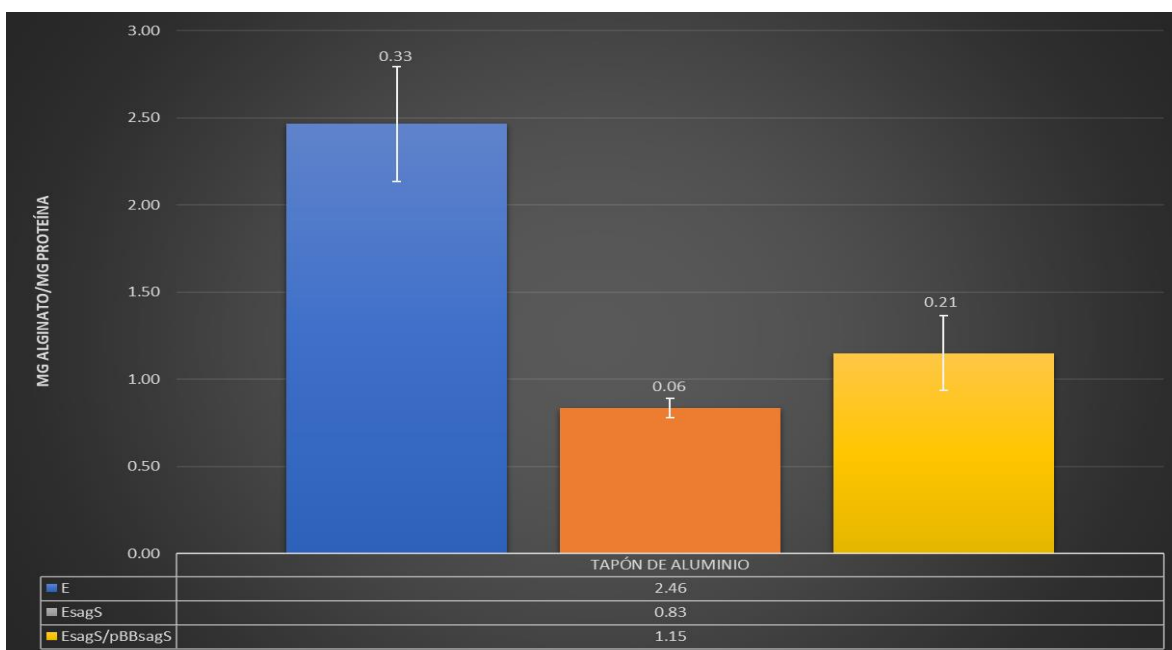


**Figura 18. Fenotipo de producción de alginato. De izquierda a derecha:** cepa silvestre, E, cepa mutante, *EsagS* y de la cepa complementada en *trans*, *EsagS/pBBsagS*.

La cuantificación de alginato en las cepas anteriores se efectuó en las dos condiciones previamente descritas (tapón de algodón, Fig. 19, y tapón de aluminio, Fig. 20). Se observó que el plásmido complementa de forma parcial en cultivos con tapón de aluminio (Fig 20), una de las posibles razones de este resultado es la poca estabilidad de los plásmidos en *A. vinelandii*. Al realizar el experimento en cultivos con tapón de algodón volvimos a observar que la mutación en *sagS* no tiene efectos, además que la presencia del alelo *sagS* en el plásmido tiene un efecto marginal en el aumento de la producción de alginato (Fig. 19).



**Figura 19. Cuantificación de alginato por el método de carbazol.** Cepa silvestre, E, la cepa mutante, *EsagS* y la cepa complementada en trans, *EsagS/pBBR1MCS-sagS* con tapón de algodón.

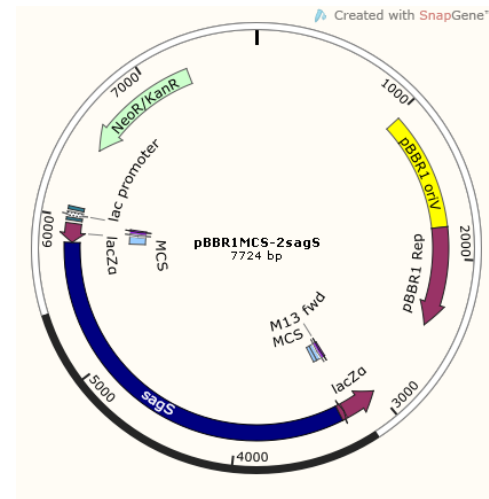
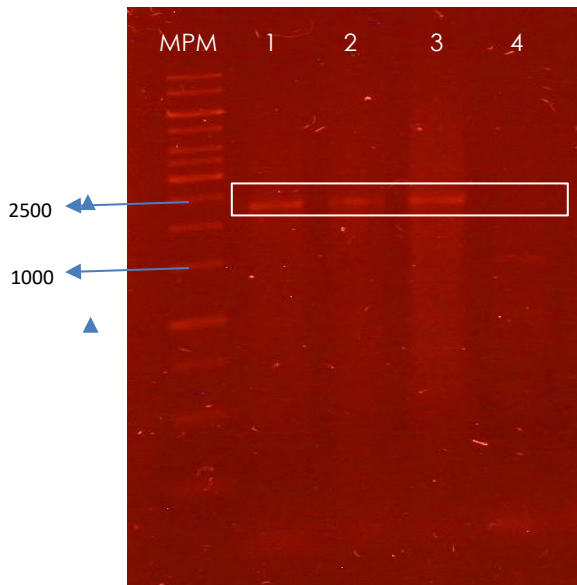


**Figura 20. Cuantificación de alginato por el método de carbazol.** Cepa silvestre, E, la cepa mutante, *EsagS* y la cepa complementada en trans, *EsagS/pBBR1MCS-sagS* con tapón de aluminio.

## 7.5 Obtención y verificación de la cepa en la que se sobreexpresa *sagS* (*EsagS*<sup>+</sup>)

Teniendo la construcción pBBR1MCS-2*sagS* se decidió realizar la sobreexpresión en la cepa E (*EsagS*<sup>+</sup>) mediante conjugación biparental y las candidatas se comprobaron mediante PCR (Fig. 21) con las siguientes condiciones:

Oligonucleótidos	Tm	Tiempo de extensión	Fragmento esperado
M13F23 gacS2R	55°C	2.5 minutos	2272 pb



**Figura 21. Comprobación por PCR de la cepa *EsagS*<sup>+</sup> usando oligonucleótidos que reconocen parte del vector y al gen *sagS*.** Izquierda: MPM, marcador de peso molecular de 1 kb, carril 1 y 2: amplificación del fragmento generado (2272 pb), carril 3: control positivo de la amplificación, carril 4: control negativo de la amplificación. Derecha: esquema de la amplificación con los oligonucleótidos anteriormente mencionados, sólo se tiene una las dos orientaciones disponibles (fragmento marcado en color negro).

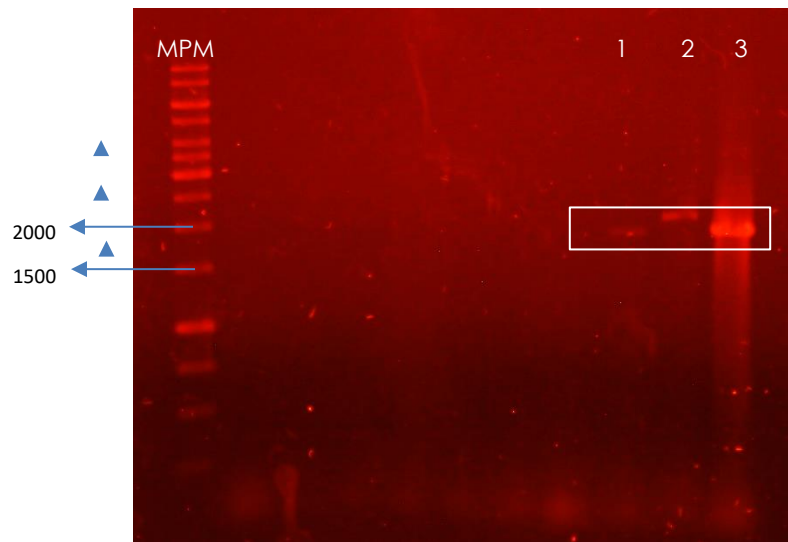
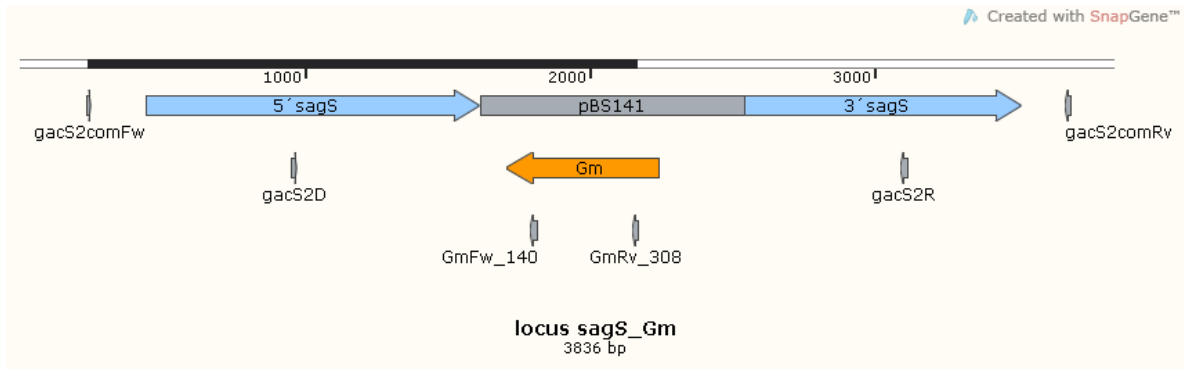
Se determinó cuantitativamente la producción de alginato. En los cultivos con tapón de aluminio (baja concentraciones de oxigenación) parece ser que la dosis génica proporcionada por el plásmido pBBR1MCS-2-*sagS* no fue suficiente para establecer un efecto de sobreexpresión (*sagS*<sup>+</sup>) en la cepa silvestre (Fig. 23). De igual forma, con una mayor presencia de oxígeno (tapón de algodón) no se observa el efecto de la sobreexpresión de *sagS* (Fig. 24). Como en caso anterior, esto puede ser consecuencia de la inestabilidad del plásmido, por problemas de expresión o por ambas.

### 7.6 Obtención y verificación de la cepa *EhptB*<sup>+</sup>/*sagS*

Recordando que la rama HptB en *P. aeruginosa* y en *A. vinelandii* parecen solo estar conformadas por SagS y a HptB, y teniendo en cuenta los experimentos realizados por Meneses-Carbajal (2019), en los que la sobreexpresión de *hptB* se aumenta considerablemente de la producción de alginato, se había planteado la hipótesis de que una mutación en *sagS* disminuiría el efecto de sobreexpresión de *hptB*, ya que no habría fosforilación de HptB.

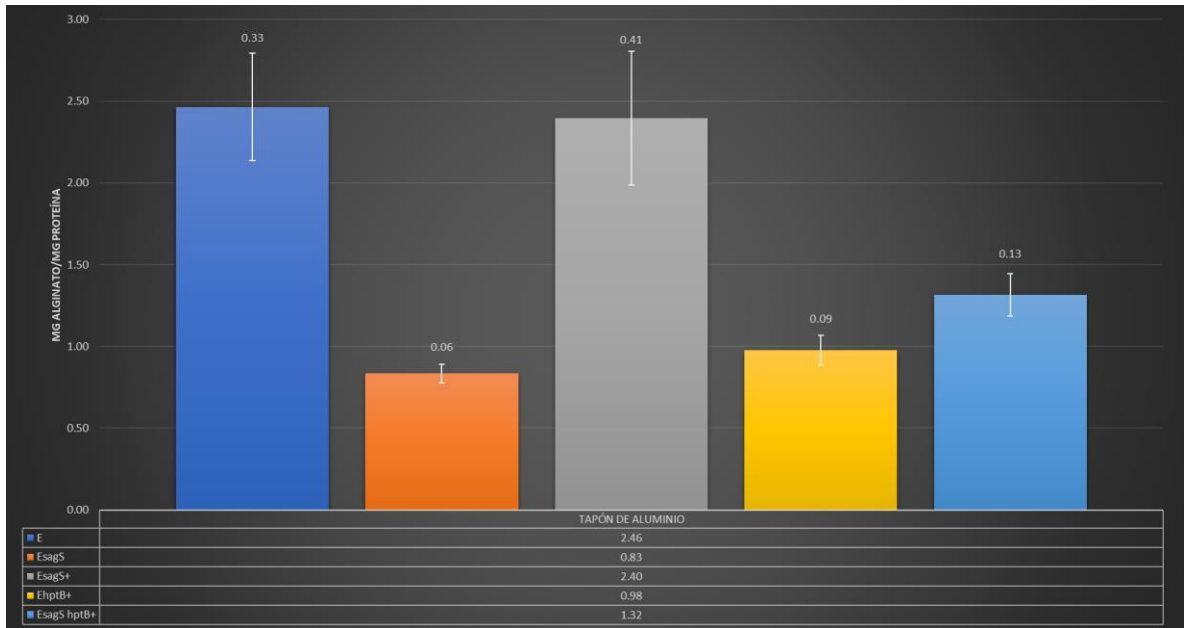
Para probar la hipótesis anterior, se generó una mutación de *sagS* en la cepa que sobreexpresa a *hptB*. Se obtuvieron células competentes de la cepa donde se sobreexpresa *hptB* (*EhptB*<sup>+</sup>) y se realizó su transformación con el plásmido mutagénico pGEM*sagS*::Gm; la mutación se comprobó mediante PCR (Fig. 22) con las siguientes condiciones:

Oligonucleótidos	Tm	Tiempo de extensión	Fragmento esperado
gacS2comFw Gm308	67°C	2 minutos	1938 pb



**Figura 22. Comprobación por PCR de la mutación del gen *sagS* en la cepa *EhptB*<sup>+</sup> con oligonucleótidos que reconocen parte del casete de resistencia a Gm y del gen *sagS*.** MPM: marcador de peso molecular de 1 kb, carril 1: amplificación del fragmento entre *sagS* y el oligo que reconoce parte del casete de Gm (1938pb); carril 2: amplificado que no tiene el tamaño esperado para el par de oligonucleótidos utilizados; carril 3: control positivo de la amplificación.

La mutación de *sagS* en la recombinante donde se sobreexpresa *hptB* no mostró efecto en cultivos con tapón de aluminio (Fig. 23). Aún más, no se observó efecto positivo de la sobreexpresión de *hptB* en estas condiciones de cultivo. Los datos mostrados en la figura 23 evidencian un efecto negativo de la sobreexpresión de *hptB* en la producción de alginatos.



**Figura 23. Cuantificación del alginato por el método de carbazol de la cepa silvestre, E, cepa mutante, *EsagS*, cepa sobreexpresada de *sagS* y *hptB*, *EsagS*<sup>+</sup> y *EhptB*<sup>+</sup> respectivamente y, la cepa *EhptB*<sup>+</sup>/*sagS* con tapón de aluminio.**

Con una mayor transferencia de oxígeno (tapón de algodón) si se puede ver claramente el efecto de la sobreexpresión de *hptB* (Fig. 24) al aumentar cerca de tres veces la producción de alginato (lo que coincide con lo que previamente se había descrito) e indicando que la regulación de *hptB* es susceptible a las condiciones de oxigenación del cultivo; además de que la mutación de *sagS* revierte el efecto de la sobreexpresión de *hptB*, lo anterior sugiere que *SagS* es necesario (bajo estas condiciones de cultivo) para que *HptB* lleve a cabo sus funciones reguladoras sobre la síntesis de alginato, lo cual coincide con la hipótesis que se había planteado en este trabajo de que *SagS* tiene una mayor jerarquía genética que *HptB*.

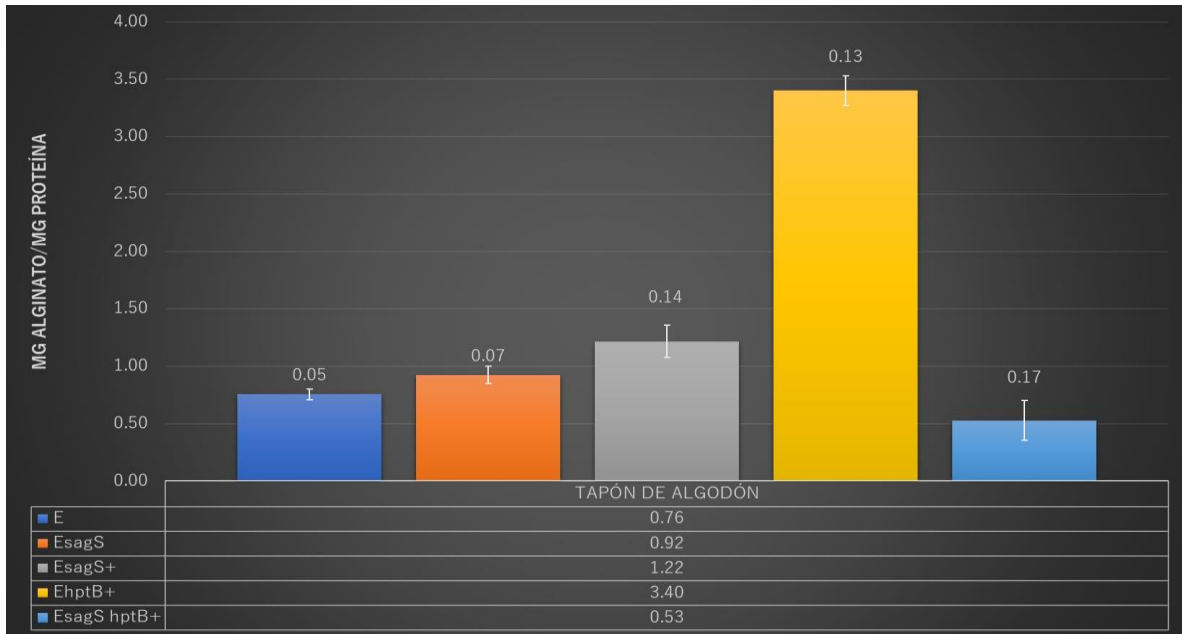
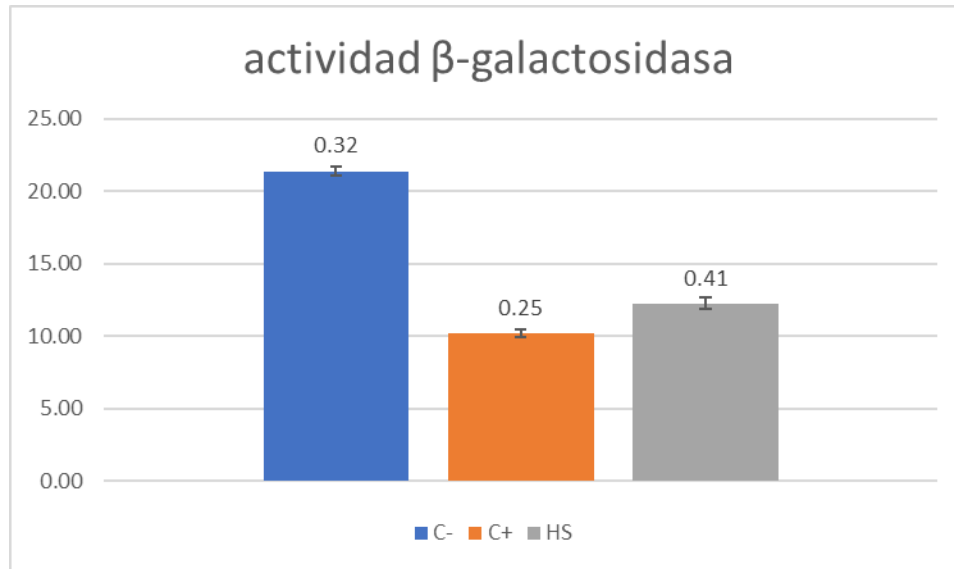


Figura 24. Cuantificación del alginato por el método de carbazol de la cepa silvestre, E, cepa mutante, *EsagS*, cepa sobreexpresada de *sagS* y *hptB*, *EsagS*<sup>+</sup> y *EhptB*<sup>+</sup> respectivamente y, la cepa *EhptB*<sup>+</sup>/*sagS*; los matraces se cubrieron con tapón de algodón

### 7.7 Ensayos de doble híbrido cuantitativo de SagS y HptB.

La interacción entre SagS y HptB se comprobó cuantificando la actividad del reportero *lacZ* del sistema de doble híbrido LexA, dicha proteína consta de dos dominios, uno que reconoce y se une a un sitio operador específico en el ADN y otro que funciona como un dominio de dimerización, este último puede eliminarse y reemplazarse con otra proteína o fragmento de proteína que puedan interactuar. Debido a que el represor está activo solo como un dímero, la dimerización de las proteínas probadas permitirá que el LexA quimérico se una a su sitio de operador y reprima la transcripción del gen reportero *lacZ*. La interacción se evidenció mediante la cuantificación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa.

En la figura 25 puede observarse que existe una interacción entre SagS y HptB, siendo la actividad semejante a la del control positivo, lo que concuerda con lo que Meneses-Carbajal en 2019 observó de forma cualitativa.



**Figura 25. Cuantificación de la actividad β-galactosidasa del sistema de doble híbrido usando SagS y HptB para establecer si existe interacción entre ellas.** Se observa que la actividad de HptB-SagS (HS) es semejante a la del control positivo (interacción entre GacS-RetS).

## **8 CONCLUSIÓN**

- Tanto SagS como HptB son sensibles en su actividad reguladora a la concentración de O<sub>2</sub>.
- SagS tiene mayor jerarquía genética que HptB.
- Existe una interacción entre SagS y HptB.

## **9 PERSPECTIVAS**

- Evaluar la función de SagS bajo diferentes concentraciones de oxígeno en los cultivos con condiciones controladas.

## 10 REFERENCIAS.

1. Ahumada-Manuel, C.L., Martínez-Ortiz, I.C., Hsueh B.Y., Guzmán, J., Waters, C.M., Zamorano-Sánchez, D., Espín, G., Núñez, C. (2020) Increased c-di-GMP levels lead to the production of alginates of high molecular mass in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. 202(24) <https://doi.org/10.1128/JB.00134-20>
2. Barba-Ostria, C. (2014). Los sistemas de dos componentes: circuitos moleculares versátiles. *TIP Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 17(1): 62-76, <https://bit.ly/2Yau5oV>
3. Bhuwan, M, Lee, HJ, Peng, HL, Chang HY. (2012). Histidine-containing phosphotransfer protein-B (HptB) regulates swarming motility through partner-switching system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain. *J Biol Chem*. 13;287(3):1903-14. doi: 10.1074/jbc.M111.256586.
4. Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S., Espín, G. (2000). The GacS sensor kinase regulates alginate and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. 182(9):2624-2628 <https://bit.ly/39ZBQ2Z>
5. Castañeda, M., Sánchez, J., Moreno, S., Núñez, C., Espín, G. (2001). The global regulators GacA and  $\sigma^S$  form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. 183(23): 6787-6793. DOI: 10.1128/JB.183.23.6787-6793.2001
6. Castillo, T. (2013). La acetilación de los alginatos sintetizados por *Azotobacter vinelandii* en función de la tensión de oxígeno disuelto y de la velocidad específica de crecimiento. *Universidad Autónoma de México*. (Tesis). <https://bit.ly/3oq7vDa>
7. Castillo, T., García, A., Padilla-Córdova, C., Díaz-Barrera, A., Peña, C. (2020) Respiration in *Azotobacter vinelandii* and its relationship with the synthesis of biopolymers. *Electronic Journal of Biotechnology*. 48(2020) 36-45. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.08.001>
8. Clementi, F. (1997). Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Critical Reviews in Biotechnology*. 17(4):327-361. doi:10.3109/07388559709146618

9. Dingemans, J., Al-Feghali, R.E., Lau, G.W., Sauer, K. (2019). Controlling chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections by strategically interfering with the sensory function of SagS. *Molecular Microbiology*. 111(5): 1211-1228. doi:10.1111/mmi.14215
10. Francis, V., Porter, S. (2019). Multikinase networks: two-component signaling networks integrating multiple stimuli. *Annu. Rev. Microbiol*, 73:199-223. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115846>
11. Freoni, L. (2005) Microbiología: básica, ambiental y agrícola. *Universidad de la República. Uruguay*. <https://bit.ly/3D4MuSQ>
12. Galicia\_Jiménez, M., López-Garrido, S., Ávila-Serrano, N., Murialdo, S. (2017). Sistema de dos componentes: un diálogo molecular entre las bacterias ruminales y partículas de alimento (plantas forrajeras). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 20(3): 413-418. <https://bit.ly/3D83MhB>
13. Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D., Espín, G. (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories*. 6(7) doi:10.1186/1475-2859-6-7
14. Gao, R., Stock, A. (2009) Biological insights from structures of Two-Component proteins. *Annu. Rev. Microbiol*. 63:133-54. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073214
15. Hernández-Campos, L. (2019). Estudio del papel del gen Avin:15460 (gacS2) involucrado en la síntesis de alginatos en *A. vinelandii*. (Tesis). *Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*.
16. Hernández-Carmona, G., Rodríguez Montesinos, Y., Arvizu-Higuera, D., Reyes-Tisnado, R., Murillo-Álvarez, J., Muñoz-Ochoa, M. (2012). Avances tecnológicos en la producción de alginatos en México. *Ing. Investi. Y Tecnol*. 13(2)155-168. <https://bit.ly/3mdabS5>
17. Hrabak, E.M, Willis, D.K (1992) The *lemA* gene required for pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean is a member of a family of two-component regulators. *J. Bacteriol*. 174: 3011-3020

18. Jean-Pierre, F, Tremblay, J., Déziel, E., Broth versus surface-grown cells: differential regulation of RsmY/Z small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* by the Gac/HptB system. *Front. Microbiol.* 7:2168. doi: 10.3389/fmicb.2016.02168
19. Jnawali, A.D., Ojha, R.B., Marahatta, S. (2015). Role of *Azotobacter* in soil fertility and sustainability -a review. *Adv Plants Sgri Res.* 2(6): 250-253. DOI: 10.15406/apar.2015.02.00069
20. Kennedy, C., Rudnick, P., MacDonald, M., Melton, T. (2015). *Azotobacter*. Bergey's Manual of Systematics of Archea and Bacteria. Bergey's Manual Trust. 1-33. DOI: 10.1002/9781118960608.gbm01207
21. Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F., Haas, D. (2008). Gac/Rsm signal transduction pathway of proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. 67(2): 241-253. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.06042.x
22. Nagpal, P., Safri, S., Reddy, M., Das, H. (1989). Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology.* 171(6): 3133-3138. doi/10.1128/jb.171.6.3133-3138.1989
23. Noar, J., Bruno-Bárcena, J.M. (2018). *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology.* 164:421-436. DOI 10.1099/mic.0.0006
24. Núñez, C., et. Al. (2022) Genetic regulation of alginate production in *Azotobacter vinelandii* a bacterium of biotechnological interest: a mini-review. *Front. Microbiol.* 13:845473. Doi: 10.3389/fmicb.2022.845473
25. Page, W., Sadoff, H. (1975) Relationship between calcium and uronic acids in the encystment of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology.* 122(1): 145-151. doi.org/10.1128/jb.122.1.145-151.1975
26. Ponce, B., Urtuvia, V., Maturana, N., Peña, C., Díaz-Barrera, A. (2021). Increases in alginate production and transcription levels of alginate lyase (*alyA1*) by control of the oxygen transfer rate in *Azotobacter vinelandii* cultures under diazotrophic conditions. *Electronic Journal of Biotechnology,* 52: 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.04.007>

27. Plunkett, M., Knutson, C., Barney, B. (2020). Key factors affecting ammonium production by an *Azotobacter vinelandii* strain deregulated for biological nitrogen fixation. *Microb Cell Fact.* 19:107. doi: 10.1186/s12934-020-01362-9
28. Petrova, O, Sauer, K. (2011). SagS contributes to the motile-sessile switch and acts in concert with BfiSR to enable *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Journal of Bacteriology.* 193: 6614-6628. doi:10.1128/JB.00305-11
29. Sadoff, H. (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol Rev.* 39(4):516-539. <https://bit.ly/3FbEeCk>
30. Stock, A., Robinson, V., Goudreau, P. (2000). Two-Component Signal Transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 69:183-215
31. Urtuvia, V., Maturana, N., Acevedo, F., Peña, C. (2017). Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production. *World J Microbiol Biotechnol.* 33:198. DOI 10.1007/s11274-017-2363-x
32. Valentini M, Laventie B-J, Moscoso J, Jenal U, Filloux A. (2016) The diguanylate cyclase HsbD intersects with the HptB regulatory cascade to control *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and motility. *PLoS Genet.* 12(10): e1006354. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006354>