



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Papel de la Diguanilato ciclasa A (*dgcA*) de
Azospirillum brasilense en la formación de
biopelícula y colonización al trigo**

Tesis para obtener el título de

BIÓLOGO

PRESENTA:

FELIPE DE JESÚS PALACIOS CASTAÑEDA

TUTOR: D. en C. ALBERTO RAMIREZ MATA

Laboratorio de la Interacción Microorganismo-Planta
Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas.
ICUAP

ABRIL 2014



CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES DIRECTOS	8
JUSTIFICACIÓN	10
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVOS.....	11
MATERIAL Y MÉTODOS	12
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES.....	36
PERSPECTIVAS.....	37
AGRADECIMIENTOS.....	38
BIBLIOGRAFIA.....	39
GLOSARIO	42

INTRODUCCIÓN

Se puede considerar la rizósfera como la región del suelo donde se forma un entorno influido bioquímicamente por los exudados nutritivos de las raíces de plantas, dónde los microorganismos proliferan y compiten estableciendo relaciones simbióticas patógenas o benéficas para la planta. Éste último fenómeno lo podemos encontrar en las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento en Plantas (PGPR), que se han adaptado a éste nicho ecológico estableciendo comunicación química y física con la planta, proporcionándole beneficios como transporte de nutrientes, producción de fitohormonas, fijación de nitrógeno, y protección frente a patógenos (Ingraham y cols., 1998; Anaya y cols., 2001) por lo cual éste tipo de microorganismos se han propuesto para sustituir a los fertilizantes químicos nocivos para la salud y el medio ambiente; las PGPR incluyen géneros variados cómo *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Azoarcus*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Serratia* y *Azospirillum*, el cual es considerado como el género más estudiado en este tipo de bacterias (Bashan et al., 2004).

Azospirillum es un género bacteriano perteneciente a la subclase alfa de las proteobacterias. Se le encuentra en una amplia distribución geográfica en climas tropicales o climas fríos y ha sido aislada de gran variedad de plantas como el trigo, la fresa, el maíz, entre otros de importancia agroeconómica.

Hasta la fecha no se conoce el mecanismo exacto por el cual la bacteria produce un efecto benéfico a la planta, pero la idea más aceptada es que la suma de diversas propiedades de la bacteria causan un cambio morfológico del sistema radicular de la planta, *Azospirillum* produce fitoreguladores cómo ácido indol acético (C₁₀H₉NO₂), sideróforos y óxido nítrico (NO), también fija nitrógeno a amonio bajo condiciones microaeróbicas; el efecto causado en la planta es el aumento en el tamaño de los pelos radiculares reincidiendo en una mayor absorción de agua, nutrientes o fertilizantes produciendo granos de mejor calidad (Caballero-Mellado, 2000).

Para ejercer su efecto benéfico en la planta hospedera, el primer paso es la colonización de la planta que implica el reconocimiento y movilización hacia los exudados radiculares, para tal efecto *Azospirillum* cuenta al menos con un sistema de quimiotaxis bien desarrollado, cabe mencionar también que los sustratos metabolizables son los principales atrayentes para esta bacteria, tal fenómeno es conocido como taxis energética, en la cual las señales que activan el movimiento provienen dentro del citoplasma durante el ciclo de Krebs que guían a la bacteria a una planta donde encontrará una concentración adecuada de oxígeno y de alimento y empezará los procesos para el cambio a estilo de vida sésil (Alexandre y cols., 2000).

Colonización de *Azospirillum brasilense* a la Planta

La colonización a la planta consta de dos pasos: el primero es una asociación reversible mediada por adhesinas y en colaboración con el flagelo polar la bacteria se adhiere a la planta, el segundo paso es un anclaje definitivo e irreversible que depende de modificaciones en la expresión genética. Después de 8 horas la bacteria ha sentido la información suficiente para saber si es un lugar propicio para su crecimiento y replicación (alimento, humedad) posteriormente se inicia la etapa de anclaje definitivo: se inicia la división celular, y se sintetiza material fimbrial y exopolisacáridos para formar la matriz de la biopelícula (Michiels y cols., 1991; Caballero-mellado, 2000). Pero para poder permanecer en este nicho ecológico se ha observado en algunos estudios que *azospirillum* tiene que formar biopelículas para ser más competitiva frente a otros microorganismos.

La biopelícula es una comunidad sésil de microorganismos de una o varias especies confinados en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) cuya presencia depende de su fondo genético, los SPE pueden incluir exopolisacáridos, ácidos nucleicos extracelulares como parte de la estructura de la matriz, lípidos, y proteínas que le sirven de protección frente a desecación, a antibióticos y a otras bacterias que compiten por el mismo nicho ecológico, también funciona como una red atrapando los nutrientes provenientes de la planta (revisado en Wimpenny, 2009).

La formación de la biopelícula consta de 6 etapas: primero es la unión inicial a la superficie donde participan proteínas de superficie bacteriana(adhesinas), flagelos, fimbrias de tipo I, IV, Tad; la segunda etapa es la 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, en tercer lugar comienza la migración para formar colonias en multicapa, seguida por la producción de la matriz extracelular con la síntesis de exopolisacáridos y seguir con la quinta etapa que es la maduración de la biopelícula y por último continuar con la dispersión de la biopelícula para la colonización de nuevos sitios (Figura 1) (Conover y cols., 2009; Karatan y Watnick, 2009), es hasta que la población alcanza la fase estacionaria que podemos decir que la biopelícula ha madurado y es posible observar la formación de estructuras tridimensionales, a veces en forma de hongo, la cual contiene canales de agua que sirven para distribuir los nutrientes a las células más distantes de la superficie y para la expulsión de los desechos metabólicos. La mayoría de bacterias presentes en el planeta se encuentran formando biopelículas, las cuales no son homogéneas, sino que son comunidades de distintas especies bacterianas que subsisten juntas uniendo sus capacidades e incluso se ha reportado que el DNA extracelular también se usa para compartir los genes en eventos de transformación (revisado en Flemming and Wingende, 2010).

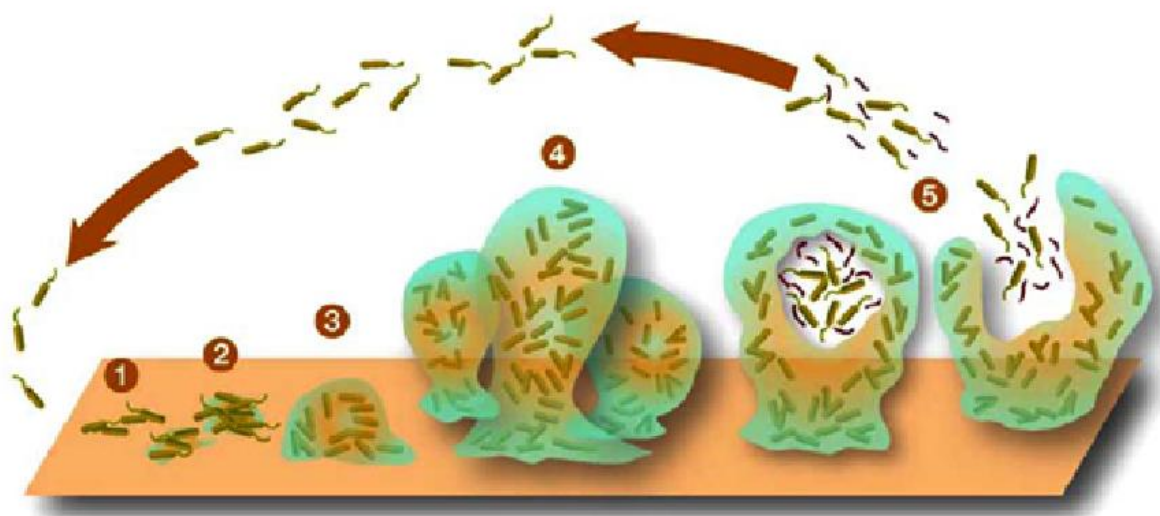


Figura 1.- Formación de la biopelícula. 1.- las bacterias se asocian al sustrato. 2.- comienza la secreción de exopolisacáridos y formación de monocapas. 3.- Formación de multicapas. 4.- Las colonias de bacterias forman estructuras tridimensionales dejando canales para el libre tránsito de nutrientes. 5.- Maduración de la biopelícula, bacteria de vida libre se han dividido adentro de las estructuras tridimensionales, la estructura se rompe y quedan libres para reiniciar el ciclo.

Regulación Intracelular de la Formación de la Biopelícula

Durante los últimos años se ha propuesto que el segundo mensajero Ácido di-(3'-5') guanosin monofosfato (di-GMPc) está involucrado en los procesos del cambio de vida planctónico-sésil regulando autoagregación, fijación, dispersión, formación de biopelícula, secreción de exopolisacáridos, sedentarismo, virulencia y movilidad en un amplio rango de bacterias principalmente bacterias Gram-negativas (revisado en Xiqui y cols., 2003; Behyan y cols., 2006). El di-GMPc es sintetizado a partir de dos moléculas de GTP por la enzima Diguamilato ciclase (DGC) que contiene el dominio aminoácido GGDEF y de manera contraria es degradado por proteínas con actividad de Fosfodiesterasa (PDE) contenedoras del dominio EAL y en menor medida HD-GYP convirtiendo al di-GMPc en una forma lineal inactiva (Newell y cols., 2011; Krasteva y cols., 2012), las interacciones entre estas dos enzimas controlan las concentraciones en la poza intracelular del di-GMPc, cuando la concentración intracelular del segundo mensajero aumenta se inicia el

programa genético para el estilo de vida sésil. Ambas enzimas cuentan además con una diversidad de dominios de respuesta a estímulos ambientales como la luz (Tarutina y cols., 2006), el oxígeno (Wu y cols., 2013), o bien, a modificaciones post traduccionales como la fosforilación por histidinas-cinasas (Berg y cols., 2007): una vez que el di-GMPc es sintetizado se une a una proteína efectora modificándola alostéricamente para que interaccione con un blanco y reincida en los resultados previamente comentados cambiando al estilo de vida sésil (Figura 2). En algunos casos se ha visto que aunque el número de genes con dominios GGDEF es elevado en el genoma de las bacterias, se ha propuesto que cada DGC está involucrada en vías de señalización independientes debido a que el efecto causado por deleciones individuales no puede ser compensado por las otras DGCs del genoma, sin embargo, pocas de esas enzimas han sido caracterizadas a detalle (revisado en Karatan y Watnick, 2009). Así mismo se ha observado que algunas DGCs tienen una señalización compartimentalizada ubicándose cerca de las proteínas efectoras, por ejemplo, las DGCs fosforiladas forman agregados o acumulaciones cerca de la membrana o del motor del flagelo según sea su función (revisado en D'Argenio y Miller, 2004; revisado en Guvener y Harwood, 2007).

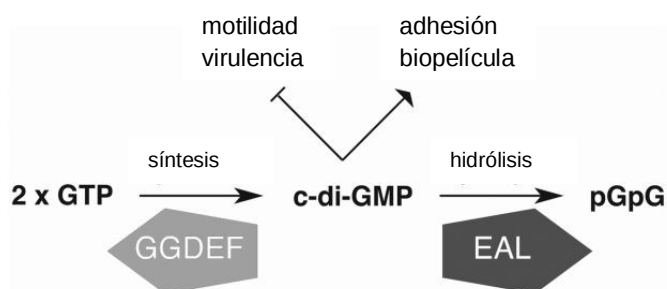


Figura 2.- Regulación de di-GMPc. es la representación esquemática de la síntesis y la hidrólisis de di-GMPc por los dominios GGDEF y EAL respectivamente. Figura adaptada de Jenal y cols., 2006.

ANTECEDENTES DIRECTOS

En el laboratorio de la Interacción Bacteria-Planta del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM) se identificó una secuencia codificante de una Diguamilato ciclase putativa a partir de una banca genómica de *A. brasilense* Sp7 (Aguilar-Piedras, 2008) a partir de la cual se obtuvo la mutante *A. brasilense* 1428-A (*dgcA::Gm*) por interrupción con un cassette de resistencia a Gentamicina (Fig. 3), el fenotipo presentó una disminución en la movilidad, en la producción de biopelícula y exopolisacáridos. En base a estos resultados se complementó la mutación con el gen *dgcA* silvestre recuperándose solo la producción de biopelícula y exopolisacáridos, pero no la movilidad por lo que se sugiere que esta mutante tiene un efecto polar. Durante el avance de éste proyecto se liberó la secuencia del genoma completo de *A. brasilense* Sp245 y en un estudio bioinformático se identificaron 18 fragmentos de lectura abiertos para DGCs putativas entre las cuales se encontraba el gen *Azobr_140288* que presenta una alta homología con nuestro gen de estudio tanto en secuencia como en el contexto genético, rio abajo de este gen se encuentran genes que codifican para proteínas implicadas en movilidad y quimiotaxis como son: una proteína con dominio PAS/PAC, una proteína receptora de grupos metilo, y una histidina-cinasa (figura 3). Estos datos sugieren que tanto nuestro gen de estudio como los mencionados antes podrían formar un operón, posible razón por la cual no se restableció el fenotipo de movilidad en esta mutante (Romero, 2012).

Con base a estos resultados nos propusimos estudiar el papel que desempeña el gen *dgcA* en la colonización y analizar la formación de la biopelícula con técnicas de biología celular, microscopia electrónica y de epifluorescencia.

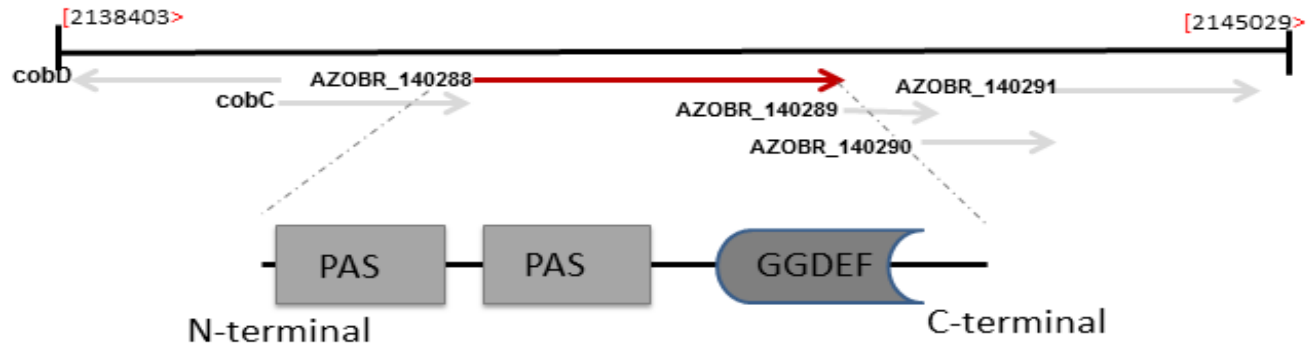


Figura 3.- Contexto genómico de AZOBR_140288 de *A. brasilense* Sp245 que tiene alta homología con *dgcA*:

AZOBR_140289 proteína hipotética con función desconocida

AZOBR_140290 proteína con función desconocida con dominio PAS/PAC (similitud con una proteína aceptora de metilos de *Pseudogulbenkiania* sp. NH8B)

AZOBR_14091 proteína aceptora de metilos

JUSTIFICACIÓN

Azospirillum, al igual que las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal, es objeto de estudio de numerosas investigaciones en aspectos genéticos, bioquímicos y tecnológicos, sin embargo, aunque la formación de la biopelícula para la colonización de la planta por parte de las bacterias promotoras de crecimiento es bien caracterizado y estudiado en *Azospirillum*, poco se sabe acerca de las vías moleculares que intervienen durante la colonización a la planta modificando su estilo de vida móvil a uno sedentario, se piensa que al igual que ocurre en otros microorganismos éste cambio depende del aumento de la concentración del segundo mensajero di-GMPc que es sintetizado por las enzimas Diguamilato Ciclasas que, aunque son abundantes en el genoma de la bacteria, poseen una amplia diversidad de dominios de entrada sugiriendo que están involucradas en vías de regulación individuales durante el sedentarismo, sin embargo hasta la fecha no hay artículos sobre el rol del di-GMPc en la colonización de la planta y la formación de biopelícula por parte de *Azospirillum brasilense*.

HIPÓTESIS.

La cepa mutante de *A. brasilense* 1428-A presenta una disminución en la colonización al trigo así como en la biopelícula con respecto a la cepa *A. brasilense* Sp7.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación de la Diguamilato ciclasa A (*dgcA*) de *A. brasilense* Sp7 en la producción de biopelícula y la colonización al trigo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Comparar la colonización en trigo por parte de *A. brasilense* Sp7 y *A. brasilense* 1428-A.
- Analizar la estructura de la biopelícula de *A. brasilense* Sp7 y *A. brasilense* 1428-A usando marcaje con la proteína verde fluorescente enhancer (eGFP) y con el marcaje fluorescente DAPI bajo microscopia confocal y de epifluorescencia.
- Analizar la estructura de la biopelícula de *A. brasilense* Sp7 y *A. brasilense* 1428-A en microscopia electrónica de barrido.

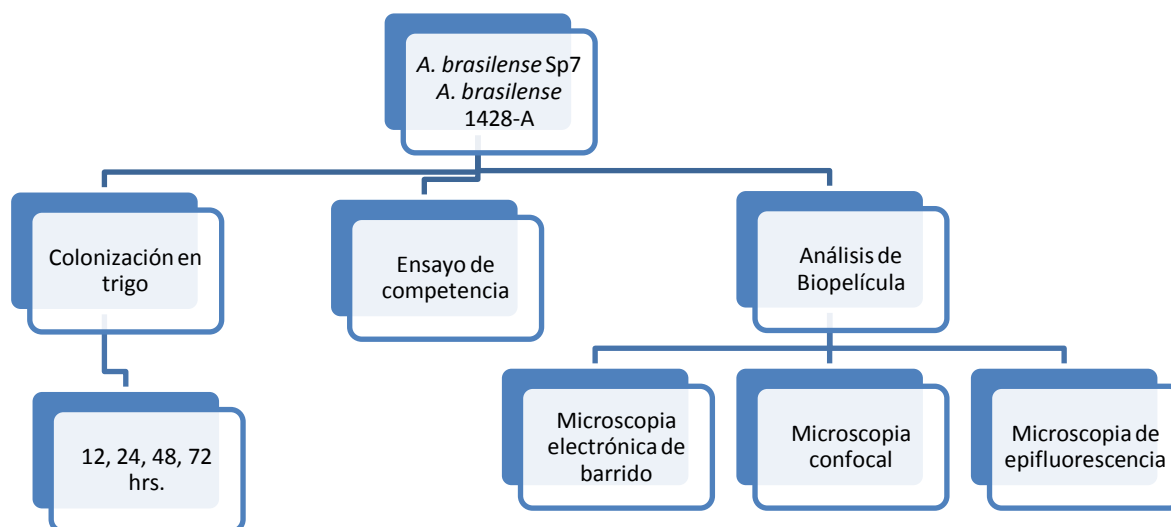
MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Cepa	genotipos	Referencia
<i>A. brasilense</i> Sp7	Cepa silvestre ATCC29145	Tarrand y cols., 1978
<i>A. brasilense</i> 1428A	<i>dgcA::Gm^r</i>	Romero, 2012
<i>E. coli</i> S17.1	pMP2444 Gm ^r ,Km ^r	Simon y cols., 1983
Plásmidos		
pMP2444	Contiene el gen <i>egfp</i> que codifica la proteína verde fluorescente y Gm ^r	Clontech

Tabla 1. Material biológico.

ESQUEMA DE TRABAJO



Condiciones de Cultivo

Las cepas de *A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* 1428-A se cultivaron en medio mínimo K- malato y se incubaron a 30°C en agitación constante de 150 rpm, para su crecimiento, en placas de agar se utilizó el medio selectivo Rojo Congo (Rodríguez-Cáceres, 1982). Para la cepa 1428-A se utilizó el antibiótico Gentamicina (Gm) a 30 µg/ml. La cepa de *E. coli* S17.1 (Tabla 1) fue crecida en medio Luria-Bertani (Lb) e incubada a 37°C y 150 rpm con 15 µg/ml de Gm.

Colonización y Competencia en Trigo

Se desinfectaron semillas de trigo (*Triticum aestivum*) variedad Tlaxcala usando cloruro de Mercurio y en condiciones de vacío según la metodología de Castro-Guerrero J. (Castro-Guerrero y cols., 2012), las semillas fueron colocadas en Agar-agua para su germinación durante 3 días hasta tener una raíz de 1 cm aproximadamente, posteriormente fueron puestas en tubos de ensayo de 150 mm x 20mm cubiertos con tubos de 250 mm x 25 mm con 15 ml de solución hidropónica usando Nitrato o Amonio como fuente de nitrógeno, la solución carece

de fuentes de carbono; 7 días después de permanecer en una cámara ambiental con ciclos día-noche (luz 14 hrs, 24°C y oscuridad 10 hrs, 16°C con una humedad de 80%) las plantas fueron inoculadas con 100 µl de cultivo bacteriano con una densidad óptica (D.O.) de 0.9 a 600 nm y una cantidad de 1×10^{-8} unidades formadoras de colonia (UFC) de la cepa *A. brasilense* Sp7 y *A. brasilense* 1428-A; las raíces fueron maceradas en mortero de cerámica y en esterilidad, se utilizó la técnica del número más probable para cuantificar el número de bacterias en la raíz del trigo a las 12, 24, 48 y 72 horas después de la inoculación. En el ensayo de competencia, se siguió la misma metodología con la diferencia que en la misma planta se inoculó con 50 µl de cada una de las cepas de estudio, posterior a la maceración en mortero las bacterias se plaquearon con 100 µl de la cuarta dilución en una placa de Rojo Congo, para después seleccionar las colonias en una placa con 30 µg/ml de Gm del mismo medio. Los datos fueron analizados estadísticamente con el programa Statistica 8 (StatSoft, Inc.).

Análisis de la formación de biopelícula por microscopia de epifluorescencia y confocal.

La formación de biopelículas de las cepas Sp7 y 1428-A, se analizaron por microscopia de epifluorescencia y confocal, ambas cepas se transformaron con el plásmido pMP2444 quien porta el gen de la proteína verde fluorescente enhancer (EGFP por sus siglas en inglés, excitación 480/40; emisión 510 nm de pase largo) por conjugación triparental. Las transconjugantes se seleccionaron con 30 µg/ml de Gm en medio mínimo K-malato.

La formación de biopelícula se realizó siguiendo la técnica cuantitativa de Cristal Violeta (Arruebarrena y cols. 2012) con algunas modificaciones. Ambas cepas se crecieron en placas de agar rojo congo por 5 días, transcurrido este tiempo se tomaron 2 a 3 colonias con la morfología típica de *Azospirillum* y se inocularon en 25 ml de medio Luria Bertani modificado (LB*, 5mM MgSO₄ y 3.3 mM CaCl₂, con únicamente 5 g/L de NaCl). Estos precultivos se incubaron a 30°C en agitación orbital de 150 r.p.m por 16 h o 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 cosecharon

por centrifugación a 7500 X g por 2 min. Las células se resuspendieron en buffer de fosfatos (BF) (66mM) los cuales tuvieron una D.O.=2.

Estos cultivos se diluyeron 1/100 en medio NFB fresco modificado (Döbereiner & Day, 1976) con una relación Carbono – Nitrógeno = 2 usando ácido málico a 27.6 mM como fuente de carbono y KNO₃ a 13.8 mM como fuente de nitrógeno y se agregó 2 mL del medio en placas de cultivo celular de 24 pozos (Costar) con un cubreobjetos circular estéril de 13mm de diámetro (Marlenfeld GmbH & Co.) en el fondo del pozo con el fin de que la biopelícula quedase adherida al cubreobjetos para después poder retirarlo y analizarlo al microscopio posteriormente se colocó la placa en cámara húmeda a 30°C (Peeters y cols., 2007). El plásmido pMP2444 no es estable en *Azospirillum* por lo cual se adicionó 60 µg/ml de Gm al medio de cultivo NFB para garantizar la expresión de la GFP y la fluorescencia bajo el microscopio.

Ensayo con DNAsa I

Se realizó un ensayo de biopelícula durante 7 días como se describió anteriormente. Cuando se sacaron los cubreobjetos fueron sumergidos en 2 ml de PBS con 1 U de DNAsa I por ml (Roche) durante 20 minutos, para después ser vistos bajo el microscopio de epifluorescencia EVOS sistema de imágenes fluorescentes.

Microscopios Utilizados

Para el análisis de las biopelículas con epifluorescencia se utilizó un microscopio Olympus BX51 equipado para epifluorescencia con objetivo UPlanAPO 20X, 40x, 100x. Para el ensayo con la DNAsa I se utilizó un equipo Evos Inverted Fluorescent Microscope- The EVOS fluorescent imaging System de Life Technologies. Para las imágenes en microscopia confocal se utilizó un equipo Ti Microscope (NIKON) con platina motorizada.

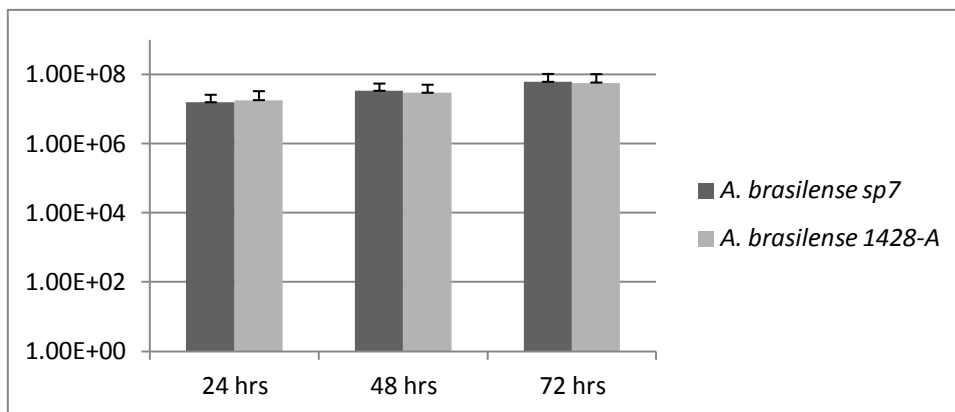
Para la microscopia electrónica fue necesario metalizar las muestras con un sputter coater para rociar los cubreobjetos con oro y se pudiera utilizar el

microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6610LV (Japón), que se encuentra en el Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología (BUAP).

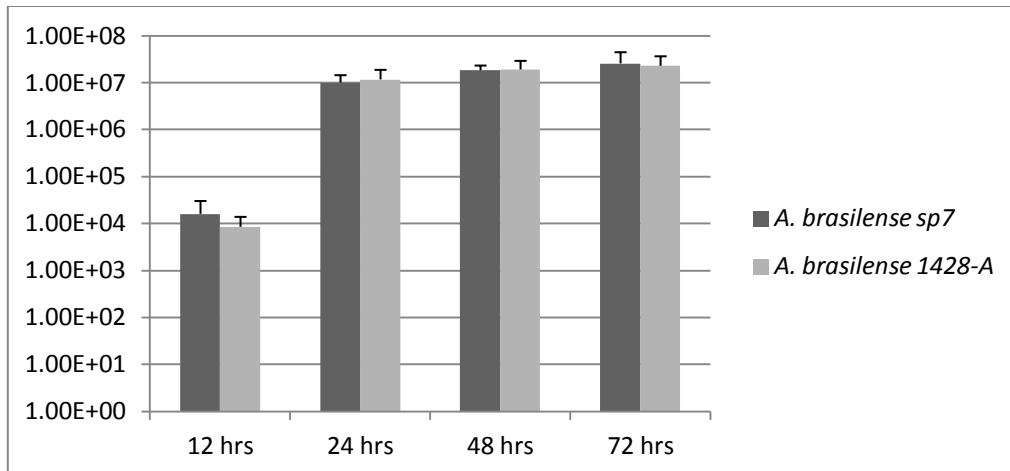
RESULTADOS

Colonización al Trigo

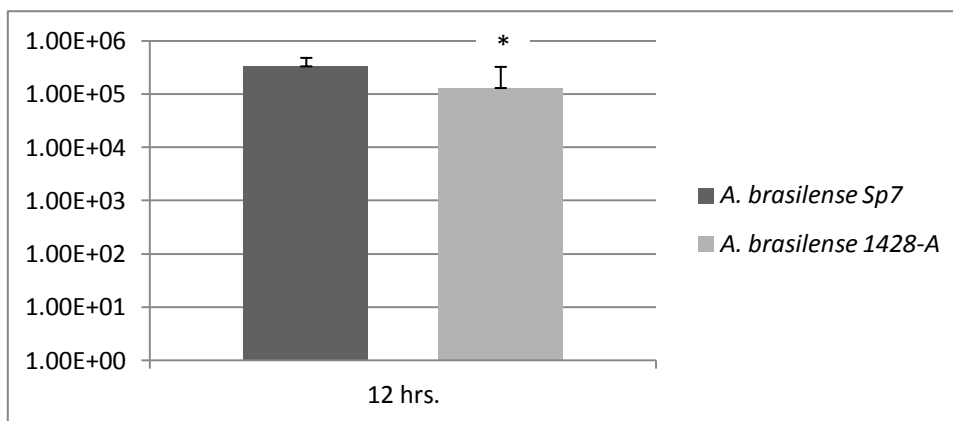
Se realizaron ensayos de colonización al trigo probando a la cepa silvestre *A. brasilense* Sp7 con la cepa mutante 1428-A y macerando las plantas a 24, 48 y 72 horas post inoculación, realizando dos ensayos independientes con nitrógeno y amonio en la solución hidropónica de la planta con 3 repeticiones cada una. Ninguno de los dos ensayos tuvo diferencias estadísticamente significativas ni tampoco en los distintos intervalos de tiempo (Gráfica 1 y 2), se optó por acortar el tiempo incubación en la planta a 12 horas sólo usando nitrato como fuente de nitrógeno, nuevamente no se encontraron diferencias significativas (Gráfica 2), por otro lado se propuso un ensayo de Competencia, en la cual una misma planta es inoculada con las dos cepas de estudio (gráfica 3), en éste caso, podemos encontrar diferencias significativas ($p=0.04$) demostrando que la cepa silvestre es más competente que la mutante.



Grafica 1.- Ensayo de colonización de *A. brasilense* Sp7 a 24(n=21), 48(n=21) y 72 hrs (n=20) y *A. brasilense* 1428-A A 24(n=37; $p= 0.8$), 48 (n=27; $p=0.94$), y 72 hrs (n=25; $p=0.8$) usando amonio como fuente de nitrógeno.



Grafica 2.- Ensayo de colonización de *A. brasilense* Sp7 a 12(n=12,) 24(n=12), 48(n=10) y 72 hrs (n=10) y *A. brasilense* 1428-A a 12(n=13;p=0.77), 24(n=25; p= 0.66), 48 (n=26; p= 0.86), y 72 hrs (n=20;p=0.43) usando nitrato como fuente de nitrógeno.



Gráfica 3.- Ensayo de Competencia entre *A. brasilense* Sp7 y *A. brasilense* 1428-A (n=13;p= 0.04)

Análisis de las cepas Sp7 y 1428-A que portan el plásmido pMP2444.

Para comprobar que las cepas Sp7 y 1428-A portan el plásmido pMP2444 después de la conjugación triparental, se extrajo el plásmido por la técnica de miniprep y se verificó por perfil de restricción con la enzima *Bam*HI como se observa en la figura 4, lo cual está de acuerdo con los tamaños esperados. Por otro lado se analizó por microscopia de epifluorescencia que las cepas expresan la proteína verde fluorescente (figura 5).

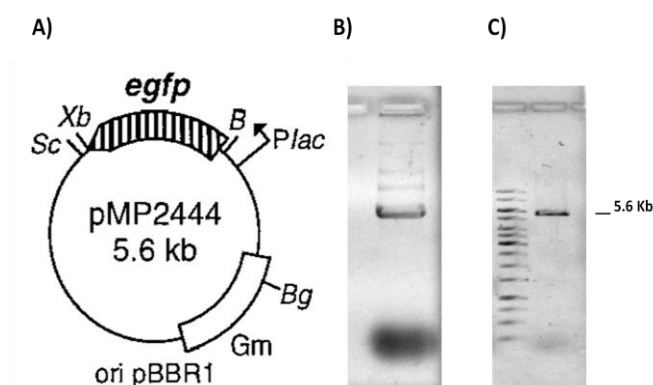


Figura 4. A) Mapa del plásmido pMP2444. B) Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pMP2444. C) Linearización del plásmido pMP2444 con la enzima de restricción *Bam*HI.

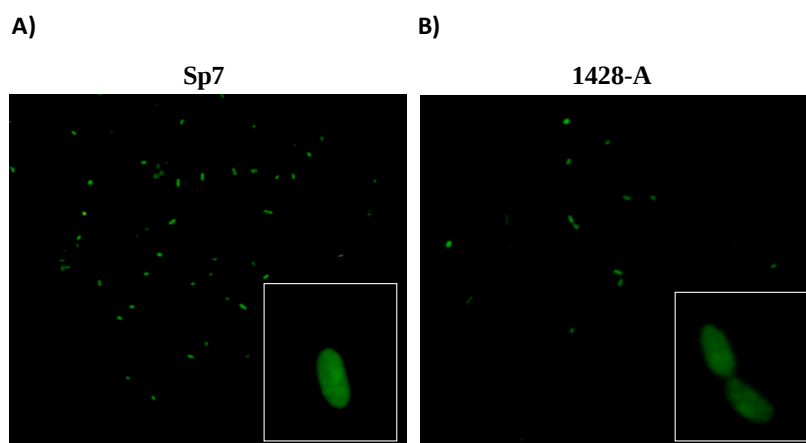


Figura 5. Microscopia de epifluorescencia. A) *A. brasilense* Sp7. B) *Azospirillum* 1428-A, cepa mutante 1428-A. Ambas cepas expresan la proteína GFP, las imágenes se tomaron con un microscopio OlympusBX51 equipado con epifluorescencia, con un objetivo UPlanAPO 100X, editadas con Adobe Photoshop Elements 6.0.

Formación de Biopelícula 3 y 5 días.

Después de mostrar que las cepas están marcadas fluorescentemente con la proteína GFP se procedió a estandarizar la formación de la biopelícula sobre 3 sustratos: nitrocelulosa (Amersham, Hybond-ECL), cubreobjetos de plástico (Thermanox, Inc) y cubreobjetos de vidrio, los tres materiales tuvieron forma circular de 13 mm de diámetro. La nitrocelulosa mostró autofluorescencia y el plástico mostró menos adherencia que el vidrio, por lo que éste último resultó ser el más adecuado para los ensayos de biopelícula. Después de incubar por 3 y 5 días la biopelícula, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS y se montaron sobre portaobjetos que tenían 30 µl de líquido de montaje Mowiol (Calbiochem, San Diego, CA, USA) con 4 ',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) que se une a ácidos nucleicos (figura 6 y 7). En ambas figuras la biopelícula producida por la cepa Sp7 presenta mayor grado de maduración a diferencia de la cepa mutante 1428-A, la cual se observa menos fluorescencia y mas dispersa. Con respecto al tiempo de incubación las dos cepas presentan un incremento gradual en el tamaño de los agregados a los 5 días. Sin embargo, la cepa mutante a este tiempo de crecimiento no llega al mismo nivel de maduración, lo que demuestra que hay una disminución en la producción de biopelícula, tales resultados concuerdan con los análisis realizados con la técnica de cristal violeta por Romero Osorio (Romero, 2012).

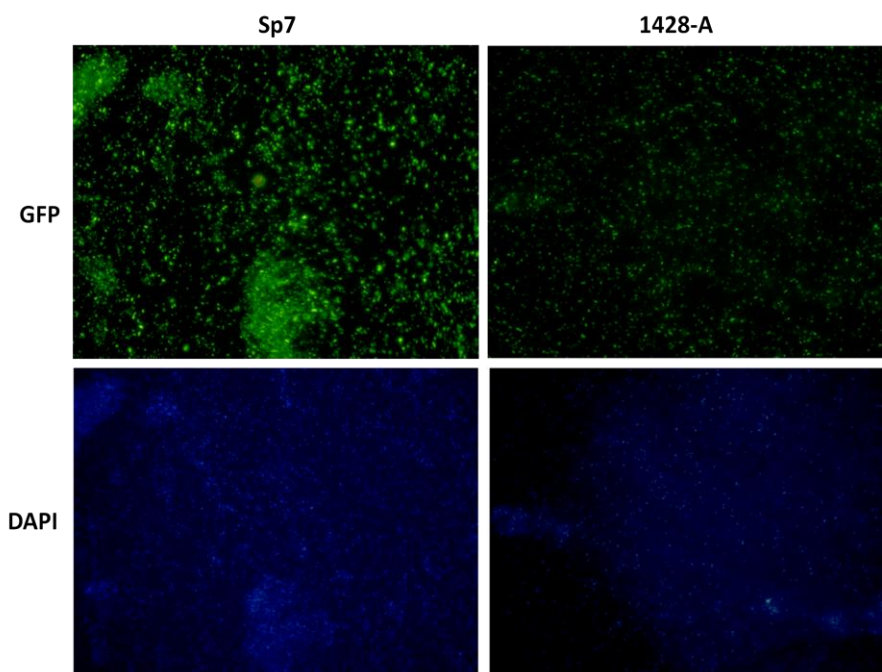


Figura 6. Biopelícula 3 días de incubación a 30°C visualizada con un objetivo 40X

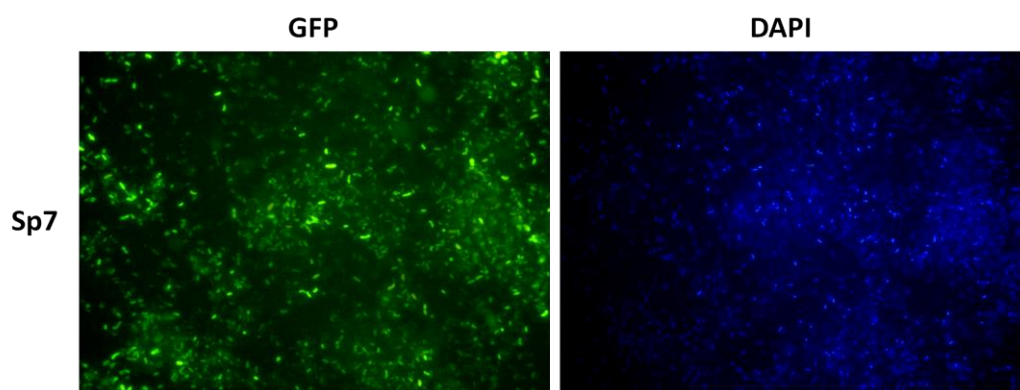
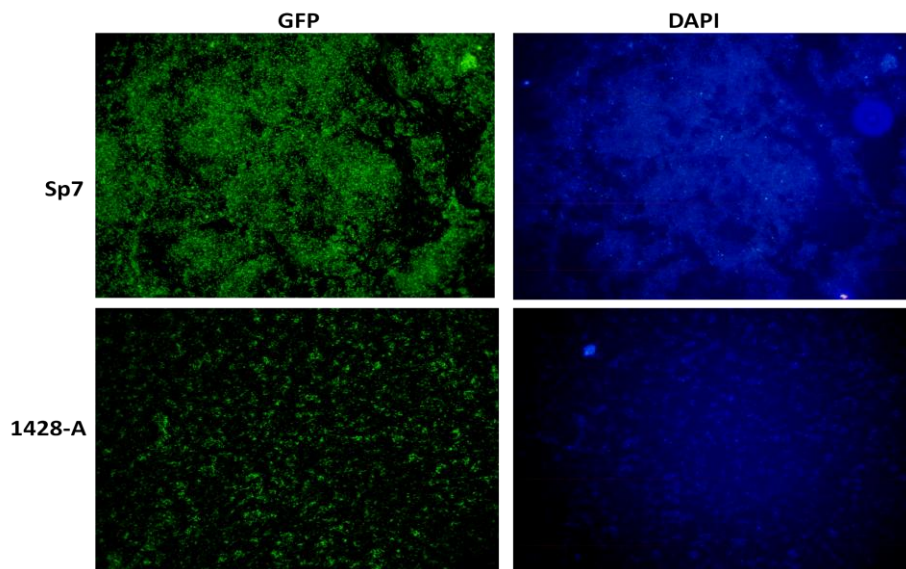


Figura 7. Biopelícula 5 días de incubación a 30°C visualizada con un objetivo 100X.

Formación de biopelícula a 11 días de crecimiento

Normalmente los ensayos de biopelícula en crecimiento estático sólo permiten tener una duración de hasta 7 días debido a que después de ese tiempo la biopelícula comenzará a disgregarse por el agotamiento de los nutrientes en el medio de cultivo, sin embargo, para el laboratorio era necesario encontrar una manera de hacer madurar la biopelícula durante periodos de tiempo prolongados y así obtener mejores visualizaciones en el microscopio. Para asemejar un proceso similar al de una cámara de flujo y proporcionarle a las bacterias los nutrientes por un periodo de tiempo mayor se retiró 1.4 ml del medio de cultivo y se reemplazó con medio fresco, de ésta forma realizamos ensayos de biopelícula en crecimiento estático de hasta 11 días sin que la biopelícula comenzara a disgregarse sino más bien continuó su crecimiento según renováramos el medio de cultivo. Transcurridos 11 días, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS y se montaron sobre portaobjetos que tenían 30 µl de líquido de montaje Mowiol y DAPI (figura 8). En estas imágenes se puede observar que la cepa silvestre produce biopelícula en mayor cantidad con respecto a la cepa mutante, los agregados son más densos y grandes mientras que en la mutante sólo es posible verse agrupamientos que no alcanzan el mismo nivel de la cepa silvestre además de muchas bacterias aisladas sugiriendo que la cepa mutante forma biopelículas inmaduras y lábiles, que no forman estructuras en multicapa. La tinción con DAPI revela la presencia de altas cantidades de ácidos nucleicos presentes en la biopelícula de *Azospirillum*, lo que sugiere que esta macromolécula puede estar involucrada en la estabilidad y mantenimiento de la biopelícula, sin embargo, por las limitaciones de la microscopia de epifluorescencia no nos permitió saber si en realidad era parte de la biopelícula o si la tinción había penetrado en la membrana celular, por lo cual se realizó un ensayo con DNAsa I.

A)



B)

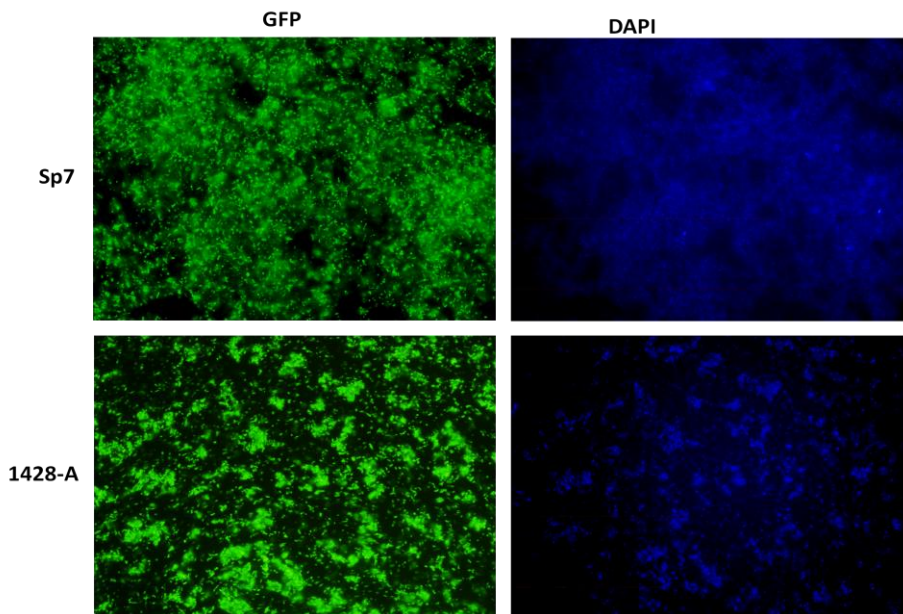


Figura 8. Microscopia de epifluorescencia de la cepa Sp7 y 1428-A, se puede observar una diferencia en el crecimiento y la densidad de la biopelícula, así como la incapacidad para formar agregados grandes por parte de la cepa mutante. Panel **A)** 20X. Panel **B)** 40X.

Tratamiento de la biopelícula de *A. brasilense* Sp7 con DNAsa I.

Para estos experimentos la biopelícula se dejó crecer por 7 días utilizando la metodología descrita anteriormente. Para el tratamiento con DNAsa I, los cubreobjetos se retiraron de la placa y se lavaron 3 veces con PBS, los cuales se incubaron con 1 Unidad (U), 10 U y 100 U de DNAsa I (Roche) por 30 min transcurrido este tiempo los cubreobjetos fueron lavados 3 veces con PBS y se montaron sobre portaobjetos que tenían 30 µl de líquido de montaje Mowiol y DAPI. Las imágenes se tomaron con un equipo EVOS fluorescent imaging System (Life Technologies). En la figura 9 se presenta biopelícula formada por 7 días de la cepa Sp7, tratada y sin tratar con 1 U de enzima DNAsa I y como se observa en la imagen la biopelícula se disgrega, lo que demuestra que el DNA exógeno forma parte de la matriz que mantiene formada la biopelícula, ambos marcajes fluorescentes muestran el mismo resultado. Por otra parte, cuando se trató con 100 U la biopelícula madurada por 7 días se pierde completamente, encontrándose solo bacterias planctónicas (datos no mostrados). Estos experimentos se realizaron por triplicado encontrándose resultados similares.

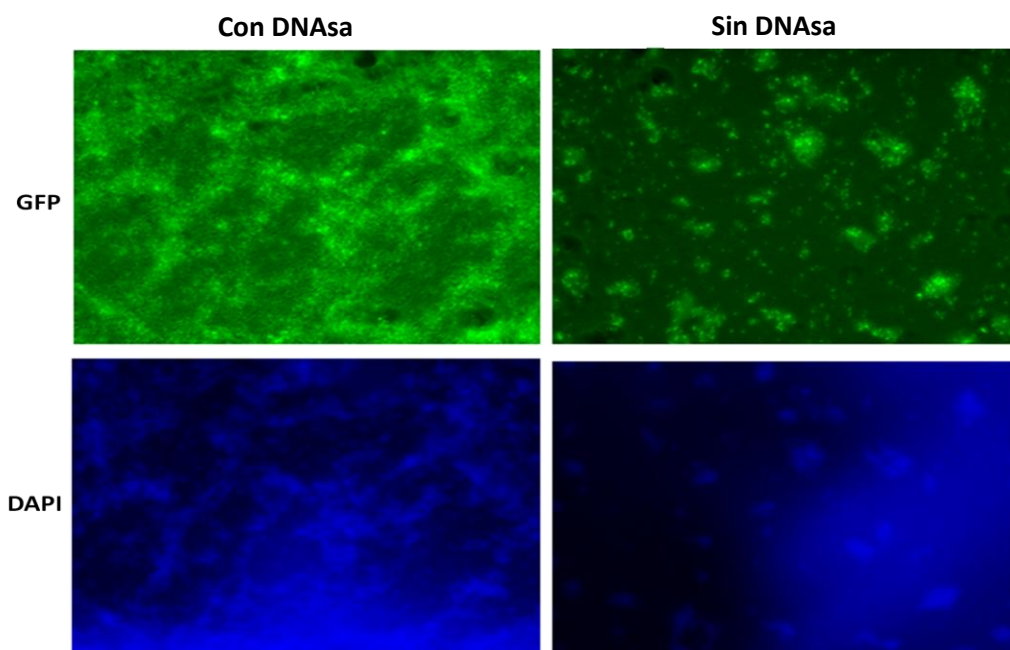


Figura 9. Tratamiento con DNAsa I de la biopelícula madurada por 7 días de la cepa Sp7.

Microscopia Confocal

La microscopía de epifluorescencia utiliza luz UV para excitar a la proteína verde fluorescente, nos resulta muy útil para observar imágenes en segunda dimensión, sin embargo, no es posible observar diferencias en grosor, es por ello que se procedió a utilizar el microscopio confocal el cual es capaz de reconstruir imágenes en tercera dimensión así como hacer capturas que abarquen áreas mayores.

Para analizar las biopelículas en el microscopio confocal se siguió un procedimiento similar a los otros ensayos en el cual se colocó un cubre objetos de vidrio en el fondo del pozo el cual es extraído después de 3 días y 5 días. La platina motorizada permite tomar 9 campos visuales contiguos para después reconstruir una imagen *Large* que abarca una área más grande (Figura 10), la cepa silvestre Sp7 registró formación de agregados desde los 3 días, a los 5 se puede observar mayor densidad y brillo, sin embargo, la cepa mutante 1428-A formó lo que se asemeja a una monocapa de brillo homogéneo y distribuida uniformemente en el sustrato sin que haya mucha diferencia al paso de los días. El microscopio confocal también permite reconstruir imágenes en tercera dimensión gracias a su sistema de láseres y platina motorizada con lo cual es posible comparar el grosor y la arquitectura de la biopelícula, se tomaron microfotografías cada 2 μ m de profundidad y luego se hizo una reconstrucción en 3D (Figura 11).

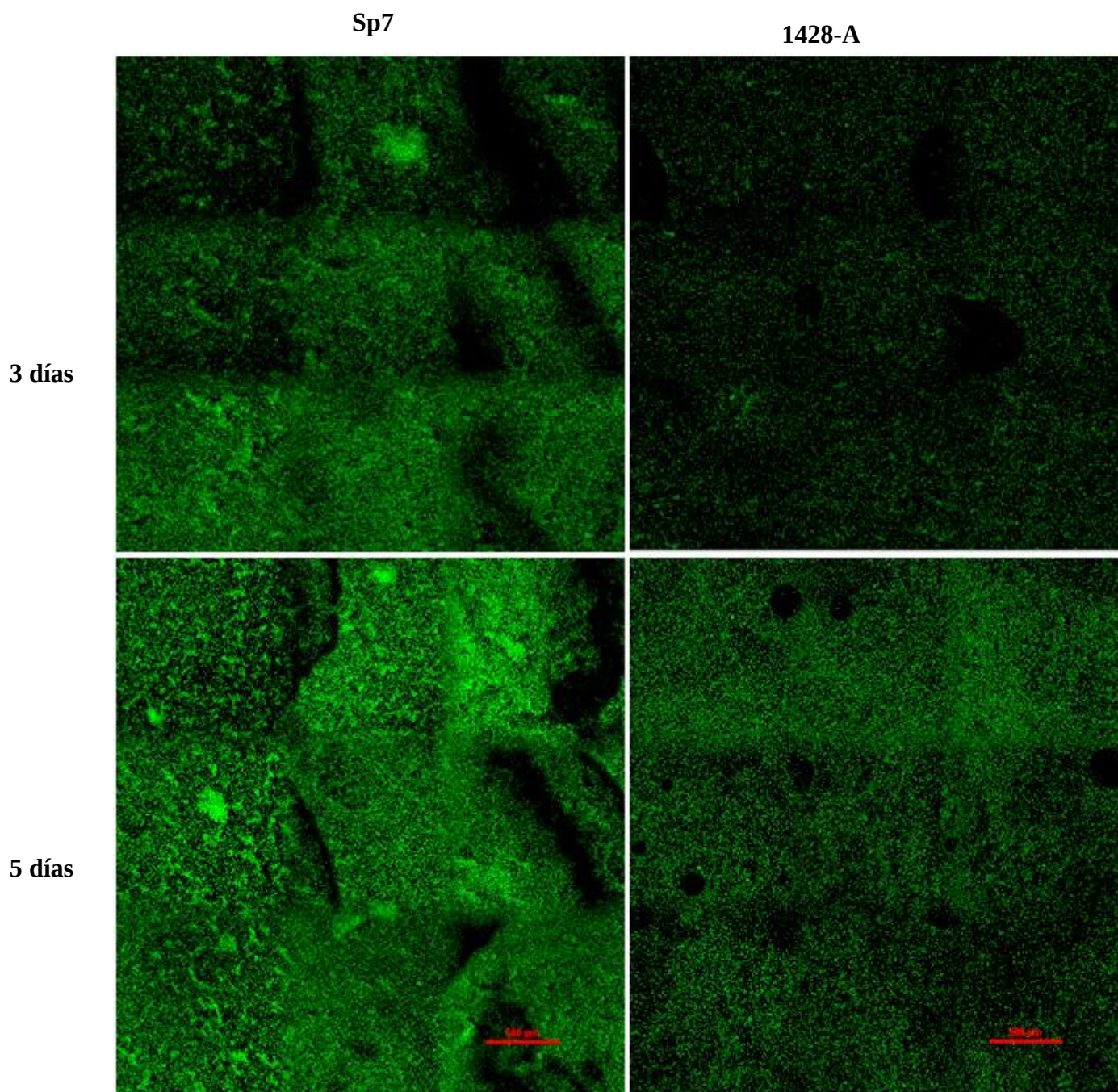


Figura 10.- Imágenes "Large" de la formación de biopelícula usando microscopia confocal.10x.

En las imágenes tomadas a los 3 días se puede observar de manera tridimensional que las células de la cepa silvestre se encuentran más cerca una de otras hasta formar densas acumulaciones dejando canales entre las aglomeraciones así como zonas con menos células, en la mutante se observa mayor espacio entre cada célula así como una distribución más homogénea en la distribución espacial del sustrato (Figura 11 A).

Las imágenes tomadas a los 5 días muestran que la cepa silvestre continuó su crecimiento en multicapa, es decir, se siguen formando capas de bacterias encima de la anterior y sucesivamente mientras el medio de cultivo no sea tóxico, en la vista superior de la derecha se observa la presencia de canales por donde circula agua y bacterias y el grosor de la biopelícula casi se duplicó alcanzando 32 μm , en contraste la biopelícula de la cepa mutante siguió observándose dispersa y con mayor distancia entre células, si bien, se observan débiles cúmulos de bacterias el espacio entre ellas persiste (Figura 11 B).

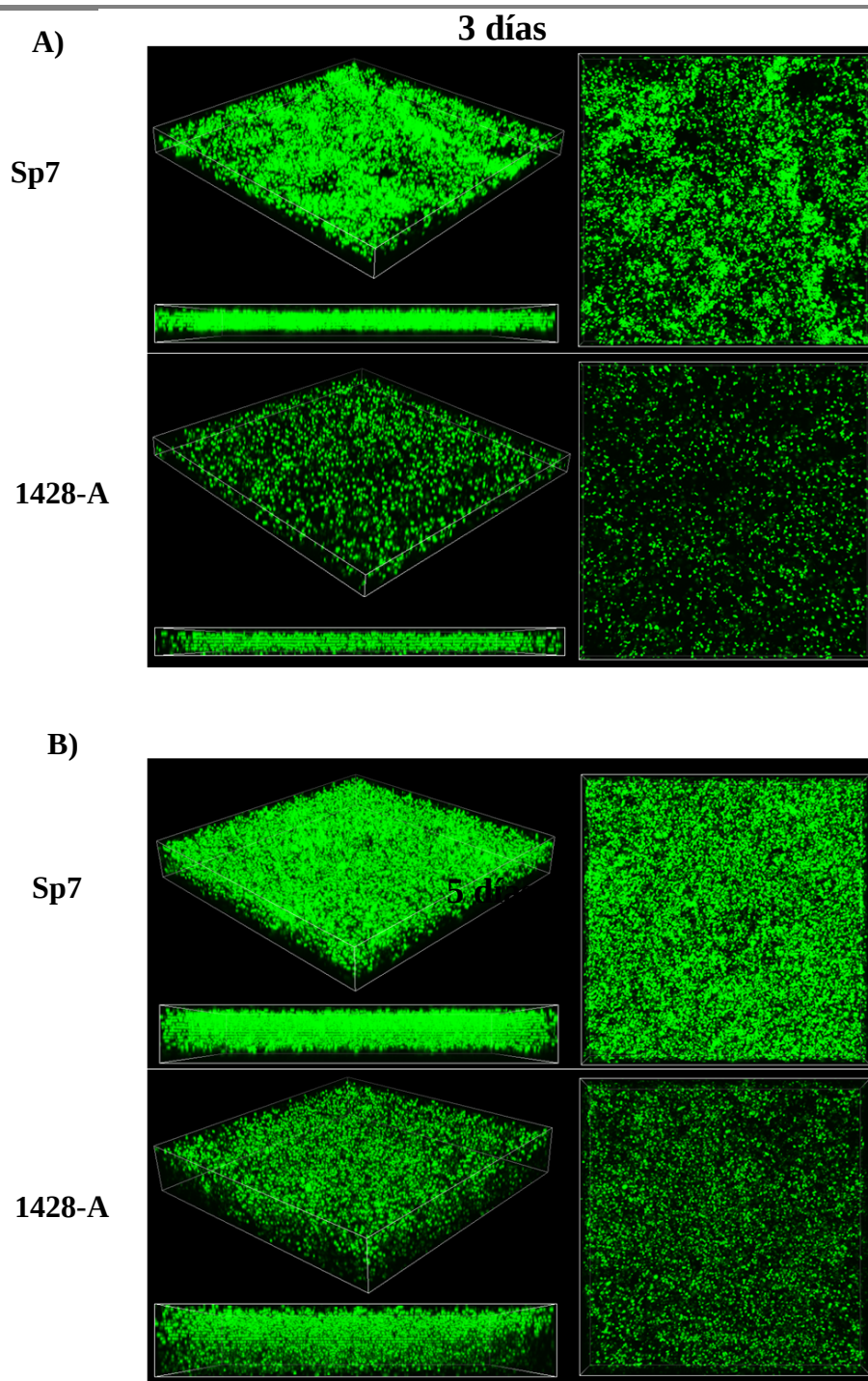


Figura 11.- Imagen por microscopia confocal usando reconstrucción en 3D. A) Imagen de la formación de biopelícula después de 3 días de crecimiento. La cepa Sp7 tiene un grosor de 18 μm mientras que la cepa 1428-A tiene 12 μm . B) Imagen por microscopia de la formación de biopelícula después de 5 días de crecimiento. La cepa Sp7 tiene un grosor de 32 μm mientras que la cepa 1428-A tiene 33 μm . 60x.

Microscopia Electrónica de Barrido

El ensayo utilizando microscopia electrónica de barrido se planeó para observar la formación de biopelícula a 2 y 3 días antes de que la aglomeración de bacterias diera imágenes indefinidas. Las bacterias de la cepa silvestre se mostraron compactas, formando aglomeraciones en multicapa dejando canales marcados donde no hay bacterias adheridas, las bacterias de la cepa mutante 1428-A han crecido ocupando la superficie total del vidrio, si bien hay mucho espacio entre las bacterias individuales no hay espacios más grandes para formar canales (figura 12 y 13), sin embargo, las bacterias aparecen con una textura gomosa y no se observan flagelos ni fimbrias, por lo que sería necesario hacer tinciones o tratamientos especializados con la finalidad de obtener imágenes nítidas que nos permitieran apreciar todas las estructuras presentes.

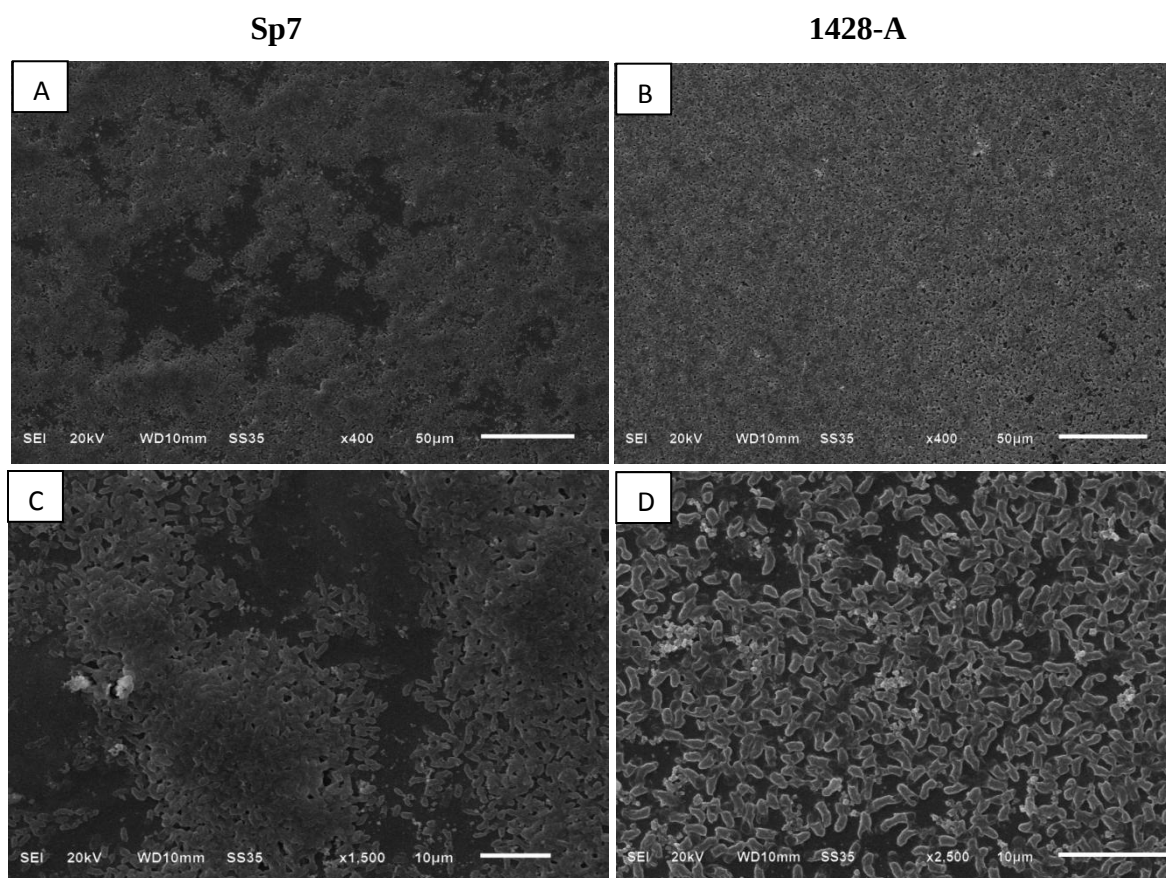


Figura 12.- Imágenes de la biopelícula con 2 días de crecimiento de *A. brasilense* Sp7 y de *A. brasilense* 1428-A, microscopía electrónica de barrido. A,B) 400x C) 1,500x D) 2,500x.

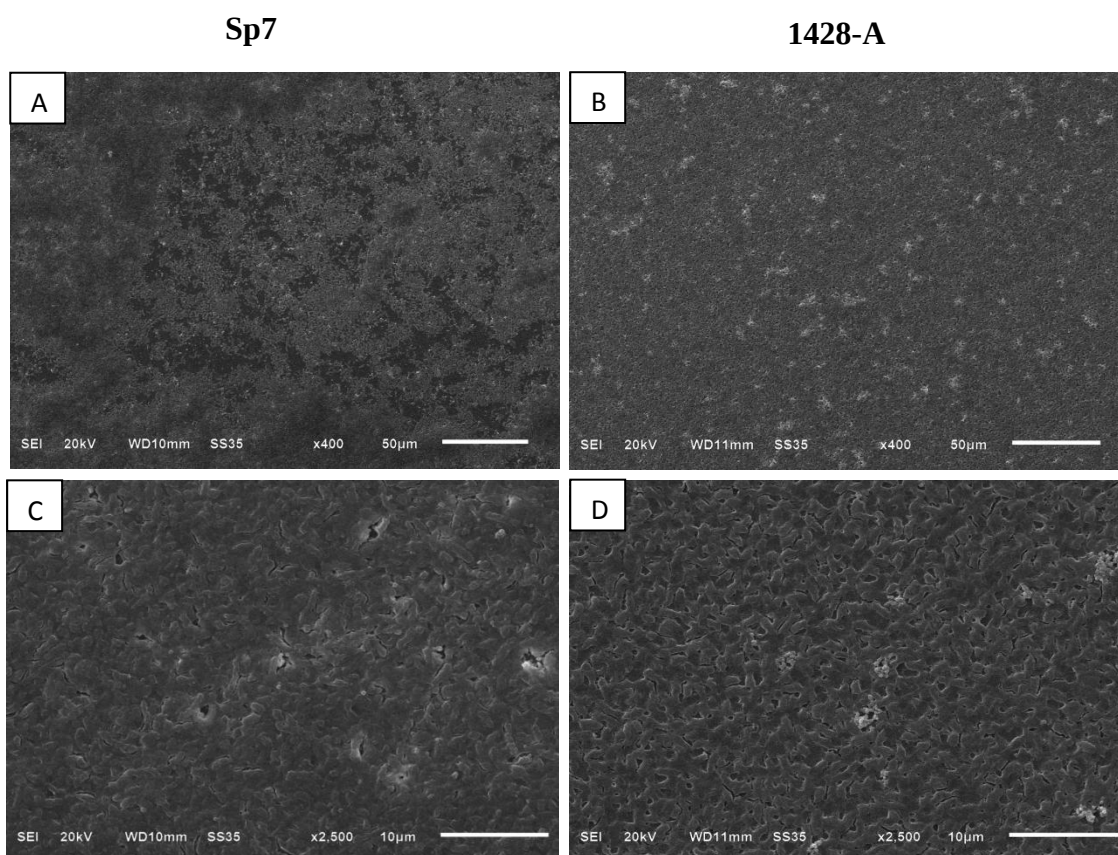


Figura 13.- Imágenes de la biopelícula con 3 días de crecimiento de *A. brasilense* Sp7 y de *A. brasilense* 1428-A, microscopía electrónica de barrido. A,B) 400x C,D) 2,500x.

DISCUSIÓN

En éste trabajo podemos observar que la interrupción del gen *dgcA* causa la disminución y alteraciones en la arquitectura de la biopelícula pero sin afectar la colonización en la planta hasta 72 horas después de la inoculación, sin embargo, el ensayo de Competencia demostró que la mutante 1428-A es menos eficiente que la cepa silvestre en el momento de competir por el nicho ecológico, no obstante el número de plantas usadas en éste ensayo fue considerablemente menor que los otros por lo que tendría que ser corroborado por ensayos posteriores. Las imágenes del microscopio confocal revelan que la mutante 1428-A es incapaz de formar biopelícula en multicapa, así como de adherirse entre células, concuerda con el antecedente de éste trabajo donde está afectada en la producción de exopolisacáridos los cuales podrían estar involucrados en la adherencia bacteria-bacteria necesaria para la posterior formación de biopelícula (Romero, 2012). Con la microscopía electrónica de barrido es posible observar que ambas cepas cuentan con la capacidad de adherirse a un sustrato inerte como lo es el vidrio y es posible observar diferencias entre la forma de adherirse de ambas cepas: la cepa Sp7 forma cúmulos cada vez más grandes al mismo tiempo que va dejando espacios en los cuales no hay bacterias adheridas (Fig. 12 y 13), en contraparte la cepa mutante se ha adherido de manera homogénea al vidrio sin dejar espacios para canales pero sin asociarse entre ellas, una de las propiedades de la monocapa es que las bacterias sólo pueden interaccionar entre la superficie pero no entre ellas mismas, imágenes *Large* obtenidas con el microscopio confocal confirman lo observado pero en área mayor conformada por distintos campos visuales (Fig. 10), en las imágenes de epifluorescencia se observa que a los 5 días la cepa 1428-A forma acumulaciones pequeñas en comparación a las realizadas por la Sp7 (Fig. 7), sin embargo a los 11 días es claro que no cuenta con la capacidad de seguirse agrupando en comunidades mayores (Fig.8), las imágenes transversales del microscopio confocal revelan una diferencia en el grosor de las biopelículas a los 3 días, y aunque a los 5 días pueden alcanzar el mismo grosor es posible notar una diferencia en cuanto a la

densidad y compactación entre las cepas (figura 11). La presencia de DNA se había comprobado mediante la tinción DAPI (figuras 5 y 6), pero la adición de DNasa a la biopelícula madura y su posterior disgregación es prueba de que el DNA extracelular está directamente involucrado en la estabilidad de la biopelícula de *Azospirillum brasilense* Sp7 (Fig. 9).

Nuestros resultados concuerdan con Barahona y cols. que en 2010 trabajó con *Pseudomonas fluorescens* F113 realizando mutaciones en las DGCs *gacS*, *sadB* y *wspR*, las cual mostraron un aumento en la motilidad y una disminución en la formación de la biopelícula bajo la técnica de cristal violeta sin cambios en la colonización a la planta sugiriendo que la motilidad es uno de los rasgo más importantes para llevar a cabo la asociación temprana con la planta, posteriores ensayos usando fenotipos hipermóviles tuvieron una mejor asociación que la cepa silvestre desplazándola en ensayos de competencia, en adición, la mutación simultánea de 3 DGCs mostraron una disminución adicional en la formación de la biopelícula indicando que cada una respondía a vías de señalización independientes (Barahona, 2010, de Weert y cols., 2002), al igual que en otros trabajos las mutaciones en DGCs causaron un aumento en la motilidad a diferencia de nuestra cepa que se encuentra disminuida en esa función, posiblemente el efecto se deba que la mutación polar que afecta genes de quimiotaxis que están río abajo en el contexto genómico (Fig. 3).

En las bacterias Gram-negativas la señalización por medio de di-GMPc es altamente conservada pero a su vez dinámica y flexible para responder a las condiciones ambientales evidenciando una amplia red de señalización para controlar el estilo de vida de las bacterias, en cada organismo podemos encontrar varios genes con dominios GGDEF y EAL o híbridos GGDEF/EAL, por ejemplo en *E. coli* se han encontrado 29 ORFs para DGCs y PDEs putativas, en *P. aeruginosa* se ubicaron 40, 43 en *P. putida* KT2440 y 18 para *Azospirillum brasilense* Sp245, sin embargo no todos pudieran funcionar para el mismo efecto, por ejemplo en el caso *P. fluorescens* PF0-1 se realizó un estudio sistemático en 30 ORFs con homología para DGCs encontrando que solo 4 mutantes reducen la

formación de biopelícula (Newell y cols., 2011) o incluso el hecho que un gen contenga el dominio GGDEF no necesariamente implicaría que tuviera la función enzimática de DGC, en el caso de la DGC degenerada PleD el dominio catalítico sirve como receptor del di-GMPc, que si bien está involucrada en la formación de biopelícula, no tiene la actividad enzimática de producción del segundo mensajero (Whitney y cols., 2012).

Generalmente en los genomas de las bacterias los genes con dominios GGDEF son más abundantes que las de dominios EAL y sumado a la poca presencia de dominios de respuesta ambientales se piensa que las proteínas con dominio EAL están reguladas en un nivel transcripcional y pueden contribuir al mantenimiento de la homeostasis del di-GMPc más que a responder directamente a estímulos ambientales o necesidades celulares como en el caso de las DGCs o las proteínas híbridas GGDEF/EAL (Seshasayee y cols., 2010), las cuales cuentan con diferentes dominios de entrada para recibir señales intracelulares como REC para fosforilación (Berg y cols., 2007) o GAF para unión de GMPc, o señales ambientales como en el caso de los dominios PAS para sensado de oxígeno. La variabilidad de respuesta a estímulos hace pensar que cada DGC es necesaria para responder a una condición ambiental en particular o durante los distintos pasos de la red reguladora que controla el paso a el estilo de vida sésil (revisado en Flemming y Wingende, 2010). Los experimentos realizados con la proteína WspR, una DGC con dominio REC perteneciente a un operón de quimiotaxis en *Pseudomonas*, proponen que la producción del di-GMPc es compartamentalizada afectando micro áreas específicas dentro de la célula y así ejercer control sobre su efector formando racimos o clusters cuando se encuentra en su forma fosforilada (Gunever y cols., 2007), otro ejemplo es PleD de *Caulobacter crescentus*, PleD está involucrado en la polarización de las bacterias durante la división celular y se localiza en el polo dónde sale un tallo indicando que ésa será la bacteria sésil mientras que en el lado opuesto se formará un flagelo para una bacteria móvil (Paul y cols., 2004). También se piensa que las DGCs pueden estar involucradas en momentos específicos durante la transición móvil-sésil, en el caso de *Pseudomonas* una DGC regula la presencia de la adhesina LapA en la membrana

en el momento de pasar de adhesión reversible a un anclaje definitivo durante la asociación con la planta (Newell y cols., 2011).

Se piensa que la arquitectura de las biopelículas puede ser afectada por el ambiente y los nutrientes de los que dispone, y que incluso puede mostrarse diferente en distintas especies del mismo género, en general se han planteado dos tipos de arquitectura de biopelícula, la que es irregular y en forma de hongo, y la que crece de manera regular cubriendo casi toda la superficie, se ha visto que el medio de cultivo es predominante para cambiar la arquitectura de la biopelícula, tal es el caso de *P. aeruginosa* dónde usando citrato como fuente de carbono se forman biopelículas planas, y con glucosa se forma la biopelícula con forma de hongo (Barken y cols., 2008), los componentes, cómo las condiciones ambientales, son necesarios para entender la arquitectura de la biopelícula: las Sustancias Poliméricas Extracelulares inmovilizan a las células en la biopelícula y las mantiene unidas, esto permite una interacción que incluye la comunicación célula a célula y la formación de microconsorcios que participan de manera sinérgica permitiendo la retención, por ejemplo, de enzimas extracelulares que funcionan como un sistema versátil de digestión externa secuestrando nutrientes disueltos en la fase acuosa de la biopelícula, permitiéndole a los microorganismos utilizarlos como fuente de energía y nutrientes. La matriz también actúa como un centro de reciclamiento manteniendo todos los componentes de las células lisadas disponibles, ésta incluye DNAe cromosómico de bajo peso molecular, el cual representa un reservorio de genes para la transferencia horizontal, así como DNAe de alto peso molecular que puede formar una especie de rejillas que le confiere estabilidad desde el interior de la biopelícula (Allesen y cols., 2006), también se le puede hallar en forma de malla al exterior de la biopelícula, reteniendo a las células en una especie de red, al parecer ésta organización es especie-dependiente (Böckelmann y cols., 2006), se ha reportado que en cada especie puede variar la cantidad y función de cada uno de los componentes de la biopelícula, incluso entre cepas, por ejemplo en *S. aureus* y *P. aeruginosa* el mayor componente de la biopelícula es el DNA mientras que ocurre lo contrario en *S. epidermis*, y en *B. cereus* el DNAe sirve como adhesina (revisado en Flemming

y cols., 2010), la procedencia de éste DNA devela un proceso de lisis programada que se asemeja al de la apoptosis eucarionte, en el caso de *P. aeruginosa* se ha reportado que adentro de la biopelícula con arquitectura en forma de hongo se forma un hueco con gran cantidad de DNAe donde se dividen células de vida libre durante la maduración de la biopelícula, y después de un lapso de tiempo se romperá la estructura en forma de hongo liberando células móviles para colonizar otros sitios, la inhibición de genes de autólisis evitó la formación de éste hueco (Ma. L y cols., 2009).

Los ejemplos anteriores sobre las funciones específicas que cumplen las DGCs durante el proceso de cambio de estilo de vida nos hace pensar que en *Azospirillum brasilense* Sp7 las enzimas DGCs también respondan de manera específica a estímulos ambientales y que estén regulando vías distintas en la transición a vida sésil mediante el segundo mensajero di-GMPc y con ello sustentar que el producto de el gen *dgcA* estaría involucrado en la transición de la monocapa a multicapa durante la formación de la biopelícula para el aseguramiento del nicho ecológico encontrado en etapas tardías sin estar necesariamente involucrado en las etapas tempranas de la colonización a la planta.

CONCLUSIONES

La interrupción del gen *dgcA* no mostró diferencia estadísticamente significativa hasta 72 horas en la colonización del trigo.

La interrupción del gen *dgcA* afecta la arquitectura de la biopelícula interfiriendo en la formación de multicapas.

La biopelícula de *Azospirillum brasilense* Sp7 tiene un alto contenido de DNA exógeno que le confiere estabilidad.

PERSPECTIVAS.

- Realizar mediciones del efecto benéfico en de la bacteria 1428-A deficiente en la producción de biopelícula sobre la biomasa de la planta.
- Realizar análisis de la biopelícula usando microscopia confocal y electrónica de barrido sobre la planta.
- Probar la resistencia de la biopelícula formada por la cepa 1428-A en la planta bajo condiciones de estrés.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue realizado con el financiamiento PROMEP/103.5/13/8869; Proyectos VIEP 2013-2014 y con el apoyo del Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología (BUAP) para capturar las microfotografías con el microscopio electrónico de barrido.

BIBLIOGRAFIA

1. Aguilar Piedras, J. (2008). Identificación de los genes que codifican para las enzimas aromático aminotransferasas (AATs) de *Azospirillum brasilense* Sp7 Tesis de Maestría. Posgrado en microbiología CICM, ICUAP.
2. Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M. and Tolker-Nielsen, T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*. 59: 1114–1128
3. Alexandre, G., S. E. Greer, and I. B. Zhulin. (2000). Energy taxis is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 182:6042–6048.
4. Anaya A., Espinosa-García F., Cruz-Ortega R. (2001). Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación. Plaza y Vales editores. México. 1a edición.
5. 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.
6. Bashan, Y., G. Holguin, and De-Bashan L. E. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental *Advances* (1997-2003). *Can J Microbiol* 50:521-577.
7. Barahona E., Navazo A., Yousef-Coronado F., Aguirre de Cárcer, D., Martínez-Granero F., Espinosa-Urge M., Martín M., Rivilla R. (2010). Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas Fluorescens* f113 mutants unable to form biofilms on abiotic surface. *Environmental Microbiology* 12(12). pp 3185–3195
8. Barken, K.B., Pamp, S.J., Yang, L., Gjermansen, M., Bertrand, J.J., Klausen, M., Givskov, M., Whitchurch, C.B., Engel, J.N. and Tolker-Nielsen, T. (2008) Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* 10, 2331–2343.
9. Beyhan S., Tischler A. D., Camilli A., Yildiz F.H. (2006). Transcriptome and Phenotypic Responses of *Vibrio cholerae* to Increased Cyclic di-GMP Level. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. p. 3600–3613
10. Berg M.J., Tymoczko L. J., Stryer L. *Bioquímica*. Versión española por José Ma. Macarulla. (2008). Ed. Reverté. Barcelona.p. 897-900
11. Böckelmann, U., Janke, A., Kuhn, R., Neu, T. R., Wecke, J., Lawrence, J. R. and Szewzyk, U. (2006), Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure. *FEMS Microbiology Letters*, 262: 31–38
12. Campbell A. Neil., Reece B. J.; colaboradores y consultores, Lisa Urry(et al). *Biología*. 7a ed. Buenos Aires; Madrid: Médica Panamericana. (2007). Traducción de: *Biology*. 7th ed. p. 553-556
13. Caballero-Mellado. (2000). El género *Azospirillum*. Capítulo completo en *Microbios en línea*. Martínez Romero E. y Martínez Romero J. CIFN. UNAM. México.

14. Castro-Guerrero J., Romero A., Aguilar J. J., Xiqui M.L., Sandoval J.O., Baca B.E. (2012). The *hisC1* gene, encoding aromatic amino acid aminotransferase-1 in *Azospirillum brasilense* Sp7, expressed in wheat. *Plant Soil* 356:139–150.
15. D'Argenio D.A., Miller S. I. (2004). Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology* 150, 2497–2502
16. Flemming HC., Wingende J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews. Microbiology*. Volumen 8. p623
17. Flemming, H.-C., Neu, T.R. and Wozniak, D.J. (2007) The EPS matrix: the “House of Biofilm Cells”. *J. Bacteriol.* 189, 7945–7947
18. Guvener, Z. T., and C. S. Harwood. (2007). Subcellular location characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* GGDEF protein, WspR, indicate that it produces cyclic-di-GMP in response to growth on surfaces. *Mol. Microbiol.* 66:1459–1473.
19. Jenal, U. and Malone, J. (2006) Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu. Rev. Genet.*, 40, 385–407
20. Ingraham J.L., Ingraham C.A. *Introducción a la Microbiología*. (1998). Editorial Reverté, s.a. Barcelona
21. Krasteva P. V., Giglio K. M., Sondermann H. (2012). Sensing the messenger: The diverse ways that bacteria signal through c-di-GMP. *Protein Science*. VOL 21:929—948
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. Kapulnik, Y., M. Feldman, Y. Okon, and Y. Henis. (1985). Contribution of nitrogen fixed by *Azospirillum* to the N nutrition of spring wheat in Israel. *Soil Biol. Biochem.* 17:509-515.
24. Kulasakara, H., Lee, V., Brenic, A., Liberati, N., Urbach, J., Miyata, S., et al. (2006) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *PNAS*. 103: 2839-2844.
25. Ma L, Conover M, Haiping L, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ. (2009). Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS One*. 5
26. Reis V., Dos Santos Teixeira K. R., Pedraza R. O. (2011) What Is Expected from the Genus *Azospirillum* as a Plant Growth-Promoting Bacteria?. *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*. Chapter 6. D.K. Maheshwari.
27. Michiels K.W., Croes C.I. Vanderleyden J. (1991). Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *Journal of General Microbiology*. 137, 224 1-2246.
28. Moreno Ramírez L. (2011) “Papel de la Diguamilato Ciclasa (Dgc), Fosfodiesterasa (Chsa) y Nitrato Reductasa Periplásmica (Napa) en la formación de Biopelícula de *Azospirillum brasilense*. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. BUAP.
29. Newell P. D., Yoshioka S., Hvorecny K. L., Monds R. D., O'Toole G. A. (2011). Systematic Analysis of Diguanylate Cyclases That Promote Biofilm Formation by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *J. Bacteriol.* 193(18):4685.

30. Reis M.V., dos Santos T. K., Pedraza O. R. (2011) The Genus *Azospirillum*. *Bacteria in Agrobiology: Plant Growth Responses*. capítulo 6
31. Rodríguez-Navarro D. N., Dardanelli M.S., Ruíz-Saínz J. E. (2007). Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiol Lett* 272 127–136
32. Romero Osorio A. (2012). Estudio de la formación de la Biopelícula en *Azospirillum brasilense*. Tesis de Maestría. Posgrado en microbiología CICM, ICUAP.
33. Peeters. E. Neils, NJ., Coenye T. (2007). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J. Microbial Methods*. 72:157-165.
34. Paul, R., Weiser, S., Amiot, N.C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B., and Jenal, U. (2004) Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev* 18: 715–727.
35. Seshasayee A. S., Fraser G. M., Luscombe N. M. (2010) Comparative genomics of cyclic-di-GMP signaling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity. *Nucleic Acids Res*. 38, 5970–5981.
36. Villarreal Astorga C.T. (2012). Caracterización parcial de una Cinasa Histidínica de *Azospirillum Brasilense*. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. BUAP.
37. Whitney C.J., Colvin M.K., Marmont S.L., Robinson H., Parsek R.M., Howell L.P. (2012). Structure of the Cytoplasmic Region of PelD, a Degenerate Diguanylate Cyclase Receptor That Regulates Exopolysaccharide Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 287, NO. 28, pp. 23582–23593.
38. Tarutina, M., D. A. Ryjenkov, and M. Gomelsky. (2006). An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *J. Biol. Chem*. 281:34751–34758.
39. de Weert, S., Vermeiren, H., Mulders, I.H.M., Kuiper, I., Hendrickx, N., Bloemberg, G.V., et al. (2002). Flagelladriven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Psuedomonas fluorescens*. *Mol Plant Microbe Interact* 15:1173– 1180
40. Xiqui M.A., Romero A., Terán E., Soto L., Baca B. (2010). Nuevo sistema de señalización en bacterias. *Elementos* 80:21-29.
41. Wimpenny J. (2009). *Microbial Metropolis*. *Advances in Microbial Physiology*, VOL. 56
42. Wu C., Cheng YY., Yin H., Song XN., Li WW., Zhou XX., Zhao LP., Tian LJ., Han JG., Yu HQ. (2013). Oxygen promotes biofilm formation of *Shewanella putrefaciens* CN32 through a diguanylate cyclase and an adhesin. *Scientific Reports*. Nature. 3 : 1945

GLOSARIO

di-GMPc: Ácido di-(3'-5') guanosin monofosfato, segundo mensajero involucrado en el sedentarismo de las bacterias gramm-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.

Gm: gentamicina, aminoglucósido usado como antibiótico.