



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**



**INSTITUTO DE CIENCIAS  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

**POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**

**ESTUDIO FENOTÍPICO DEL LOCUS  
AZOBR\_100210 de *Azospirillum brasilense***

**TESIS**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

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

**PRESENTA:**  
Q.F.B. ROXANA LARA OUEILHE

**ASESORA DE TESIS:**  
DRA. BEATRIZ EUGENIA BACA

**CO-ASESOR DE TESIS:**  
DR. ALBERTO RAMÍREZ MATA

**PUEBLA, PUE**

**AGOSTO, 2018**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asosora de tesis, la D.C. Beatríz Eugenia Baca por permitirme la realización de este trabajo, por el apoyo, consejos y conocimiento brindado. Así también al D.C. Alberto Ramírez Mata por el apoyo y consejos para la mejora de este trabajo.

Un agradecimiento especial a mis padres y a mi hermana, por la paciencia y apoyo que en todo momento me brindan, y por motivarme cada día a seguirme preparando y alcanzar mis metas.

Agradezco a la Q.F.B. Ma. Luisa Xiqui Vázquez, por su apoyo, consejos, enseñanzas, amistad y grata compañía durante este tiempo, por ser una guía, por siempre preocuparse y cuidarnos a todos.

A mis asesores y revisores de tesis, el D.C. Miguel Castañeda Lucio, el D.C. Candelario Vázquez Cruz, la D.C. Lucía Soto Urzúa y la D.C. Sandra R. Reyes-Carmona por sus críticas, sugerencias y observaciones para mejorar la realización del trabajo y su conocimiento brindado en las clases impartidas.

A la Q.F.B. Virginia Lora Téllez y al Q.F.B. Francisco J. García Ramírez, por ser parte de mi formación académica, por su apoyo, y por ser un gran ejemplo de pasión y responsabilidad en esta profesión.

A cada uno de mis compañeros de generación por hacer siempre amenas las clases y trabajar en equipo, a esos que me brindaron su amistad, Araceli, Belén, Alma, Marisol, Yesenia, Pablo, Manuel, Abraham, Iván Galindo, Erick, Joaquín, José Antonio, gracias por estar siempre ahí, por las charlas, las risas, porque sin ustedes esta experiencia no hubiera sido la misma.

A quienes pertenecieron al laboratorio de interacción Bacteria-Planta durante el tiempo que permanecí, quienes ya se fueron, Cynthia, Elvia, Toño y Carlitos, por ser siempre amables, dispuestos a ayudarme a resolver dudas y por sus consejos, y quienes aún permanecen Daneyra, Iris, Zaira, Saúl, Paco Cruz, Daniel, Iván Góngora, Ricardo, Miguel y Paco Maya, por su compañía durante este tiempo, por sus consejos, amistad, apoyo, por los momentos compartidos, por crear un agradable ambiente de trabajo, por ser un gran equipo.

Finalmente, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por proporcionarme el apoyo económico a través de una beca que me permitió realizar mis estudios de maestría y a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) por el apoyo económico para la presentación de este trabajo en el V Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Rizósfera .....	2
1.2. El género <i>Azospirillum</i> .....	4
1.3. Características de <i>A. brasilense</i> .....	5
1.4. Efecto de la inoculación de <i>Azospirillum</i> sobre las plantas .....	6
1.5. Efectos de la inoculación de <i>Azospirillum</i> sobre el desarrollo de las raíces .....	7
<b>2. FISIOLÓGÍA DE <i>Azospirillum</i></b> .....	9
2.1. Movilidad y Quimiotaxis .....	9
2.2. Aerotaxis .....	12
2.3. Asociación <i>Azospirillum</i> -planta .....	14
<b>3. BIOPELÍCULA</b> .....	16
3.1. El segundo mensajero di-GMPc .....	20
3.2. Síntesis de di-GMPc .....	21
3.3. Degradación de di-GMPc .....	22
3.4. Efectores .....	23
3.5. Proteínas Híbridas .....	24
3.6. Dominio CHASE .....	26
<b>4. ANTECEDENTES DIRECTOS</b> .....	27
<b>5. JUSTIFICACIÓN</b> .....	28
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	29
6.1. Objetivo general .....	29
6.2. Objetivos particulares .....	29
<b>7. ESQUEMA EXPERIMENTAL</b> .....	30
<b>8. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	31
8.1. Material biológico .....	31
8.1.1. Condiciones de cultivo y cepas bacterianas .....	32
8.2. Técnicas de biología molecular .....	33
8.2.1. Extracción de DNA genómico .....	33
8.2.2. Extracción de DNA plasmídico .....	34

8.2.3. Condiciones para la amplificación del gen <i>dgcD</i> .....	35
8.2.4. Condiciones para la amplificación del gen <i>dgcD</i> con su presunto promotor .....	36
8.2.5. Construcción del cósmido pVKP <i>dgcD</i> .....	37
8.3. Conjugación bacteriana .....	37
8.4. Ensayos fenotípicos .....	39
8.4.1. Ensayo de Biopelícula .....	39
8.4.2. Ensayo de Movilidad .....	40
8.4.3. Cuantificación de Exopolisacáridos .....	41
8.4.4. Determinación de proteínas totales .....	41
8.5. Diseño de iniciadores .....	42
<b>9. RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
9.1. Análisis bioinformático de la proteína DgcD .....	43
9.2. Alineamientos .....	46
9.2.1. Alineamientos de dominios probables DGCs de genomas de <i>Azospirillum</i> con PleD de <i>C. crescentus</i> CB15 y WspR de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 .....	46
9.2.2. Alineamiento de dominios probables PDEs de genomas de <i>Azospirillum</i> con RocR de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 .....	47
9.3. Predicción de promotor del gen <i>dgcD</i> .....	49
9.4. Análisis de la mutante 12-A .....	50
9.5. Construcción del plásmido pGEMP <i>dgcD</i> .....	52
9.5.1. Secuenciación .....	53
9.6. Construcción del cósmido pVKP <i>dgcD</i> .....	55
9.7. Complementación de la mutante 12-A .....	57
9.8. Ensayos fenotípicos .....	60
9.8.1. Determinación de la formación de Biopelícula .....	60
9.8.2. Cuantificación de Exopolisacáridos .....	61
9.8.3. Determinación de la Movilidad .....	62
<b>10. DISCUSIÓN</b> .....	<b>64</b>
<b>11. CONCLUSIÓN</b> .....	<b>68</b>

<b>12. PERSPECTIVAS</b> .....	69
<b>13. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	70
<b>14. ANEXO</b> .....	75
14.1. Comprobación de la construcción pVKP <i>dgC</i> D en <i>E. coli</i> S17.1 .....	75
14.2. Comprobación del vector pVK100 en las cepas <i>A. brasilense</i> Sp245 y mutante 12-A .....	76
14.3. Biopelícula .....	77
14.4. Exopolisacáridos .....	78
14.5. Movilidad .....	78
14.6. Medios de cultivo .....	79
14.7. Soluciones .....	81

## ABREVIATURAS

- DGC Diguanilato ciclasa
- PDE Fosfodiesterasa
- DgcD Diguanilato ciclasa D
- PGPR Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas
- UFC Unidades Formadoras de Colonias
- HGT Transferencia horizontal de genes
- EPS Exopolisacáridos
- WGA Wheat germen agglutinin
- LPS Lipopolisacáridos
- di-GMPc Ácido di-(3'-5') guanosín monofosfato
- GTP Guanosín trifosfato
- Km Kanamicina
- Tc Tetraciclina
- LB Luria Bertani
- LB\* Luria-Bertani Modificado
- RC Rojo Congo
- Sm Estreptomicina
- Ap Ampicilina
- DO Densidad óptica
- Nfb Fijación biológica de nitrógeno
- BF Buffer de Fosfatos
- CV Cristal Violeta
- TMD Dominio Transmembranal

## RESUMEN

*Azospirillum brasilense* es una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal capaz de aumentar el crecimiento y el rendimiento de los cultivos a través de una asociación beneficiosa con las plantas favorecida por la formación de biopelícula. Esta biopelícula es regulada por un segundo mensajero, el di-GMPc, la cual es una molécula ubicua que interviene en la regulación de diversos aspectos de la fisiología y el comportamiento bacteriano, tales como: movilidad y formación de biopelículas, ciclo celular y virulencia, entre otros. El di-GMPc es producto de las enzimas diguanilato ciclasas (DGCs), y su nivel celular se reduce por las enzimas fosfodiesterasas (PDEs). En la mayoría de las bacterias donde están presentes las vías de señalización dependientes de di-GMPc, están involucradas en la regulación de las transiciones bacterianas del estilo de vida planctónico al sésil mediante la inhibición de la movilidad y la formación de proteínas o apéndices superficiales adhesivos. En el genoma de *A. brasilense* Sp245 se describieron proteínas híbridas que se predice tendrían ambas actividades, estas actividades están reguladas por dominios de señalización que se producen en las proteínas DGC-PDEs. Mediante análisis bioinformático, encontramos un gen que traduce el producto de 946 residuos de aminoácidos, muestra los dominios CHASE-PAS y DGC-PDE (denominada diguanilato ciclasa D). Para evaluar la función de la presunta proteína híbrida, realizaron una mutante mediante la inserción de un casete de kanamicina (*dgcD*::Km<sup>R</sup>), denominada mutante 12-A. Los ensayos con cristal violeta mostraron que la mutante 12-A disminuyó la formación de biopelícula en comparación con la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245 en medio mínimo suplementado con Nitrato de Potasio (KNO<sub>3</sub>) como fuente de nitrógeno, así como también, aumentó la movilidad en diferentes fuentes de carbono, lo que sugiere que bajo las condiciones experimentales probadas funciona como DGC. La mutante 12-A se complementó con el plásmido pVK*dgcD* y ensayos con cristal violeta restauraron el fenotipo de formación de la biopelícula, comprobando la funcionalidad del gen *dgcD* bajo las condiciones experimentales probadas. Sin embargo, la movilidad no fue restaurada bajo las condiciones experimentales probadas, lo que nos indica la necesidad de

estudios posteriores para identificar la señal detectada por el dominio de señalización para demostrar la actividad PDE.

## 1. INTRODUCCIÓN

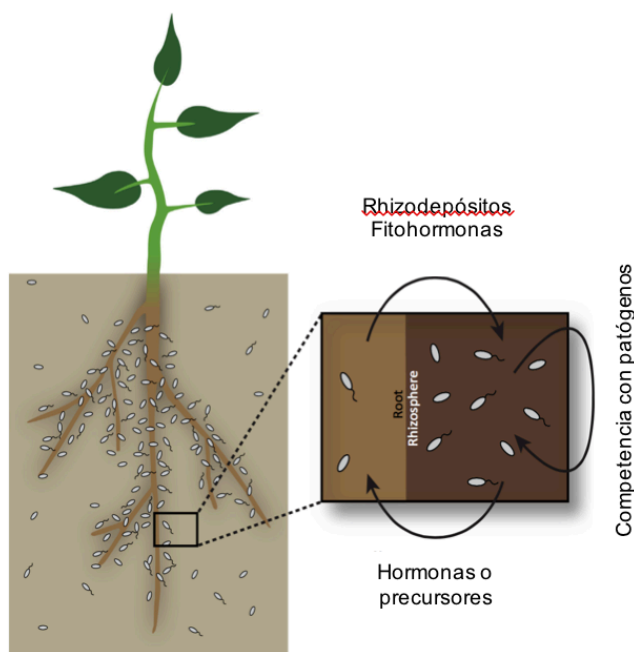
En los últimos años, el incremento de la población requiere aumentar la cantidad de alimentos disponibles. A medida que la producción agrícola aumentó en las últimas décadas, los productores son más dependientes de los agroquímicos como método de fomento de la producción de los cultivos. (Compant *et al.*, 2005). Se debe mantener el aumento de la productividad y a la vez propiciar una agricultura más sostenible desde el punto de vista ambiental, cuidando los ecosistemas y la biodiversidad. Una de las formas empleadas para disminuir el impacto ambiental negativo es el uso de biofertilizantes que emplean rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas denominadas PGPR (Pérez-Montaña *et al.*, 2014). Término definido por Kloepper y Schroth en 1978 para describir bacterias del suelo que colonizan la rizósfera de las plantas, y que son organismos capaces de aumentar el crecimiento de las plantas. Se ha continuado con la investigación destinada a comprender los mecanismos mediante los cuales favorecen el crecimiento de las plantas, algunos descritos son: la producción de fitohormonas, solubilización de fosfato, o fijación de nitrógeno (de Souza *et al.*, 2015). Se han descrito diferentes géneros de bacterias que mejoran el crecimiento de las plantas: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Gluconacetobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Serratia* (Saharan & Nehra, 2011). Existen varios inoculantes comercializados que usan PGPR y, recientemente, la popularidad de éstos ha aumentado gracias una amplia investigación de los mecanismos empleados por estas bacterias responsables de los efectos positivos en los cultivos.

Las plantas, colonizadas por un gran número de microorganismos, afectan su crecimiento y desarrollo, la disponibilidad y absorción de nutrientes y su productividad (Mendes *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014). Esta interacción es realizada principalmente en una zona del suelo conocida como rizósfera.

## 1.1. Rizósfera

La rizósfera es una estrecha zona del suelo, que se encuentra inmediata a la raíz de la planta y que es influenciada de manera significativa por los microorganismos; se considera una de las áreas del suelo con mayor actividad biológica y química, (Mendes *et al.*, 2013; Philippot *et al.*, 2013) causada por una gran cantidad de nutrientes liberados por las raíces y que pueden ser útiles como sustento de los microorganismos (Hrynkiewicz & Baum, 2012).

Los exudados de las raíces incluyen aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, enzimas y flavonoides (Verbon & Liberman, 2016). Además, recientes estudios sugieren que, la composición de los exudados de la raíz, las propiedades del suelo como pueden ser: el pH, la humedad, la temperatura o el contenido de nutrientes, son importantes en la conformación de las comunidades bacterianas en el suelo y la rizósfera (Huang *et al.*, 2014; Verbon & Liberman, 2016) (Figura 1).



**Figura 1. Esquema de la rizósfera.** En la imagen se muestra a la delgada capa del suelo, inmediata a la raíz de la planta e influenciada por los microorganismos conocida como rizósfera. Las plantas, a través de los exudados de raíz, pueden influir en la composición del microbioma de la rizósfera. (Tomado de Verbon & Liberman, 2016).

En la rizósfera se localizan bacterias, hongos, nematodos, algas, virus, arqueas y artrópodos (Mendes *et al.*, 2013). De manera general entonces, los microorganismos sirven de intermediarios entre la planta, que requiere nutrientes minerales solubles, y el suelo, el cual contiene esos nutrientes necesarios que en ciertas condiciones se encuentran en bajas concentraciones y/o en formas inaccesibles (Hrynkiewicz & Baum, 2012).

Las especies bacterianas que se ubican en la rizósfera, son llamadas rizobacterias, se dividen en aquellas que forman una relación simbiótica con la planta y las que particularmente no forman estructuras especializadas (nódulos), constituyen una relación mutualista con la planta. Las bacterias de vida libre, están estrechamente asociadas a las raíces de las plantas o suelen residir dentro de las raíces como bacterias endofíticas (Cassán *et al.*, 2013). Cuando las bacterias benefician de forma positiva el crecimiento de la planta y el rendimiento de los cultivos, se les denominan rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR, por sus siglas en inglés) (Cassán *et al.*, 2013; Spaepen *et al.*, 2009).

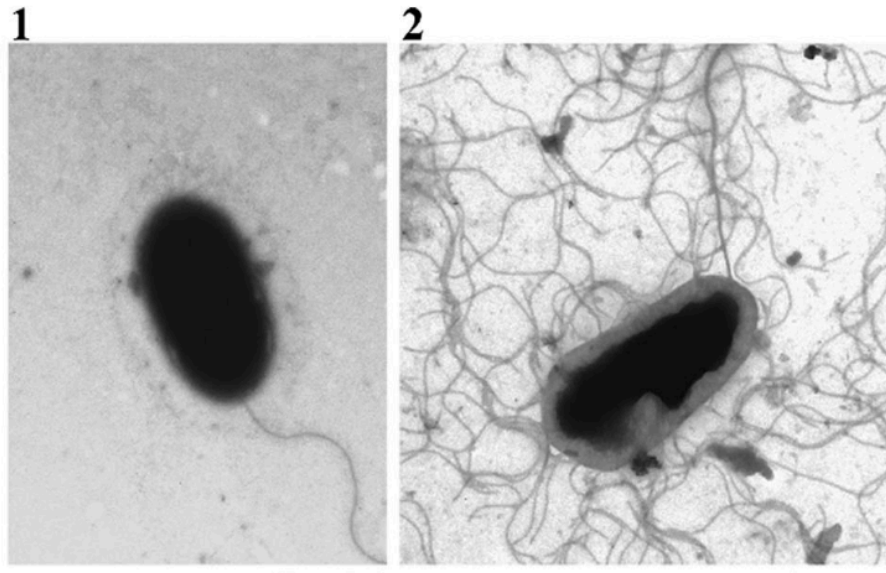
Uno de los géneros de las PGPRs que ha sido más estudiado desde su redescubrimiento es el género *Azospirillum*, al cual se le definió como PGPR por dos mecanismos principales: la fijación biológica de nitrógeno y la producción de fitohormonas; se considera que estos mecanismos influyen en el crecimiento y rendimiento de las plantas (Bashan & de-Bashan, 2010). En la actualidad, es usualmente incorporado en biofertilizantes debido a lo cual el estudio sobre la ecología, fisiología y genética de esta bacteria ha ido en aumento.

## 1.2. El género *Azospirillum*

La primera especie de *Azospirillum* se aisló por Beijerinck en 1925 a partir de suelos arenosos pobres en nitrógeno en Holanda, nombrándola como *Spirillum lipoferum*. Posteriormente Döbereiner y colaboradores en 1976, fueron los primeros en reportar su amplia distribución en la rizósfera de varias gramíneas, cultivos de cereales (trigo, maíz, sorgo, mijo, arroz) y muestras de suelo (Reis *et al.*, 2015). Más tarde, se aislaron cepas de plantas recolectadas en varios países y con base en diferencias morfológicas, fisiológicas y experimentales sobre homología del DNA, Tarrand y colaboradores propusieron *Azospirillum* como género y distinguieron dos especies diferentes: *A. brasilense* y *A. lipoferum* (Tarrand *et al.*, 1978). Actualmente existen 19 especies identificadas, que se encuentran reportadas en el sitio web LPSN (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature, [www.bacterio.net/azospirillum.html](http://www.bacterio.net/azospirillum.html)) y de las cuales en términos fisiológicos y genéticos *A. lipoferum* y *A. brasilense* han sido las más estudiadas (Reis *et al.*, 2011). El genoma del género *Azospirillum* contiene de 6 a 7 replicones, su tamaño varía dependiendo de la especie entre 6.4 y 7.6 Mbp y con un contenido en G+C del 67-69% (Wisniewski-Dyé *et al.*, 2012).

### 1.3. Características de *A. brasilense*

Las bacterias del género *Azospirillum*, son rizobacterias de vida libre, fijadoras de nitrógeno, microaerófilas, móviles, Gram negativas, de forma vibroide, de 1.0-1.5  $\mu\text{m}$  de ancho y 2.0-3.0  $\mu\text{m}$  de largo. Las células pueden cambiar de forma y tamaño con la edad de cultivo produciendo quistes (Okon, 1985; Burdman *et al.*, 2000). El crecimiento óptimo se determinó a 30-32 °C, pH entre 6.0 y 7.0 (Bashan *et al.*, 2004) y en medio de cultivo sólido con la adición del colorante Rojo Congo, se describen colonias de color rojo escarlata (Rodríguez-Cáceres, 1982). La movilidad de *Azospirillum* depende de un solo flagelo polar, el cual, es responsable del movimiento natatorio, y a su vez, de múltiples flagelos laterales, los cuales son responsables de una movilidad de superficie en medios sólidos (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000) (Figura 2). Se ha descrito que en *Azospirillum*, además de la movilidad, el flagelo polar es utilizado para adherirse a la superficie de las raíces de las plantas (Rodrigues *et al.*, 2015).



**Figura 2. Microscopía electrónica de células de *A. brasilense* Sp245.** Cultivadas en medio líquido (1) o en medio sólido (2). Las barras de escala corresponden a 1  $\mu\text{m}$  (Filip'echeva *et al.*, 2017).

#### **1.4. Efecto de la inoculación de *Azospirillum* sobre las plantas**

La inoculación de plantas con *Azospirillum* puede ocasionar cambios significativos en los parámetros de crecimiento de la planta, pero estos cambios pueden o no afectar en el rendimiento del cultivo (Bashan & Levanony, 1990). En estudios de campo realizados en cereales se ha podido observar una promoción del crecimiento vegetativo, así como un efecto a simple vista en el crecimiento de algunos vegetales como tomate, berenjena, pimiento y algodón (Bashan *et al.*, 1989). El rendimiento se incrementó con la inoculación de *Azospirillum* en trigo desde 23 % hasta 63 % (Caballero *et al.*, 1992) y en otros trabajos se obtuvieron aumentos del rendimiento total de la cosecha de 50 a 70 % comparándolos con los controles de plantas no inoculadas (Bashan & Levanony, 1990).

Para la agricultura moderna, un rendimiento de hasta el 20 % se considera comercialmente valioso, siempre que estos resultados sean consistentes. Sin embargo, es difícil dar una evaluación apropiada de los trabajos y la manera en que la planta responde en cuanto al rendimiento debido a la carencia de ensayos o a la ausencia de detalles técnicos en la descripción de los métodos. Evaluando los datos a nivel mundial de los últimos veinte años sobre experimentos de inoculación con *Azospirillum*, se concluyó que los experimentos exitosos fueron aquellos donde utilizaron el nivel óptimo de células en el inoculante (Okon & Labandera-González, 1994) y además tomando en consideración que las bacterias sobreviven mejor en el suelo si el inóculo se toma de la fase exponencial del cultivo, que si se toma de la fase estacionaria (Vandenhove *et al.*, 1993). De esta manera se podría estandarizar y optimizar los inóculos para evitar la variabilidad en la respuesta vegetal.

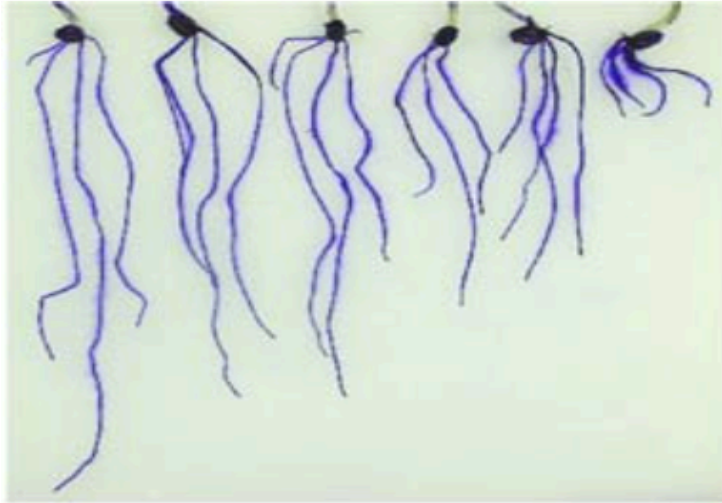
### **1.5. Efectos de la inoculación de *Azospirillum* sobre el desarrollo de las raíces**

Las bacterias de este género se consideran bacterias de la rizósfera, aunque muestran diferencias en la forma en que colonizan las raíces. Pueden colonizar la parte interna de la raíz, pero predominantemente colonizan la parte externa. En esta última, las bacterias forman pequeños agregados, aunque también es posible encontrar células aisladas distribuidas en la zona de elongación de la raíz y de los pelos radiculares. Para colonizar la parte interna, las células deben invadir las raíces penetrando a través de los espacios intercelulares (Bashan & Levanony, 1990; Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

Los efectos positivos de *Azospirillum* fueron principalmente por cambios morfológicos y fisiológicos de las raíces de las plantas inoculadas (Burdman *et al.*, 2000). Los efectos pueden variar dependiendo de la planta y las condiciones ambientales del cultivo, pero aún más importante, de las concentraciones de inóculo. Estudios previos han determinado que la concentración óptima de inoculación es alrededor de  $10^5$ - $10^6$  unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). La disminución de la concentración bacteriana a  $10^2$ - $10^4$  UCF/ml tuvo un efecto positivo menor mientras que el aumento de la concentración bacteriana a  $10^8$ - $10^9$  UFC/ml disminuyó el área de la superficie de la raíz, pero aumentó la formación de pelos radiculares (Okon, 1985; Bashan, 1986) (Figura 3 y 4). El efecto de la inoculación parece determinarse principalmente en las etapas iniciales del desarrollo de la planta (Okon & Labandera-González, 1994).

Los principales efectos visuales que se observan, son cambios en la morfología de la raíz, un aumento en el alargamiento de la raíz, el número de raíces laterales y adventicias y el alargamiento y ramificación de los pelos radiculares (Rodrigues *et al.*, 2015). Los cambios ocasionados en la raíz aumentan el área de superficie, lo cual resulta en un incremento en la absorción de agua y nutrientes minerales que favorecen al crecimiento de la planta (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). La

secreción por parte de la bacteria, de sustancias promotoras del crecimiento de las plantas como son auxinas, giberelinas y citocininas parecen ser responsables de estos efectos (Spaepen *et al.*, 2009).



**Figura 3. Efecto de la inoculación con *A. brasilense* Sp245.** La morfología de la raíz de plántulas de trigo de una semana de crecimiento. De izquierda a derecha: planta no inoculada, plántulas inoculadas con  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  y  $10^9$  UFC/planta. La inoculación de semillas de trigo con un número creciente de *A. brasilense* Sp245 produce una fuerte disminución en la longitud de la raíz (Spaepen *et al.*, 2008).



**Figura 4. Efecto de la inoculación de *A. brasilense* Sp245 en plántula de trigo.** De una semana de crecimiento en la formación de los pelos radiculares. De izquierda a derecha: planta no inoculada, plántulas inoculadas con  $10^5$ ,  $10^7$  y  $10^9$  UFC/planta (Spaepen *et al.*, 2008).

## 2. FISILOGIA DE *Azospirillum*

### 2.1. Movilidad y Quimiotaxis

Es importante la asociación de *Azospirillum* sobre las raíces de las plantas, la cual solo puede tener éxito si la bacteria sobrevive en el suelo y alcanza poblaciones significativas en el sistema de raíces del huésped. La movilidad y la quimiotaxis permiten que las bacterias se muevan hacia las raíces de las plantas, donde pueden beneficiarse de los exudados de las raíces como fuente de carbono y energía (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

Para sobrevivir y competir en las diferentes condiciones ambientales encontradas en la rizósfera, las bacterias deben ajustar rápidamente su comportamiento para nadar a entornos favorables (Bible *et al.*, 2008). Los sistemas de transducción de señales permiten a las células detectar y adaptarse a los cambios ambientales mediante respuestas celulares apropiadas, como la regulación de la expresión génica o la modulación en la movilidad (Bible *et al.*, 2008).

La movilidad en bacterias responde a un sistema de transducción de señales que transmiten información del entorno al aparato de movilidad. *Azospirillum* modula su patrón de nado hacia una mayor o menor probabilidad de cambio en la dirección de la rotación flagelar en respuesta a repelentes y atrayentes, respectivamente (Mukherjee *et al.*, 2016). El mecanismo molecular mejor comprendido de quimiotaxis es el de *Escherichia coli*. En *A. brasilense* se ha identificado un operón de quimiotaxis que comprende genes que, aunque presentan divergencia en la secuencia, son homólogos funcionales de *E. coli* (Greer-Philips *et al.*, 2004). La disponibilidad de la secuencia del genoma de *A. brasilense* spp., permitió identificar cuatro operones de quimiotaxis distintos, tres de los cuales (Che1, Che2 y Che3) también están codificados en los genomas de las cepas de *Azospirillum* secuenciadas hasta la fecha, así como en el genoma de *Rhodospirillum centenum* sugiriendo que ambos géneros tienen un ancestro común. (Mukherjee *et al.*, 2016).

Por su parte Che4 se localizó únicamente en el genoma de las cepas de *Azospirillum*, identificándola como una de las vías adquirida por transferencia lateral de genes (HGT) que se ha propuesto contribuye a su adaptación a la rizósfera (Wisniewski-Dyé *et al.*, 2011).

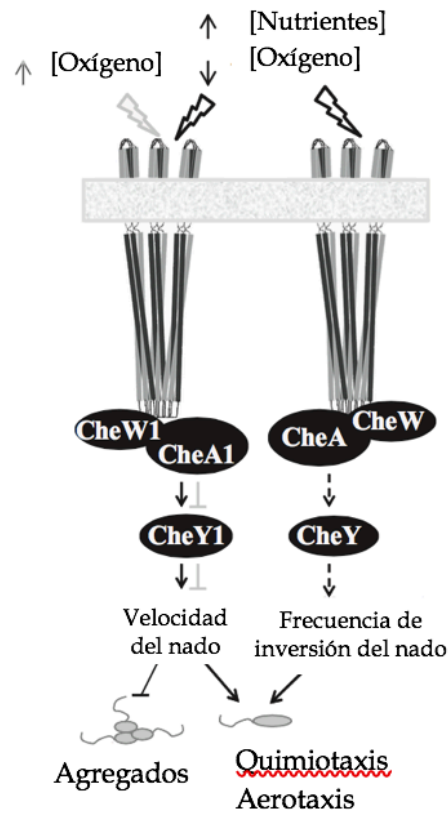
Se demostró que la vía de quimiotaxis Che1 en *A. brasilense*, interviene en la formación de los agregados y floculación, mediante la modulación de la velocidad del nado de las células. Además, se describió que, aunque la formación de flóculos implica la producción de EPS, éstos se producen independientemente de la vía Che1 (Siuti *et al.*, 2011; Bible *et al.*, 2012) (Figura 5).

En *Azospirillum* además se describió, un quimiorreceptor transmembranal Tlp1 (Transduction like protein) el cual se demostró que media taxis de energía en *A. brasilense* y que interviene en la colonización de las raíces de las plantas (Greer-Philips *et al.*, 2004). Tlp1 cuenta con una región periplásmica N-terminal y un módulo de señalización en la región C-terminal. Contiene un dominio PilZ en su extremo carboxilo. Los dominios PilZ se encuentran presentes en diversos genomas bacterianos y se sabe que unen al segundo mensajero di-GMPc (Russell *et al.*, 2013).

Se identificó también, el gen *chsA* como parte de la vía de señalización de quimiotaxis en *A. brasilense*. La arquitectura de la proteína codificada contiene un dominio sensorial PAS y un dominio EAL. Se demostró que una mutante nula del gen, mostraba un fenotipo alterado en la movilidad y la respuesta quimiotáctica, a pesar de no verse afectada la síntesis de flagelos polares y laterales (Carreño-López *et al.*, 2009).

La quimiotaxis se describe como el proceso por el cual las células responden a gradientes de atrayentes presentes en el entorno, moviéndose hacia las condiciones favorables y alejándose de las desfavorables (Stephens, 2006). *Azospirillum* crece de manera óptima cuando la fructosa, o ácidos orgánicos como

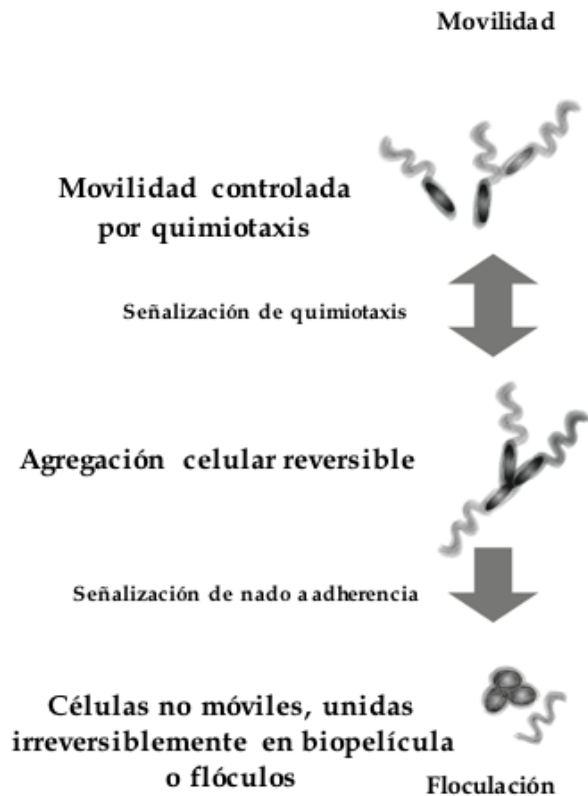
malato o succinato, se utilizan como fuentes de carbono y tiene un pobre crecimiento en aminoácidos como únicas fuentes de carbono. Las raíces de pastos y cereales exudan cantidades significativas de ácidos orgánicos, azúcares y aminoácidos por lo que son compuestos orgánicos que pueden encontrarse en la rizósfera (Alexandre *et al.*, 2000). Las bajas concentraciones de oxígeno presentes en la rizósfera son también uno de los principales estímulos que atraen a las bacterias a las raíces de las plantas.



**Figura 5. Esquema del comportamiento por quimiotaxis de *A. brasilense*.** Las líneas negras y grises en la parte superior representan diferentes condiciones ambientales a las cuales puede estar expuesta la bacteria. Se representan las proteínas de la vía de quimiotaxis y las flechas representan las interacciones entre estas proteínas, en donde las líneas discontinuas representan probables interacciones (Tomado de Russell *et al.*, 2013).

## 2.2. Aerotaxis

La aerotaxis es la capacidad de moverse hacia concentraciones óptimas de oxígeno es una respuesta importante en *Azospirillum* (Burdman *et al.*, 2000), en la cual, una concentración de oxígeno baja, de 3 a 5  $\mu\text{M}$ , es la concentración de oxígeno óptima para la generación de energía y la fijación de nitrógeno (Alexandre *et al.*, 2000; Russell *et al.*, 2013). Cuando las células se exponen a condiciones de oxígeno elevado en su entorno, las células de *A. brasilense* forman pequeños agregados de bacterias que son inicialmente transitorios, pero, si las condiciones de alta aireación persisten, se pierde la movilidad. (Russell *et al.*, 2013; Bible *et al.*, 2015) (Figura 5). Se ha sugerido que estos agregados representan un comportamiento de protección manteniendo un ambiente intracelular microaerofílico que permite la expresión de la nitrogenasa, enzima responsable de la fijación biológica de nitrógeno y sensible a altas concentraciones de oxígeno (Bible *et al.*, 2015). El agrupamiento de las células se describe como un paso previo para la floculación, en donde las células vibroides de *Azospirillum* móviles pasan a células más redondas y no móviles, dispuestas en una matriz de exopolisacáridos (EPS) (Bible *et al.*, 2015) (Figura 6).



**Figura 6. Agregación celular en *A. brasilense*.** La señalización de quimiotaxis y aerotaxis mediante la modulación de la movilidad, promueve interacciones transitorias célula-célula entre células móviles que posteriormente permiten interacciones estables entre células no móviles. La flecha doble indica una interacción reversible, mientras que la flecha unidireccional una interacción irreversible (Tomado de Alexandre, 2015).

El agrupamiento y la floculación también se consideran relevantes para la capacidad de las células para colonizar y establecerse en la rizósfera (Burdman *et al.*, 2000; Bible *et al.*, 2015).

### 2.3. Asociación *Azospirillum*-planta

Una vez que las bacterias se encuentran en las proximidades de las raíces de las plantas, su unión es esencial para una asociación eficaz y la posterior colonización (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000; Rodrigues *et al.*, 2015).

La unión de *Azospirillum* a las raíces de la planta ocurre en dos fases distintas y consecutivas, la fase de adsorción y la fase de anclaje. En la primera fase, de adsorción; las bacterias se unen de manera rápida, débil, reversible y se produce dentro de las 2 horas de inoculación (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Diversos factores han sido implicados en esta primera fase de la asociación planta-bacteria. Uno de ellos, la flagelina, una glucoproteína de masa molecular de aproximadamente 100 kDa presente en el flagelo polar de *A. brasilense* Sp7 (Moens *et al.*, 1995). Otro de esos factores son las lectinas, proteínas que reconocen y se unen de forma específica y reversible a los carbohidratos presentes en la superficie de la raíz de la planta (Mora *et al.*, 2008). Una lectina de naturaleza glucoprotéica con una masa molecular de 36 kDa y especificidad a L-fucosa y D-galactosa fue aislada de *A. brasilense* Sp7 (Alen'kina *et al.*, 2014a). Por otro lado, se encontraron también, receptores específicos en la superficie celular de *Azospirillum* que se unen a lectinas WGA denominadas así por sus siglas en inglés (wheat germen agglutinin) presentes en la superficie de la raíz de la planta. La unión de estos receptores a la lectina WGA en *A. brasilense* Sp245 puede funcionar como una molécula señal en la asociación *Azospirillum*-planta (Alen'kina *et al.*, 2014b).

La fase de anclaje es una unión firme e irreversible, de entre 8 a 16 horas después de la inoculación. (Michiels *et al.*, 1991). Los EPS median esta fase y su componente principal es la L-arabinosa (Bahat-Samet *et al.*, 2004) determinante importante para la capacidad de agregación en cepas de *Azospirillum* (Fibach-Paldi *et al.*, 2012). En *Azospirillum*, la producción de EPS ha sido demostrada con el colorante fluorescente Calcofluor, que detecta enlaces  $\beta$  1-3 y  $\beta$  1-4 en polisacáridos y con el colorante Rojo Congo. (De Troch & Vanderleyden, 1996). Junto con los EPS, los

lipopolisacáridos (LPS) de *Azospirillum*, debido a su inmunoespecificidad contribuyen también a interacciones bacteria-planta. Los LPS consisten de un componente hidrofóbico (lípidos A) anclado a la membrana, y a través del cual el oligosacárido central se une con un polisacárido específico-O (OPS) que contiene unidades repetidas de oligosacáridos (Sigida *et al.*, 2014).

Hasta la fecha, se han identificado tres serogrupos de lipopolisacáridos en el género *Azospirillum*, como resultado del estudio de sus propiedades y estructuras serológicas. Los lipopolisacáridos son los principales componentes de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, contienen los determinantes antigénicos responsables de la especificidad serológica de las bacterias y se encuentran disponibles para la interacción con otras células. El serogrupo I son D-ramnanos lineales que reaccionan de forma cruzada con los anticuerpos específicos para LPS de *A. brasilense* Sp245. En el serogrupo II, las cepas de *Azospirillum* presentan heteropolisacáridos que reaccionan con anticuerpos contra LPS de cepas de *A. brasilense* Sp7. Por último, el serogrupo III comprende cepas que muestran afinidad a LPS de las cepas de *A. lipoferum* Sp59b (Konnova *et al.*, 2008; Shelud'ko *et al.*, 2014).

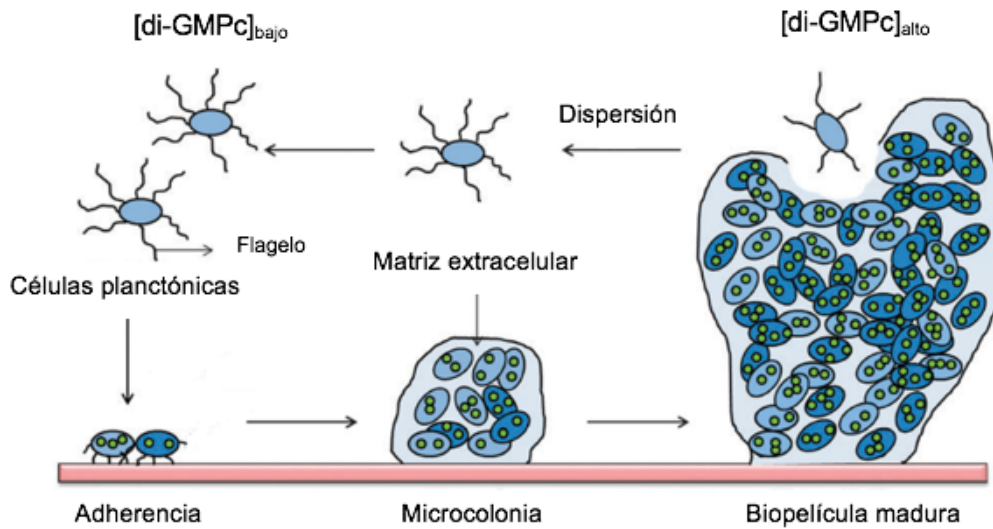
Después de la unión de las bacterias de *Azospirillum*, se comienzan a formar agregados que, con las condiciones favorables, permiten la rápida colonización de los tejidos de la planta y la posterior formación de microcolonias que se producen simultáneamente con la formación de biopelícula (Rodrigues *et al.*, 2015).

### 3. BIOPELÍCULA

La biopelícula es una comunidad microbiana embebida en una matriz de compuestos poliméricos extracelulares que se encuentra asociada a una superficie. Las biopelículas se observaron por primera vez en 1674, cuando Antonie van Leeuwenhoek usó su microscopio simple, en donde observó agregados de los que llamó “animaculos” que raspaba de la superficie de dientes humanos (Donlan, 2002; Garrett *et al.*, 2008). La biopelícula, es una forma de mantener una masa de células en un sitio específico durante un periodo o lapso de tiempo suficiente para iniciar una interacción beneficiosa o antagónica (Danhorn & Fuqua, 2007). Hay diferentes tipos de biopelículas, así como de bacterias, incluso una bacteria puede formar varios tipos diferentes de biopelículas dependiendo las condiciones ambientales (Karatan & Watnik, 2009).

Algunas ventajas que confieren a las bacterias, la formación de biopelícula es: protección contra antibióticos, la oportunidad de transferencia horizontal de genes (HGT), capacidad de sobrevivir en condiciones deficientes de nutrimentos (Danhorn & Fuqua, 2007; Garrett *et al.*, 2008), protección contra factores de estrés ambiental como puede ser radiación UV, cambios de pH, estrés osmótico y desecación (Bogino *et al.*, 2013).

El proceso de formación de biopelícula ocurre en varias etapas que incluyen: (i) proceso de fijación de células a la superficie reversible, (ii) seguido de la fijación irreversible formando una monocapa de células, (iii) desarrollo de microcolonias, (iv) maduración de la biopelícula y finalmente (v) dispersión de la biopelícula (Wolska *et al.*, 2015; Jamal *et al.*, 2018) (Figura 7).



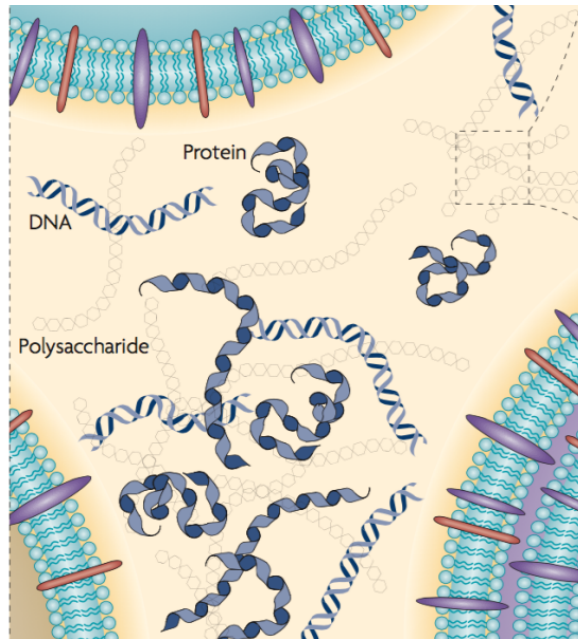
**Figura 7. Modelo de las etapas de desarrollo de la biopelícula.** (Kalia *et al.*, 2013).

La monocapa de células se define como aquella en que la bacteria se encuentra unida solo a la superficie, antes de que ocurran interacciones entre células. Hasta el momento, se han definido algunas estructuras que pueden intervenir en la adherencia a la superficie. Una de ellas es el flagelo, que, aunque se ha descrito que bacterias aflageladas pueden también formar biopelículas, se considera que la movilidad en sí misma mejora la interacción inicial de la bacteria incluso, que acelera la adherencia superficial de muchas bacterias. Otra estructura, es el pilus, que son apéndices largos que se encuentran en los polos de algunas células bacterianas que se cree atraen bacterias a lo largo de las superficies y por último adhesinas (Karatan & Watnik, 2009).

Por otro lado, las multicapas de colonias se desarrollan cuando las bacterias se adhieren a la superficie y entre ellas. Posteriormente la unión se estabiliza y se inicia un proceso de multiplicación y división de células microbianas, dado a través de una señalización química dentro de una matriz extracelular, formando microcolonias (Jamal *et al.*, 2018). Las células dentro de la biopelícula son fisiológicamente distintas que en estado planctónico (Ramey *et al.*, 2004; Flemming *et al.*, 2010; Flemming *et al.*, 2016). Puesto que la difusión de nutrientes vitaminas o cofactores

es más lenta, el resultado es una comunidad bacteriana en la que algunas células son metabólicamente inactivas. Además, la tasa de crecimiento bacteriano en la biopelícula está influenciada por limitación de espacio (López *et al.*, 2010). En las microcolonias se da comunicación intercelular, que estimula rápidamente la regulación de la expresión génica permitiendo una adaptación temporal, como la variación fenotípica, la respuesta a gradientes de difusión de nutrientes, la modulación de su metabolismo en función de su posición dentro de la biopelícula y la capacidad de sobrevivir en condiciones deficientes de nutrientes (Ramey *et al.*, 2004; Garrett *et al.*, 2008).

En la etapa de maduración de la biopelícula, se requiere la transcripción de diferentes genes en comparación con los del estado planctónico, para la formación de la matriz extracelular (Donlan, 2002; Jamal *et al.*, 2018). La matriz extracelular, cuyos componentes son sintetizados por las mismas bacterias (Karatan & Watnik, 2009), es formada principalmente por proteínas, pero otros constituyentes pueden estar presentes como polisacáridos, moléculas de ADN, ARN, iones y agua (hasta 97 %), esta última a la que se le atribuye el flujo de nutrientes dentro de una biopelícula (Figura 8). Aproximadamente del 5 a 35% del volumen de la biopelícula está constituido por microorganismos, el resto es matriz extracelular (Jamal *et al.*, 2018).



**Figura 8. Representación de los principales componentes de la matriz extracelular de una biopelícula.** polisacáridos, proteínas, DNA distribuidos entre las células (Flemming *et al.*, 2010).

La dispersión de la biopelícula permite a las bacterias colonizar otra superficie, completando su proceso de desarrollo (Bogino *et al.*, 2013), sin embargo, a medida que la biopelícula prolifera, aumenta su tamaño y las células que se encuentran en las capas más internas pueden tener un ambiente desfavorable al no tener acceso a nutrientes, sufrir la acumulación de productos de desecho o cambiar las condiciones ambientales. En cualquiera de estos casos, las bacterias son capaces de volver a su modo de vida planctónico. Por lo tanto, se sugiere que el proceso de dispersión es un proceso altamente regulado que, si bien se han descrito redes de señalización, los detalles mecánicos precisos aún son desconocidos. Algunos eventos que pueden ocurrir son la síntesis de enzimas que degraden las adhesinas que unen a las células entre ellas en la matriz o a la superficie, el retorno de la movilidad y la lisis celular (Karatan & Watnik, 2009).

La formación y posterior dispersión de la biopelícula, son procesos finamente controlados, regulados a nivel genético y por señales ambientales. La investigación actual reconoce a la detección de quórum (QS), al di-GMPc y a los pequeños RNA

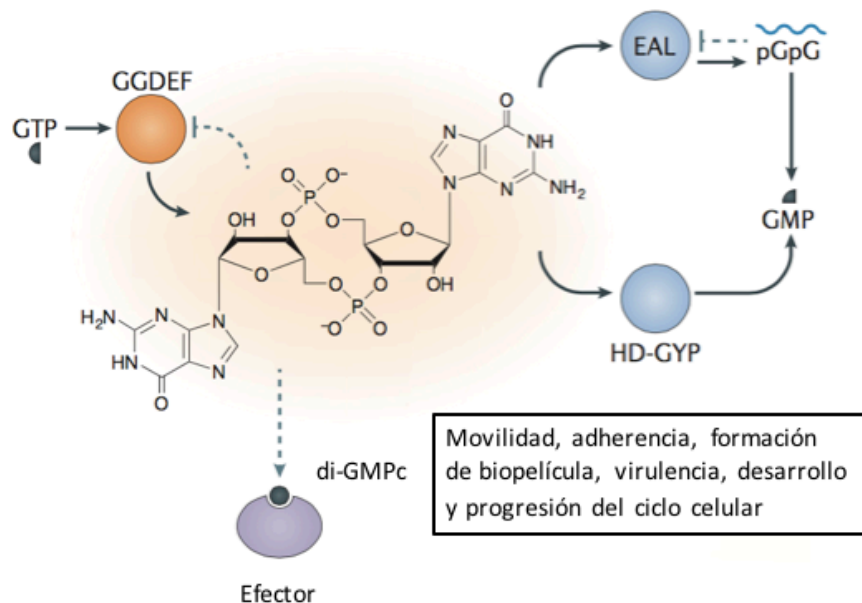
(sRNA) como los principales reguladores de las biopelículas bacterianas. (Fazli *et al.*, 2014). Datos en *Azospirillum* reportan que el di-GMPc tiene un papel importante en la respuesta quimiotáctica y, por consiguiente, en la formación de biopelícula. (Ramírez-Mata *et al.*, 2018).

### 3.1. El segundo mensajero di-GMPc

El di-GMPc es una molécula que funciona como segundo mensajero en bacterias (Hengge, 2009). Fue descrito por Benziman *et al.* (1987) como un activador alostérico de una celulosa sintasa bacteriana de la alfa-proteobacteria *Gluconacetobacter xylinus* (D'Argenio & Miller, 2004). Más tarde, se describió la celulosa sintasa dependiente de di-GMPc en la alfa-proteobacteria *Agrobacterium tumefaciens*, lo que comprueba que el di-GMPc no es una molécula cepa específica, sino que tiene una amplia distribución filogenética (Römling *et al.*, 2013).

Después de su descubrimiento, se identificaron genes que codifican las enzimas responsables de su síntesis y degradación, denominadas como diguanilato ciclasas (DGCs) y fosfodiesterasas (PDEs), respectivamente (D'Argenio & Miller, 2004; Mills *et al.*, 2011) (Figura 9). Estas enzimas responden a señales internas y ambientales regulando los niveles de di-GMPc en la célula (Jenal *et al.*, 2017).

En general, el di-GMPc estimula la biosíntesis de adhesinas y exopolisacáridos que intervienen en la formación de las biopelículas, controla la virulencia de patógenos, la regulación del ciclo celular, entre otras funciones. (Hengge, 2009, Dahlstrom & O'toole, 2017). Un incremento en los niveles celulares de di-GMPc estimula la síntesis de adhesinas y componentes de la matriz que conducen a una formación de biopelícula interfiriendo con la movilidad y la virulencia, mientras que la disminución de los niveles del di-GMPc produce los fenotipos opuestos, es decir, suprime el mantenimiento de adhesinas extracelulares, promoviendo la dispersión de la biopelícula y la virulencia bacteriana (Hengge, 2009; Krasteva *et al.*, 2012) (Figura 7).



**Figura 9. La síntesis de di-GMPc.** La cual es catalizada por las DGCs mediante la acción de sus dos dominios catalíticos GGDEF. Por su parte las fosfodiesterasas con los dominios EAL o HD-GYP hidrolizan el di-GMPc en guanosina (pGpG) o GMP, respectivamente. Una vez formado, el di-GMPc es capaz de regular diversos procesos (Tomado de Jenal *et al.*, 2017).

### 3.2. Síntesis de di-GMPc

El di-GMPc se produce en una reacción de condensación, catalizada por las DGCs a través de la acción cooperativa de sus dominios catalíticos conservados GG(D/E)EF. Cada monómero GG(D/E)EF se organiza de forma antiparalela y contribuye con un sustrato GTP (guanosín trifosfato) para la formación de un enlace fosfoéster con otra molécula de GTP para dar lugar a la molécula di-GMPc (Römling & Simm, 2009; Jenal *et al.*, 2017). Los subproductos de la reacción son dos moléculas de pirofosfato (Römling *et al.*, 2013).

El primer dominio GGDEF se identificó en 1995 en una proteína de *Caulobacter crescentus*, denominada PleD, descrita como regulador global que controla la transición entre el estilo de vida planctónico y una fase de adherencia del ciclo de vida de la bacteria (D'Argenio & Miller, 2004). El dominio consta de 170 residuos de aminoácidos aproximadamente y fue designado así basado en su motivo de

secuencia de aminoácidos característico Gly-Gly-Asp-Glu-Phe, altamente conservado dentro del dominio (Römling & Simm, 2009; Römling *et al.*, 2013). Los primeros dos residuos (Gly) están implicados en la unión de GTP, el tercer residuo (Asp/Glu) es indispensable para la catálisis y el cuarto (Glu) en la coordinación de iones metálicos. El sitio activo (sitio A), que corresponde a este motivo GGDEF está involucrado en la unión a GTP y requiere de  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  para la formación del enlace fosfoéster (Römling *et al.*, 2013). De manera adicional las DGCs son sujetas a inhibición por retroalimentación, en la cual el di-GMPc se une a un sitio de inhibición llamado sitio I, caracterizado por ser un motivo de cuatro aminoácidos RxxD, encontrado cinco aminoácidos río arriba del motivo GG(D/E)EF (Hengge, 2009). Además del GGDEF, se han encontrado DGCs activas con motivos GGEEF, AGDEF (Dahlstrom & O'toole, 2017).

### 3.3. Degradación de di-GMPc

Las fosfodiesterasas, son las enzimas encargadas de degradar el di-GMPc. La catálisis es llevada a cabo mediante un ataque hidrolítico sobre el enlace fosfoéster (Römling *et al.*, 2013). Se han descrito PDEs distintas, las que incluyen el dominio EAL (Glu-Ala-Leu) conservado y otras que contienen dominio HD-GYP con motivo conservado His-Asp-Gly-Tyr-Pro (Jenal *et al.*, 2017; Dahlstrom & O'toole, 2017). Las fosfodiesterasas de tipo EAL constan de aproximadamente 250 residuos de aminoácidos y la primera de este tipo, fue descrita en una proteína de *Bordetella pertussis*, BvgR, la cual actúa como reguladora de genes (revisado en Ramírez-Mata *et al.*, 2014). Estas fosfodiesterasas, hidrolizan el di-GMPc produciendo el dinucleótido lineal de 5'-O-phosphonoguanilyl-(3'->5')-guanosine (5-pGpG) (Jenal *et al.*, 2017). El proceso catalítico requiere de  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  y es inhibido por  $Ca^{2+}$  (Hengge, 2009). Por su parte, las fosfodiesterasas que cuentan con el dominio HD-GYP no tiene similitud de secuencia con el dominio EAL e hidrolizan al di-GMPc para producir 5-pGpG y posteriormente a GMP (Römling & Simm, 2009). Recientes estudios han mostrado que la oligoribonucleasa Orn, es la enzima principal capaz de degradar al pGpG (Jenal *et al.*, 2017).

A pesar de que se tiene conocimiento sobre la estructura y función de las DGCs y PDEs, sus funciones fisiológicas aún no son claras. Solo algunas señales de entrada se han identificado como oxígeno, luz, óxido nítrico, nutrientes (Jenal *et al.*, 2017).

### 3.4. Efectores

Las enzimas responsables de la síntesis y degradación del di-GMPc son fácilmente identificables por sus dominios característicos, sin embargo, debido a la gran diversidad del di-GMPc sobre la fisiología de las células y diferentes procesos celulares, estudios realizados sugieren que existen numerosos efectores que unen al di-GMPc, muchos de los cuales no tienen secuencia o estructura similar entre ellos. Los blancos del di-GMPc identificados incluyen proteínas que contienen dominio PilZ, proteínas que contienen dominios degenerados GGDEF y EAL, receptores de sitio I y otros que incluyen reguladores transcripcionales como los riboswitches (Schirmer & Jenal, 2009; Jenal *et al.*, 2017).

Las proteínas con dominio PilZ, uno de los más estudiados, se encuentra unido al carboxilo terminal de los dominios GGDEF, EAL y/o HD-GYP, o vinculado a un dominio enzimático modulado por el segundo mensajero y que participa en la biosíntesis de una molécula particular como por ejemplo el alginato (Hay *et al.*, 2009). Estudios bioinformáticos y bioquímicos revelan la presencia de dos secuencias cortas que comprenden el dominio consenso de PilZ, RxxxRx (D/N)x(S/A)xxG. Un análisis estructural reveló que se producen cambios conformacionales durante la unión de la proteína tipo PilZ y el di-GMPc (Römling & Simm, 2009). Otro de los dominios que se considera receptor es el sitio I, en donde el dominio GGDEF no está conservado y carece de actividad enzimática, sin embargo, mantiene la capacidad de unirse al di-GMPc, en ciertas DGCs degeneradas (Mills *et al.*, 2011). Otros dos tipos de proteínas efectoras son FleQ y PelD de *Pseudomonas aeruginosa*, donde en la primera su actividad se reduce al unirse a di-GMPc y la otra actúa de forma contraria activándose por su unión al di-

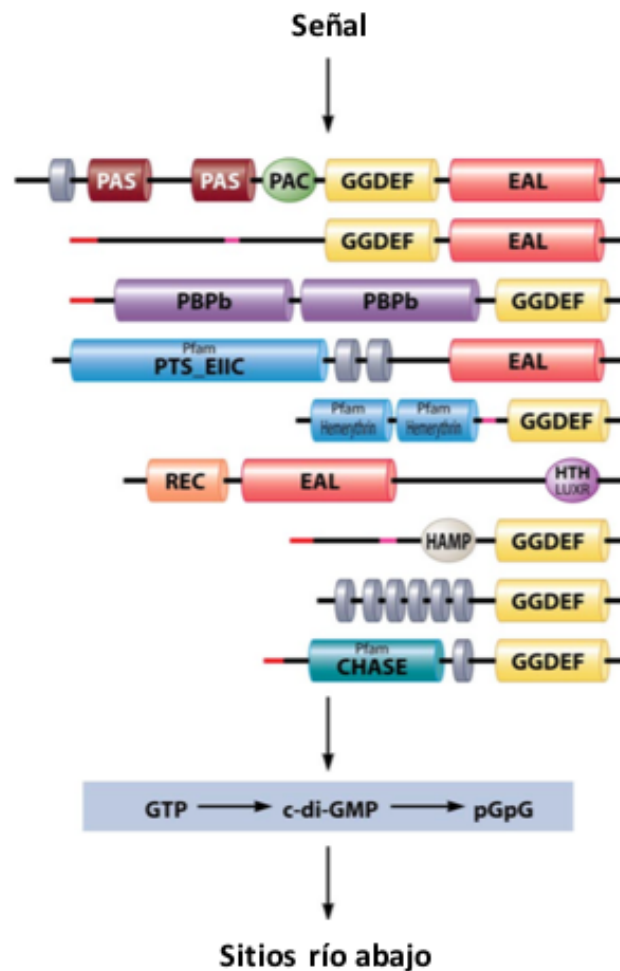
GMPc a través de un sitio similar al motivo del sitio I (Hengge, 2009). El di-GMPc también puede unirse a riboswitches, los cuales son moléculas de RNA, que adoptan una estructura secundaria. Posteriormente a la unión con el RNAm cambia su estructura secundaria, lo que ocasiona cambios en la transcripción, estabilidad del RNAm o la traducción de éste (Römling *et al.*, 2013).

### 3.5. Proteínas Híbridas

Análisis bioinformáticos muestran que, aunque los dominios GGDEF y EAL tienen actividades opuestas, una proteína puede tener ambos dominios, estas proteínas se denominan proteínas híbridas (Dahlstrom & O'toole, 2017; Ramírez-Mata *et al.*, 2018). Existen dos posibilidades de explicar la existencia de dos dominios con actividades enzimáticas opuestas en la misma proteína. La primera es que ambos dominios pueden ser enzimáticamente activos, sin embargo, son diferencialmente regulados de acuerdo a señales intracelulares o ambientales. La segunda posibilidad es que uno de los dominios sea enzimáticamente inactivo y tenga otra función como la unión del sustrato, por ejemplo, la unión de GTP al sitio A del dominio GGDEF inactivo, lo que pueda ocasionar la activación de otro dominio que se encuentre río abajo a éste (Römling *et al.*, 2013).

Realizando un estudio de las proteínas con dominios GGDEF y EAL con diferentes genomas de *Azospirillum* se identificaron dos tipos de proteínas híbridas. En el primer tipo de proteínas híbridas, los dominios cuentan con la secuencia de aminoácidos altamente conservada sugiriendo que tienen ambas actividades DGC y PDE. En contraste, el segundo tipo de proteínas híbridas tienen dominios EAL conservados, pero GGDEF degenerados, por lo que se presume que son proteínas enzimáticamente inactivas (Schirmer & Jenal, 2009; Ramírez-Mata *et al.*, 2018). Para el caso específico de *A. brasilense* Sp245 se han identificado 35 proteínas involucradas en la regulación del di-GMPc de las cuales 20 son proteínas con dominio único GGDEF, 5 con dominio único EAL y 10 proteínas híbridas (Ramírez-Mata *et al.*, 2018).

Además de contener estos dominios relacionados al di-GMPc, las proteínas pueden monitorear señales del medio ambiente mediante otros dominios de señalización, incluidos los PAS, CACHE, CHASE que probablemente reciben señales del entorno las cuales se traducen en una alteración de la actividad enzimática que ocasiona cambios en los niveles de di-GMPc y a su vez esto da lugar a cambios en el comportamiento, metabolismo y desarrollo (Karatan & Watnick, 2009) (Figura 10).



**Figura 10. Diferentes dominios de señalización encontrados en proteínas de la superfamilia GGDEF y EAL / HD-GYP.** Éstas contienen una variedad de dominios sensoriales que probablemente regulen la actividad de los dominios enzimáticos en función de las señales de entrada (Tomada de Karatan & Watnik, 2009).

### 3.6. Dominio CHASE

Denominado como CHASE (cyclases/histidine kinases associated sensing extracellular) debido a que siempre se localiza en regiones extracelulares o periplásmicas, CHASE está formado aproximadamente de 200 a 300 aminoácidos, y se ubica exclusivamente entre dos regiones transmembranales como parte del extremo N terminal de adenilato ciclasas, diguanilato ciclasas y cinasas histidínicas (Mougel & Zhulin, 2001; Heyl *et al.*, 2007). Este dominio se encuentra en receptores transmembranales de bacterias y plantas (Pas *et al.*, 2004) y se predice una ligandos de bajo peso molecular como péptidos y la fitohormona citocinina (Pas *et al.*, 2004; Ramírez-Mata *et al.*, 2018).

El dominio CHASE se ha encontrado en dos proteínas de señalización que controlan el desarrollo en la amoeba *Dictyostelium discoideum*; la histidin cinasa DhkA y la adenilil ciclasas ACG. La cinasa DhkA detecta un pequeño péptido, el cual es liberado por las células en tallo, y desencadena la esporulación, en tanto que la cinasa ACG controla la germinación de las esporas de *Dictyostelium*. Este dominio se encuentra también en una histidina cinasa de *Arabidopsis thaliana*, la cual regula la morfogenesis vascular de la raíz (Mougel & Zhulin, 2001).

#### 4. ANTECEDENTES DIRECTOS

En el laboratorio de la Interacción Bacteria-Planta del CICM ICUAP, se realizó un análisis bioinformático del genoma de *A. brasilense* Sp245, como se indicó se predican 10 genes que codifican para proteínas con ambas actividades, DGCs y PDEs (Ramírez-Mata *et. al.* 2018). Debido a la característica de estos últimos genes, cuyos productos de traducción tendrían presuntivamente dualidad de actividades, tanto de síntesis y degradación del di-GMPc, es de relevancia su estudio y conocimiento para comprender la participación que el di-GMPc tendría en los diferentes mecanismos de interacción bacteria-planta. Por lo que Gamboa-Peréz, en 2014 inició con el estudio de algunos genes, uno de ellos, el gen *dgcD*, seleccionado por la particular arquitectura observada en los dominios que constituyen la traducción del gen. El estudio se inició con la generación de una mutante por inserción de un casete de resistencia a Kanamicina (*dgcD::Km<sup>R</sup>*) tanto en *A. brasilense* Sp7, como en, *A. brasilense* Sp245. Más tarde, se realizó un análisis fenotípico de ambas mutantes, comparándolas con las cepas silvestres (Ramírez-Mendoza, 2016). Dicho análisis mostró que la mutante de *A. brasilense* Sp245 presentó una disminución considerable en la formación de biopelícula y un ligero aumento en la movilidad con diversos quimioattractantes. Con la finalidad de confirmar la contribución del gen *dgcD* en el fenotipo observado, en el presente trabajo se restauró el fenotipo silvestre de *A. brasilense* Sp245 con un gen que codifica para una proteína con ambas actividades diguanilato ciclasa (DGC) y fosfodiesterasa (PDE), mediante la complementación en *trans* de la cepa mutante isogénica *dgcD::Km<sup>R</sup>* de *A. brasilense* Sp245 y con ello, analizar los fenotipos resultantes.

## 5. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se busca el desarrollo del campo con la implementación de nuevas técnicas que promuevan el crecimiento de los cultivos y a su vez reduzcan la contaminación del ambiente por el uso de fertilizantes y químicos, se ha dado paso al desarrollo y estudio de biofertilizantes, que emplean bacterias que se asocian a la planta de manera benéfica.

Procesos importantes para la colonización exitosa de *Azospirillum* a la planta han abierto una nueva línea de investigación, la cual nos permitirá elucidar y conocer a fondo los mecanismos por los cuales estas bacterias interactúan con las plantas. Para entender estos mecanismos, es necesario conocer la función del di-GMPc y la manera en la que interviene en la regulación de diversos procesos de la bacteria, entre los cuales se encuentra la biosíntesis de exopolisacáridos, la formación de biopelícula, y el control de la transición de la movilidad de la bacteria al estado sésil.

Lo anterior explica el interés sobre el estudio fenotípico resultante de la regulación de los niveles de di-GMPc dados por la actividad de una diguanilato ciclasa (DGC) o una fosfodiesterasa (PDE) presente en la proteína nombrada como DgcD.

## 6. OBJETIVOS

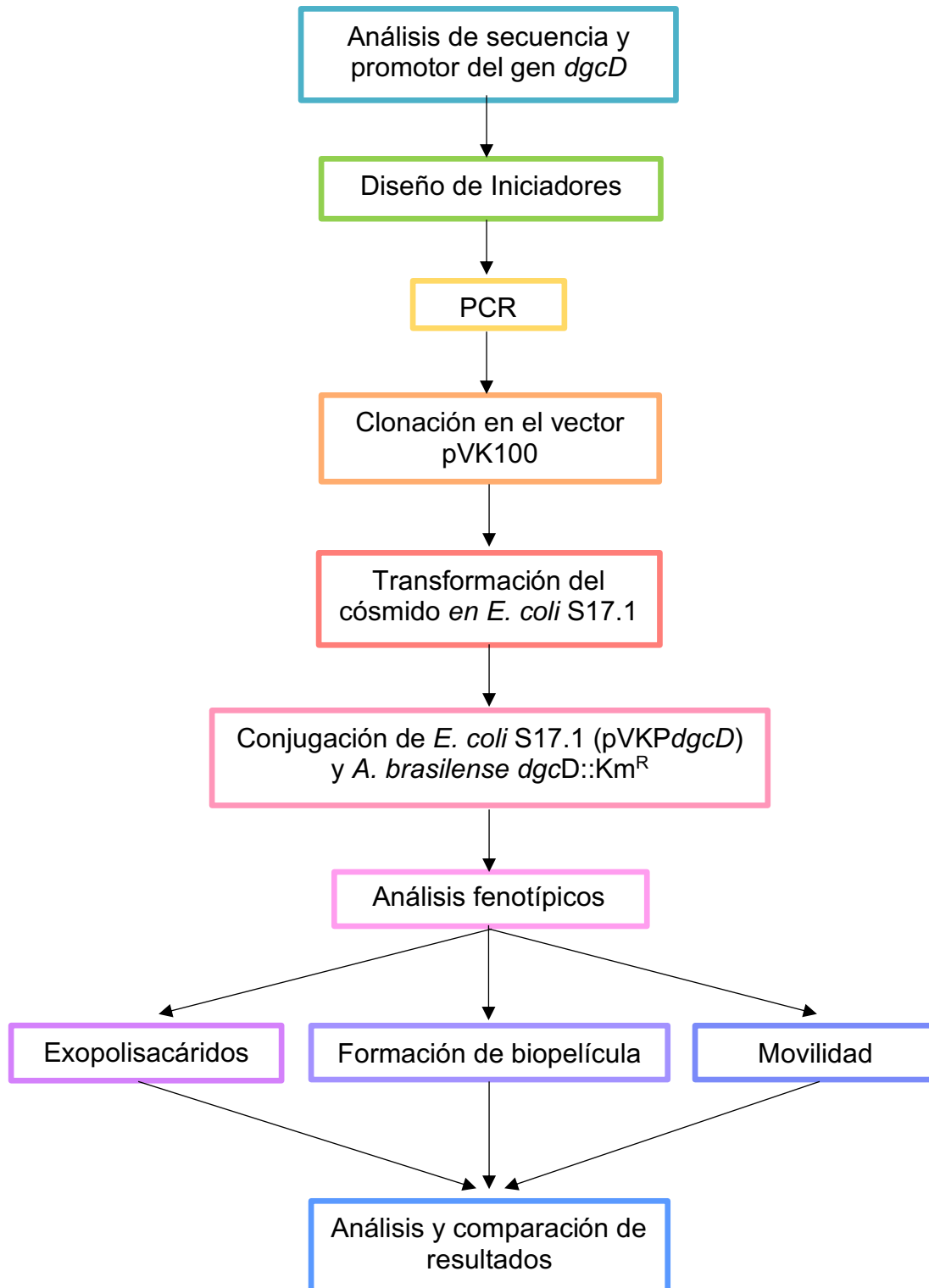
### 6.1. Objetivo General

Determinar el fenotipo de la cepa silvestre y complementada de AZOBR\_100210.

### 6.2. Objetivos Particulares

1. Realizar un análisis bioinformático del gen *dgcD* y su promotor.
2. Construir el cósmido pVKP*dgcD*.
3. Determinar la movilidad y cuantificar la formación de biopelícula y la producción de exopolisacáridos de las cepas *A. brasilense* Sp245, mutante 12-A y *dgcD*::Km<sup>R</sup>(pVKP*dgcD*).

## 7. ESQUEMA EXPERIMENTAL



## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1. Material biológico

**Tabla 1.** Material biológico utilizado en este trabajo.

Cepa	Descripción	Referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169, hsdR17(rk <sup>-</sup> mk <sup>+</sup> ), $\lambda$ <sup>-</sup>	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> S17.1	<i>recA thi pro hdsR4</i> (rk <sup>-</sup> mk <sup>+</sup> ) (RP4-2T::M-Km::Tn7) Tp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> $\lambda$ pir	Simon <i>et al.</i> 1983
<i>Escherichia coli</i> S17.1	pRK2013 (Km <sup>R</sup> RK2- <i>mob</i> <sup>+</sup> RK2- <i>tra</i> <sup>+</sup> ), plásmido de transferencia para conjugación triparental, Sm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Figurski & Helinski, 1979
<i>A. brasilense</i> Sp245	Cepa silvestre aislada de la superficie estéril de las raíces de trigo, (Brasil)	Baldani <i>et al.</i> 1986
<i>A. brasilense</i> D-12A	Mutante <i>dgcD</i> ::Km <sup>R</sup> de <i>A. brasilense</i> Sp245	Gamboa-Pérez, 2014
<i>A. brasilense</i> C-56A	<i>A. brasilense</i> D-12A (pVKPdgcD) Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Este trabajo
<i>A. brasilense</i> C-40A	<i>A. brasilense</i> D12-A (pVK100) Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Este trabajo

**Tabla 2.** Vectores empleados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Referencia
PGEM-TEasy	<i>f1 ori, ori, Amp<sup>R</sup>, lacZ<math>\alpha</math></i> , Promoter: T7, <i>lac</i> , SP6.	Promega
pVK100	Contiene el sitio <i>cos</i> del fago $\lambda$ , únicos sitios de restricción: (H) <i>Hind</i> III (S) <i>Sal</i> I (R) <i>Eco</i> RI (Hp) <i>Hpa</i> I (X) <i>Xho</i> I, Tc <sup>R</sup> y Km <sup>R</sup> . De amplio rango de hospedero.	Knauf & Nester 1982
pVKPdgcD	Contiene insertado el gen <i>dgcD</i> con su presunto promotor, interrumpiendo al gen de resistencia a Km. Tc <sup>R</sup> .	Este trabajo

**Tabla 3.** Iniciadores usados en este trabajo.

Iniciador	Secuencia 5'-3'	Características	Referencia
<b>Mutación del gen <i>dgcD</i></b>			
<b>4571RC</b>	GTGGCGGGGCGATGGGGAAGG	Tm= 69.7 °C, GC=76%	Gamboa-Pérez, 2014
<b>4571DC</b>	GCGGCTGGGTGCGGGACAAC	Tm= 66.2 °C, GC=75% (3668 pb)	
<b>Complementación del gen <i>dgcD</i></b>			
<b>F-ORF210</b>	AGAAAGCTTAGATCCTGGGCATGATCGAG	Tm= 61.3 °C, GC=55.3%, SR=HindIII	Este trabajo
<b>R-ORF210</b>	AGCCTCGAGAGAAGGCGTGGTGACCTTTC	Tm= 66.3 °C, GC=58.6%, SR=XhoI (3070 pb)	
<b>Secuenciación</b>			
<b>M13fwd</b>	GTAAAACGACGGCCAGT	Tm= 60 °C, GC=53%	
<b>M13rev</b>	CAGGAAACAGCTATGAC	Tm= 60 °C, GC=47%	
<b>Secuenciación</b>			
<b>R-Ce210</b>	CAGGAACAGCTCCCGATTCT	Tm= 56.9 °C, GC=55%	Este trabajo
<b>Secuenciación</b>			
<b>RC2-Ce210</b>	CAGCAGATCCAGTTCCGTCT	Tm= 56.8 °C, GC=55%	Este trabajo

### 8.1.1. Condiciones de cultivo y cepas bacterianas

Se utilizaron 4 cepas de *A. brasilense*: la cepa silvestre de *A. brasilense* Sp245, la cepa mutante D-12A de *A. brasilense* Sp245, la cepa complementada C-56A en el gen *dgcD* y la cepa control C-40A que contiene el cósmido que fue usado para complementar (pVK100) introducido en la mutante *dgcD*::Km<sup>R</sup> (Tabla 1). Las cepas se sembraron en los medios correspondientes al ensayo con su antibiótico de selección. Mutante D-12A: Kanamicina (Km) 50µg/ml, C-56A: Km 50µg/ml y Tetraciclina (Tc) 15µg/ml, C-40A: Km, 50µg/ml y Tc a 15µg/ml. Las cuatro cepas fueron sembradas en medio mínimo K-Malato e incubadas durante 18h a 30 °C con agitación constante a 150 rpm. Transcurrido el tiempo, se observó su morfología al microscopio, células de forma vibroide y con movilidad en espiral, posteriormente se resembraron en medio líquido Luria-Bertani Modificado (LB\*, 10 mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM CaCl<sub>2</sub>) incubadas también a 30 °C, 150 rpm durante 18h y en placas

con medio Rojo Congo (RC), éstas se incubaron a 30 °C, después de 48 h de incubación, se observaron colonias redondas y de color rojo escarlata.

En el caso de las cepas de *E. coli* usadas (descritas en Tabla1), estas fueron sembradas en medio líquido Luria-Bertani e incubadas a 37 °C a 150 rpm por 18 horas. *E. coli* DH5 $\alpha$  fue sembrada sin antibiótico y *E. coli* S17.1 con Estreptomicina (Sm) 20 $\mu$ g/ml.

## **8.2. Técnicas de biología molecular**

### **8.2.1. Extracción de DNA genómico (Sambrook & Russell, 2001)**

Se sembraron en tubos con 5 ml de medio LB\* con 1 o 2 colonias de un cultivo proveniente de placas con RC y se incubaron 18h a 30 °C y 150 rpm. En tubo eppendorf (1.5 ml) se concentraron de 3 a 5 ml del cultivo a 10,000 rpm por 3 min; se decantó el medio restante y se obtiene el paquete celular. El paquete celular se resuspendió con 500  $\mu$ l de buffer TE, 30  $\mu$ l de SDS 20% y 3  $\mu$ l de pronasa E (10 mg/ml) y se incubó 1h a 37 °C. Se agregó 100  $\mu$ l de NaCl 3M y 80  $\mu$ l de una solución alcalina de CTAB al 10 % y se incubó a 65°C, 10 min. Posteriormente se agregaron 500  $\mu$ l de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó 5 min a 12,000 rpm. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo limpio y se repitió lo anterior, agregando 500  $\mu$ l de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y centrifugando 5 min a 12,000 rpm. Se volvió a transferir la fase acuosa a otro tubo eppendorf y se lavó nuevamente con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Una vez limpio el DNA, se agregaron 1.5 volúmenes de Etanol 100 %, y se incubó a -80 °C por 15 min. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min y se eliminó el sobrenadante por decantación, cuidando no perder el DNA. Obtenido el DNA al fondo, se lavó con 800  $\mu$ l de etanol al 70 % centrifugando a 10,000 rpm durante 10 min, 2 veces, se eliminó el etanol y se evaporó al colocar el tubo eppendorf con la tapa abierta, en un termoblock a 37 °C por 5-10 min. Quedando únicamente el DNA al fondo del tubo, se resuspendió en 30  $\mu$ l de RNAsa (100  $\mu$ g/ml) y se incubó a 37 °C por 30 min. Finalmente se realizó una electroforesis con 3-5  $\mu$ l de muestra de DNA para

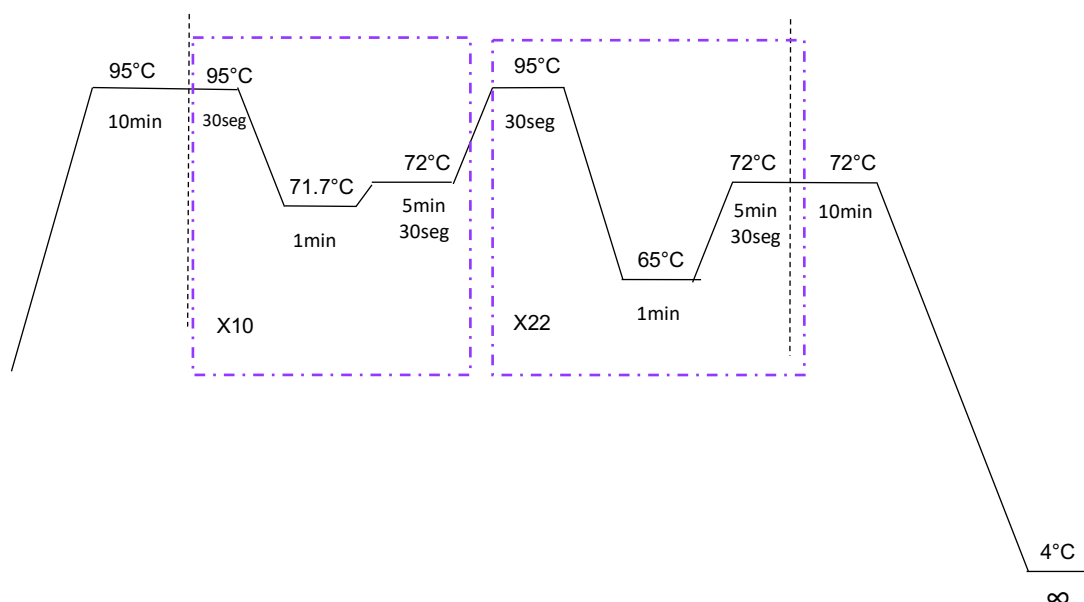
corroborar la calidad de la extracción genómica y el resto de la muestra se almacenó a -20 °C.

### **8.2.2. Extracción de DNA plasmídico**

Con 1 o 2 colonias tomadas de un cultivo en RC, se inoculó 5 ml de LB\* y se incubó por 18h a 30 °C en agitación constante (150 rpm), del cultivo, se tomó de 3 a 5 ml y se centrifugó a 10,000 rpm por 3 min; se decantó el sobrenadante y se obtuvo el paquete celular en el fondo del tubo. Se resuspendió el paquete celular en 300 µl de solución de lisis alcalina I (Tris-HCl 10 mM (pH 8.0); EDTA 1 mM) y se agregó 400 µl de solución de lisis alcalina II (NaOH 200 mM; SDS 1%), se mezcló bien y se colocó el tubo a -20 °C 10 min. Se agregaron 300 µl de solución alcalina III (Acetato de potasio 3.0 M pH 5.5) fría, se mezcló y mantuvo a -20 °C por 15 min. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm, 15 min, y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, se agregaron 200 µl de fenol y 200 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), mezclando bien y centrifugando por 5 min a 10,000 rpm. El sobrenadante se colocó en otro tubo eppendorf y se agregó 400 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min; este procedimiento se repitió hasta que la interfase era clara. Posteriormente se separó el sobrenadante en un tubo eppendorf y se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol, se mezcló bien la solución, invirtiendo el tubo varias veces y se dejó precipitar por 10 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min y se recuperó el DNA. Se eliminó el sobrenadante y el DNA que permanece al fondo del tubo, se lavó, agregando 800 µl etanol al 70% y centrifugando 5 min a 10,000 rpm. Este paso se repitió una vez más. Se eliminó por decantación el etanol y, se evaporó al colocar el tubo con la tapa abierta, en un termoblock a 37 °C de 5 a 10 min. Dejando únicamente el DNA en el tubo, éste se resuspendió en 30 µl de RNAsa (100 µg/ml) y se incubó 30 minutos a 37 °C. Finalmente se realizó la electroforesis con 3-5 µl de muestra de DNA plasmídico, para comprobar la calidad de la extracción y el resto de muestra se almacenó a -20 °C (Sambrook & Russell, 2001).

### 8.2.3. Condiciones para la amplificación del gen *dgcd*

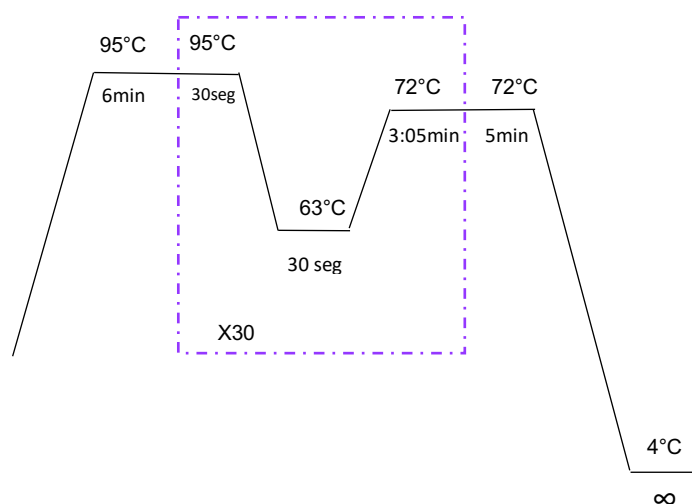
Se llevó a cabo la amplificación del gen *dgcd* usando los iniciadores 4571 DC y 4571 RC (Tabla 3) para la comprobación de la mutación. Bajo las condiciones siguientes: DNA 2ng, dNTP's 4 mM, DMSO 1.5X, iniciador delantero 0.5  $\mu$ M, iniciador reverso 0.5  $\mu$ M, *Taq* Pol 0.5 U, Buffer 2.5  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 1.2mM, H<sub>2</sub>O (7.3  $\mu$ l) (Figura 11).



**Figura 11. Condiciones de PCR establecidas para la amplificación del gen *dgcd*.** Programa de PCR empleado para la obtención del amplificado del gen *dgcd* con los dos iniciadores 4571 DC y 4571 RC para la comprobación de la mutación (Gamboa-Pérez, 2014).

#### 8.2.4. Condiciones para la amplificación del gen *dgcD* con su presunto promotor.

La amplificación del gen *dgcD* con su presunto promotor se llevó a cabo, usando los iniciadores F-ORF210 y R-ORF210 (Tabla 3), se estandarizó bajo las condiciones siguientes: DNA 2ng, dNTP's 4 mM, DMSO 1X, iniciador delantero 1.0  $\mu$ M, iniciador reverso 1.0  $\mu$ M, *Taq* Pol 0.3 U, Buffer 2.0  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 1.25mM, H<sub>2</sub>O (7.45  $\mu$ l) (Figura 12).



**Figura 12. Condiciones de PCR establecidas para la amplificación del gen *dgcD* incluyendo el promotor.** Programa de PCR empleadas para la obtención del amplificado del gen *dgcD* con su presunto promotor, empleando los iniciadores F-ORF210 y R-ORF210.

### 8.2.5. Construcción del cósmido pVKP*dgcD*

La complementación de la mutante D-12A se realizó en *trans*, con el cósmido pVKP*dgcD*. Se realizó un análisis bioinformático para la búsqueda de un probable promotor y una vez identificado se diseñaron iniciadores F-ORF210 y R-ORF210 que amplificaron tanto al gen *dgcD* como a su promotor dando un fragmento de 3,079 pb. El fragmento fue clonado en el vector de mantenimiento pGEM-T Easy (Tabla 2) generando el plásmido pGEMP*dgcD* el cual fue incorporado en *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante transformación química. La selección fue en medio LB adicionado con Ampicilina (100 $\mu$ g/ml) y X-Gal (50 $\mu$ g/ml) y a las posibles clonas que tienen el plásmido, se les hizo extracción plasmídica para comprobar su presencia mediante corte con la enzima de restricción *Sall* y PCR con los iniciadores F-ORF210 y R-ORF210. Posteriormente el fragmento fue clonado en el vector pVK100 (Tabla 2), dirigido a los sitios *XhoI* y *HindIII* para obtener el cósmido pVKP*dgcD* el cual mediante transformación química fue incorporado en *E. coli* S17.1. La selección fue en medio LB adicionado con Tetraciclina (15 $\mu$ g/ml). La complementación se obtuvo por conjugación triparental como se describe a continuación.

### 8.3. Conjugación bacteriana

Para realizar la conjugación bacteriana triparental, se sembraron precultivos tanto para la cepa receptora (Mutante D12-A de *A. brasilense* Sp245), la cepa donadora [*E. coli* S17.1 (pVKP*dgcD*)] y la cepa ayudadora [*E. coli* S17.1 (pRK2013)]; en medio LB modificado adicionado con el antibiótico de selección e incubadas durante 18h con agitación a 150 rpm a 30°C las cepas de *A. brasilense* y a 37°C las cepas de *E. coli*. A partir de los precultivos, en el caso de la cepa receptora, se sembraron 50  $\mu$ l en un tubo con 5ml de LB modificado sin antibiótico y se incubó a 30°C con agitación a 150 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO) de 1.0 y, las cepas donadora y ayudadora, se sembraron 15  $\mu$ l de precultivo en un tubo con 1.5 ml de medio LB modificado sin antibiótico y se incubaron a 37°C sin agitación, hasta que

alcanzaron una  $DO_{600}$  de 0.6-0.8, de la cepa receptora se tomó 1 ml de cultivo y se centrifugó a 7500 rpm durante 3 min, se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió con 100  $\mu$ l de medio LB modificado fresco. Posteriormente en una placa con medio D, se inoculó 20  $\mu$ l de la cepa receptora y se dejó absorber por 10 min, sobre ésta se adicionó 10  $\mu$ l de la cepa ayudadora y se dejó absorber para finalmente inocular 10  $\mu$ l de la cepa donadora. Esto se repitió en cinco puntos de la placa. La placa se incubó durante 48 h a 30 °C, pasado este tiempo, se tomó el crecimiento de los puntos de contacto entre las tres cepas en un tubo con 1 ml de medio mínimo con malato y se agitó con vórtex para disociar la asociación bacteriana. Se tomaron 100  $\mu$ l del cultivo concentrado para diluirlo en 900  $\mu$ l de medio mínimo K-malato (dilución  $10^{-1}$ ); después para la dilución siguiente ( $10^{-2}$ ) se tomaron 100  $\mu$ l de la suspensión  $10^{-1}$  y se diluyó en 900  $\mu$ l de medio mínimo k-malato, y así sucesivamente hasta la dilución  $10^{-3}$ . Se tomaron 100  $\mu$ l del cultivo de cada una, tanto del concentrado como de las diluciones para dispersarlos cada uno en una placa de medio mínimo con malato adicionado con Tc (15  $\mu$ g/ml) y Km (50  $\mu$ g/ml) e incubadas durante 24-48 horas a 30 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se seleccionaron las transconjugantes obtenidas y se sembraron en placas de medio mínimo con malato y el antibiótico de selección, colocando una cuadrícula enumerada en la base de la placa. Se incubó a 30 °C por 24 h. Se dieron 2 pases consecutivos de medio mínimo con malato y el antibiótico de selección para la eliminación de la cepa donadora, y posteriormente en medio Rojo Congo. Finalmente se sembraron en medio mínimo líquido con malato, para llevar a cabo una extracción genómica o plasmídica según sea el caso y realizar la comprobación de la transconjugante por PCR y cortes con enzimas de restricción en geles de agarosa a la concentración indicada.

## 8.4. Ensayos fenotípicos

### 8.4.1. Ensayo de Biopelícula

Condiciones de crecimiento para de los ensayos de biopelícula: Las cepas fueron sembradas en medio LB\* para el precultivo y posteriormente sembrada en medio Nfb (Nitrogen fixation biological) con una relación carbono/nitrógeno de 2, empleando ácido málico como fuente de carbono y nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>) como fuente de nitrógeno (Arruebarrena Di Palma *et al.*, 2013).

A partir de un cultivo previamente crecido durante 3 días a 30 °C en placa de RC, se inocularon 15 ml de medio de cultivo LB\* contenidos en un matraz Erlenmeyer de 50 ml, con 1 a 3 colonias de la cepa de *Azospirillum* a estudiar y se incubó a 30 °C y 150 rpm, aproximadamente 16h. Hasta que el cultivo alcanzó la densidad óptica a 600nm (DO) de 1.1 a 1.4. Se tomó entonces, 1 ml de cultivo en un tubo eppendorf y se centrifugó a 8,000 rpm durante 3 min, se decantó el sobrenadante y el paquete celular que queda al fondo del tubo se resuspendió en buffer de fosfatos [(BF), 66 mM pH 6.8], se obtuvo una DO<sub>600</sub> 2.0. El volumen de BF en el que se debe resuspender se calcula de la siguiente forma:

$$\text{Volumen de BF para resuspender (ml)} = \text{DO del cultivo} / \text{DO 2}$$

De la suspensión DO de 2.0, se realizó una dilución 1:100, se tomaron 90 µl y agregaron a un tubo con 9 ml de medio Nfb (relación C/N=2). Esos 9 ml se agitaron con vórtex y se colocaron 8 ml en una placa de cultivo celular (SARSTEDT 24 pozos) distribuidos en 4 pozos con 2 ml cada uno. Esto último se realizó por duplicado para poder inocular dos placas, una que se usó para determinar la unión de Cristal Violeta (CV) a la biopelícula y la otra para hacer la determinación de proteínas totales. Cada placa fue inoculada con 2 cepas, cada cepa tiene 3 réplicas y 9 pseudoréplicas. Se incubó por 3 días a 30 °C en condiciones estáticas y en cámara húmeda. Transcurridos los 3 días, se sacaron las placas de la incubadora y a una de ellas se le agregaron 500 µl de CV al 0.5 % a cada pozo y se dejó por 40 min a temperatura

ambiente. Posteriormente, el medio de cultivo se decantó y eliminó el CV no adherido y se dejó secar sobre un papel absorbente durante 1 h. Se agregaron 2ml de ácido acético al 33 % y se resuspendió cuidadosamente para homogenizar la biopelícula y extraer el CV. Para finalizar, se tomaron 200  $\mu$ l de cada pozo y se colocaron en una placa para medir al espectrofotómetro a una longitud de onda de 595nm, en caso necesario, se realizó una dilución para la lectura.

**Nota:** La biopelícula se normalizó al determinar las proteínas totales.

#### **8.4.2. Ensayo de Movilidad**

Se tomaron de 2 a 3 colonias de un cultivo previo en placa de RC, y se inocularon a un tubo con 5 ml de LB\* preparado a una concentración de NaCl de 10 mM y se incubó a 30°C y 150 rpm durante 18 h. Se tomó 20  $\mu$ l del cultivo para observarlo al microscopio y después 20  $\mu$ l más, para inocular a 20 ml de LB\* contenidos en un matraz Erlenmeyer de 50 ml de capacidad y se incubó 18 h a 30 °C con agitación a 150 rpm. Se midió la DO<sub>600</sub>, entre 0.5-0.6 con un número de UFC/ml de  $7-9 \times 10^{11}$ .

El ensayo de movilidad, se realizó en el medio de cultivo, base K más la fuente de carbono a evaluar, preparado el mismo día. Cuando el medio se atemperó, se complementó. Se adicionó en placas cuadradas que fueron previamente esterilizadas con luz ultravioleta (UV) durante 20 min. Las placas se dejaron ligeramente abiertas con el mechero encendido 5 min, se mantuvieron cerradas por 45 min.

El cultivo inicial fue diluido agregando de 250 a 350  $\mu$ l en un matraz Erlenmeyer con 10 ml de LB\* y entonces a partir de éste, se inocularon 5  $\mu$ l del cultivo en la placa, se dejó la placa abierta durante 5 min e incubó a 30 °C en condiciones estáticas y en atmósfera húmeda durante 48 h.

Al final se realizaron UFCs del matraz donde se hizo la dilución, para corroborar que realmente se inoculó de  $5 \times 10^5$  a  $10^6$  UFCs de las cepas que se realizó el ensayo. Pasando las 48 h, se midió el diámetro del crecimiento quimiotáctico.

### 8.4.3. Cuantificación de Exopolisacáridos

Se inocularon 15 ml de medio LB\* contenido en un matraz Erlenmeyer con 1 a 3 colonias de la cepa de *Azospirillum* a estudiar, previamente sembrada en placa de RC y se incubó por 18 h a 30 °C en agitación constante, 150 rpm. El cultivo debe alcanzar una DO<sub>600</sub> 1.1 a 1.4. En un tubo eppendorf, se alicuotó 1ml del cultivo y se centrifuga 8,000 rpm durante 3 min, se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en BF 66 mM en un volumen en donde se obtuvo una DO 2.0, de esta suspensión, se realizó una dilución 1:100 con medio NFb (relación C/N=2), en tal caso se sembraron tubos con 3 ml y se incubaron en condiciones estáticas a 30 °C durante 3 días.

Transcurridos los 3 días, se recolectaron las células por centrifugación a 10,000 por 3 min y se lavó con 1ml de medio NFb. Luego se resuspendió el paquete celular en 1 ml de NFb más Rojo Congo 40 µg/mL. (Se le agregan 40 µl de RC a 1mg/mL) y se incubó a 30 °C en agitación constante 150 rpm durante 2 h. Pasando las 2 h, se recolectaron las células y exopolisacáridos por centrifugación a 13,000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante se leyó al espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm.

Para calcular la concentración de EPS que se unieron al RC se hizo una curva estándar con las lecturas de una solución de RC en NFb de 0 µl/mL hasta 40 µl/mL.

**Nota:** Tanto biopelícula como EPS se normalizan con la cantidad de proteínas totales.

### 8.4.4. Determinación de proteínas totales

A partir del ensayo de biopelícula, se tomó una alícuota del cultivo de 6 pozos, como réplica, para la cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford (Bradford Reagent BIO-RAD). El paquete celular se lavó 2 veces con buffer de fosfatos [(BF) 10 mM] y al final se resuspendió en 1 ml del mismo. Se agregó 1 ml de NaOH 1N y se calentó a ebullición por 5 min. Se dejó enfriar y se agregaron 2 ml de HCl 0.5 M. Del volumen total final (4ml) se tomó 1 ml para posteriormente sonicar

la muestra a una amplitud de 60 Hertz, 5 pulsaciones durante 30 seg, y espacios de 30 seg de reposo, repitiendo el proceso 3 veces. Posteriormente, se diluyó 1:10 en un volumen final de 150 µl, se adicionó la misma cantidad de reactivo de Bradford, y se cuantificó al espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Se calculó la cantidad de proteínas totales a partir de la curva estándar de proteínas con albúmina sérica bovina (BSA) grado biología molecular 1 mg/mL.

### 8.5. Diseño de iniciadores

Una vez que se identificó el presunto promotor del gen, se diseñaron iniciadores F-ORF210 y R-ORF210 (Figura 13) los cuales cuentan cada uno, con un sitio de restricción en su secuencia (Tabla 3).

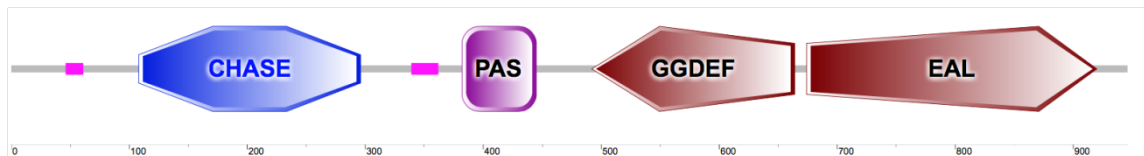


**Figura 13. Esquema que muestra la ubicación del promotor y los iniciadores diseñados.** En la parte inferior la ubicación de las cajas -10 y -35. En la parte superior, ubicación de los iniciadores delantero y reverso nombrados como F-ORF210 y R-ORF210, respectivamente.

## 9. RESULTADOS

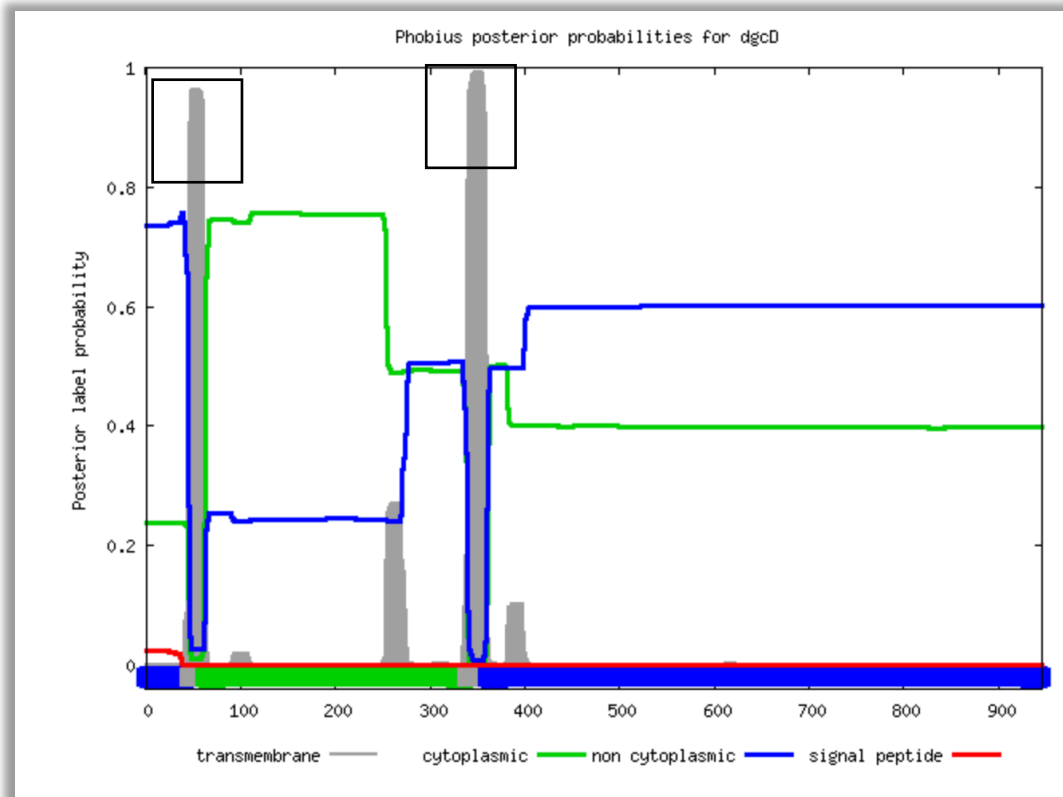
### 9.1. Análisis bioinformático de la proteína DgcD

El gen *dgcD* se ubica en el cromosoma bacteriano de *A. brasilense* Sp245 identificado como WP\_014240087. Cuenta con 2,841 pb que codifican para una proteína con 946 aminoácidos; los cuales constituyen diferentes dominios identificados mediante el programa SMART (Figura 14).



**Figura 14. Representación esquemática de los dominios de la proteína DgcD.** Se empleó el programa SMART protein que predice que la proteína incluye cuatro dominios: **CHASE** (Cyclases/Histidine kinases, un dominio **PAS** (Per- Arnt-Sim) y los dominios **GGDEF** y **EAL**.

Debido a que se reporta que el dominio CHASE se ubica por lo general flanqueado entre dos regiones transmembranales (TMD), se realizó un análisis en el programa Phobius para localizarlas (Figura 15).



**Figura 15. Análisis de la proteína DgcD con la herramienta Phobius.** El programa predice los dominios transmembranales contenidos en la secuencia proteica del gen *dgcD*, indicados en la imagen como picos de color gris y marcados en recuadros negros.

Mediante análisis bioinformático, se verificó además de los dominios, la localización y tamaño de los dominios que conforman al gen *dgcD*. Dicho gen, codifica para una de las diez proteínas híbridas encontradas en *A. brasilense* Sp245 (Tabla 4, Figura 16).

**Confidently predicted domains, repeats, motifs and features:**

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

Click on a row to highlight the feature in the diagram above. Click the feature name for more information.

**Tabla 4. Resultados del programa SMART protein de los dominios conservados de la proteína DgcD.** Se indica donde inicia y donde termina cada uno de los dominios y el e-value de cada secuencia.

MGALEGRRSGVTGSFGTAMQRSSSPDPIDLAPSGSAADSVAVPKRLPPLLALLAALLLTALA  
 WHDTRQRVAADAESRFALRVEELHRRFENQIQVYVQVTRSAAALFTAYPEVKRTEWNRFVD  
 GLHLAERFPGITAVAFARVADQWTSPELVTEARM DGLRNFR IWPESTGPVRLVTLYAAPVN  
 ERTLRLTLGYDLLSEPVRRAAAEQARDSGEP AVTRAVALRLDEGEASPPAFIVFQAVYRDGL  
 SPATQERRRATFAGLVMTPIHVAPLAESVFGRMNDIAATVFEGRREFPLYRSRPEPSEQPL  
 LTASRDVTLGSRVWSVQYESRPSFEDA VDSWKPTLVLATGLSLSVLLSTLLWALAATRDR  
 LVIARRITTSRRRETELDLLFNQAPLGI ALIGPDAKITDCNPAFARAVGVGRDGLIGIDT  
 KLRAQDPAVIAAIDA A IAGESVRLEVDRLLLAGGRHSHFSLHLQPVSTPGDPPFVMAFVED  
 IGDKRRAEQHIHYLAHYDPLTGLPNRVLLFDRIAQAARQARRDGGKVAVLFDLDHFKVIN  
 DSLGHSFGDEVLR SVARRLHGGMRPTDTVGRLGGDEF LIVVP AIQKAAEAAVAEKVLAQL  
 AAPFAIGGRNFVSPSIGISLFPDDAEDA EGLIRCADIAMYN AKDAGR NAYRFVTREMGAR  
 SRERLDLEAALRRALQNR EFLVYQPQLRISDDL VVGVEAL LRWRHPEAGLIMP NRFLPVA  
 EETGLIQPIGDWVLDEVCAQIGRWRDQIGLAVPVAVNVSAQQFRDQQLPAKVAAALDRNGL  
 QGWELEIEVTEGTLIDDI PSAIATLRALKQRGCLIALDDFGTGYSSLNYLHRFPIDKLIKID  
 RSFIHDLEQDGAGDSIPRAIVGLGRSLGLSVVAEGVETEAQLQLLRSLKCESFQGYLFSRP  
 VLAEELEPILALRAARGHHASKVEPMARAPV

**Figura 16. Secuencia de aminoácidos de la proteína de DgcD y número de residuos de aminoácidos de cada dominio.** Se representa con colores cada dominio de la proteína. Dominios TMD de 16 y 24 a. a. (letras en color anaranjado), dominio CHASE de 189 a. a. (letras en azul), dominio PAS de 64 a. a. (letras en rosa), dominio GGDEF de 173 a. a. (letras en verde), dominio EAL de 247 a. a. (letras en color morado).





```

RocR      TYNLVDKLFWQLFSQGLATRRKLAQLGQPINLAFNVHPSQLGSRALAENISALLTEFHL 119
dgcD      ETGLIQPIGDWVLEVCAQIGRWRDQIGLAVPVAVNVSAQQFRDGQLPAKVAAALDRNGL 120
WP_051140186 ETGLIQAIIGDWVLEVCAQIRRWRDQIGLTVPIAVNVSAQQFRDGQLPAKVATALDRNGL 120
WP_063922630 ETGLIQAIIGDWVLEVCAQIRRWRDQIGLTVPVAVNVSAQQFRDGQLPAKVDAALDRNGL 120
BAI76528  ETGLVVAMGDWVLEFACAQIRRWRQRFDLSPVAVNVISGAQFRDGQLPAKIAHALDVHGL 120
WP_045584990 ETGLVLAMGDWVLEFACAQIRRWRTRFNLSVPVAVNVSGAQFRDGHLPAKVARALDANGL 120
WP_014250090 ETGLVLAMGDWVLEFACAQIRRWRARFDLSVPVAVNVSGAQFRDGQLPAKVARALDANGL 120
WP_063635905 ETGLVLAMGDWVLEFACSQIRRRRSRFDLSIPVAVNVSGAQFRDGQLPAKVARALDANGL 120
          .*:      * * .      *      :. : :*.*:      * : . * : : * *

```

```

RocR      PPSSVMFEITETGLISAPASLENLVRRLRIMGCGLAMD DFGAGYSSL DRLCCEFPFSQIKL 179
dgcD      QGWELEIEVTEGLIDDIPSATLRLKQRGCLIALD DFGTGYSSL NYLHRFPIDKIKI 180
WP_051140186 QGWELEIEVTEGLIDDVPSATLRLKQRGCLIALD DFGTGYSSL NYLHRFPIDKIKI 180
WP_063922630 QGWELEIEVTEGLIDDIPSATLRLKQRGCLIALD DFGTGYSSL NYLHRFPIDKIKI 180
BAI76528  SGPELEIEVTESLIGDVEAAAATLMALKERGVLIAD DFGTGYSSL SYLHRLPIDKIKI 180
WP_045584990 SGPELEIEVTESLIDDVEAAETLAALKRRGVLIAD DFGTGYSSL SYLHRLPIDKIKI 180
WP_014250090 SGPELEIEVTESLIDDVESAAATLGALKQRGVLIAD DFGTGYSSL SYLHRLPIDKIKI 180
WP_063635905 SGPELEIEVTESLIDDVESAAATLGALKQRGVLIAD DFGTGYSSL SYLHRLPIDKIKI 180
          . : .*:** * * .      : : . * * : * : * :*:***:***** . * .*: : : : :

```



```

RocR      DRTFVQMKKTQPRSCAVISSVVALAQLGISLVVEGVESDEQVRVRLIELGCSIAQGYLFA 239
dgcD      DRSF IHDLEQDGAGDSIPRAIVGLGRSLGLSVVAEGVETEAQLQLLRSLKCESFOGYLFS 240
WP_051140186 DRSF IHDLEQDGAGDSIPRAIVGLGRSLGLSVVAEGVETEAQLQLLRSLKCESFOGYLFS 240
WP_063922630 DRSF IHDLEQDGTGDSIPRAIVGLGRSLGLSVVAEGVETEAQLQLLRSLKCESFOGYLFS 240
BAI76528  DRSF IRLDLAGDSDASVPRAIVGLGRSLGLSVIAEGVETQEQQLLRDLACESYOGYLF 240
WP_045584990 DRSF IHDLSTGASNTSVPRAIVGLGRSLGLSVIAEGVETQEQQLLRDLSCESYOGYLF 240
WP_014250090 DRSF IHDLSTGASDASVPRAIVGLGRSLGLSVIAEGVETQEQQLLRDLSCESYOGYLF 240
WP_063635905 DRSF IHDLSTGASDVSVPRAIVGLGRSLGLSVIAEGVETQEQQLLRDLSCESYOGYLF 240
          **: * : . :      . : :      : : * . : : : : : : : : : : : : : : * * * * . * : : : :

```

**Figura 18. Alineamiento del dominio PDE de la proteína DgcD.** Dominios de proteínas de genomas de *Azospirillum*. Similar a la proteína DgcD y comparándola con el dominio de la proteína RocR de *P. aeruginosa* PAO1. Se resaltan en color los aminoácidos importantes para la función fosfodiesterasa. Sitio de unión a GMP en color vino, sitios de unión a metal en fondo gris, el lazo 6 en fondo morado y sitio de unión a agua en fondo azul. El alineamiento fue realizado en Clustal omega. En la parte inferior de cada residuo conservado un Weblogo muestra la conservación de cada aminoácido formando parte del sitio.

### 9.3. Predicción de promotor del gen *dgcD*

Para poder hacer la complementación del gen *dgcD* con su propio promotor, primero se llevó a cabo la predicción de dicho promotor con ayuda de programas bioinformáticos: DOOR, FBGENES y BPRM de softberry. Las siguientes imágenes muestran que el gen *dgcD* es una unidad transcripcional independiente (Figuras 19 y 20).

```
Prediction of potential genes in microbial genomes
Time: Tue Jan 1 00:00:00 2005
Seq name: PcdgD
Length of sequence - 6135 bp
Number of predicted genes - 4
Number of transcription units - 2, operons - 1
  N      Tu/Op  Conserved S      Start      End      Score
      pairs(N/Pv)
  1      1 Op  1      .      +      CDS      1 -      885      536
  2      1 Op  2      .      +      CDS      964 -     2571     1046
  3      1 Op  3      .      +      CDS      2658 -    3164      351
  4      2 Tu  1      .      +      CDS      3289 -    6129     1789
```

**Figura 19. Información sobre el promotor del gen *dgcD* obtenida del programa softberry.** Se indica que los genes que se encuentran río arriba al gen en estudio probablemente forman parte de un operón, sin embargo, el gen de interés se muestra como un gen independiente con su propio promotor.

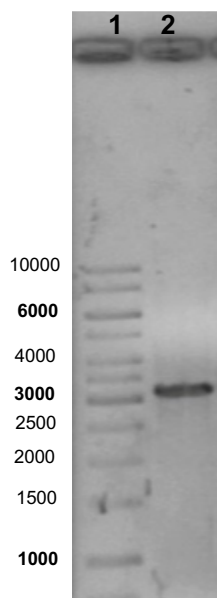
```
>PcdgD
Length of sequence-      305
Threshold for promoters - 0.20
Number of predicted promoters -      1
Promoter Pos:      193 LDF- 2.03
-10 box at pos.      178 GGTTAAGGT Score      43
-35 box at pos.      158 TTTTCG      Score      28

Oligonucleotides from known TF binding sites:

For promoter at      193:
  rpoD15: TTTTCGCA at position      158 Score -      6
```

**Figura 20. Predicción de cajas en el programa softberry.** Se encuentra que este promotor cuenta con cajas -10 y -35, siendo los nucleótidos de estas regiones los principales puntos de contacto entre la enzima polimerasa y el DNA.

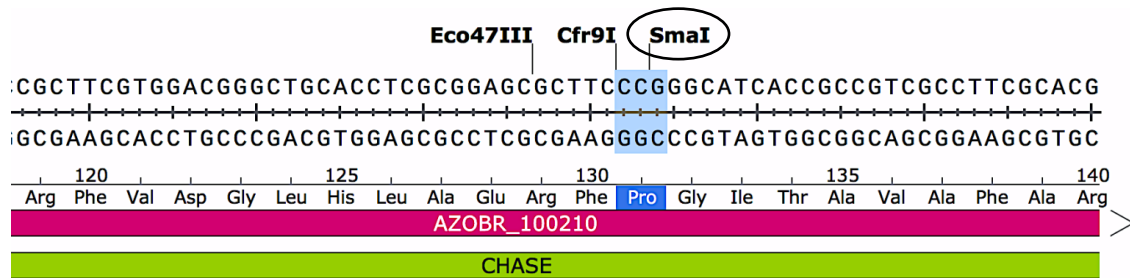
Una vez diseñados los iniciadores F-ORF210 y R-ORF210 (Tabla 3, Figura 13) se realizó un PCR a partir de DNA genómico de *A. brasilense* Sp245 obteniendo un amplificado de 3,079 pb (Figura 21).



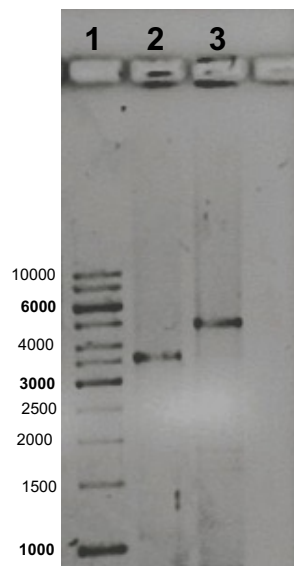
**Figura 21. Corrimiento electroforético de producto de amplificación del gen *dgcD* y su promotor.** PCR usando los iniciadores F-ORF210 y R-ORF210 para la amplificación del gen *dgcD* y promotor. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: amplificado de 3,079 pb a partir de DNA genómico de la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245.

#### 9.4. Análisis de la mutante 12-A

Previo a realizar la complementación se verificó la mutante 12-A (Gamboa-Pérez, 2014), la cual tiene una inserción de un casete de Kanamicina (Km) en el gen *dgcD* interrumpiendo el marco de lectura del mismo (Figura 22). La mutante 12-A y la cepa silvestre de *A. brasilense* Sp245 fueron verificadas por PCR a partir de DNA genómico usando los iniciadores 4571RC y 4571DC, esperando un amplificado de mayor tamaño en la cepa mutante de 4,868 pb, debido a la inserción del casete de Km (1.2 Kb) y de 3,668 pb para la cepa silvestre (Figura 23).



**Figura 22. Secuencia del sitio de inserción.** Se indica el casete de Km interrumpiendo el marco de lectura en el aminoácido Prolina del dominio CHASE.



**Figura 23. Corrimiento electroforético de producto de PCR de la mutante 12-A.** Usando DNA genómico de ambas cepas: *A. brasilense* Sp245 y la mutante 12-A, y los iniciadores 4571RC y 4571DC. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: amplificado de 3668 pb de la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245, carril 3: amplificado de 4868 pb de la mutante 12-A aumentando 1.2 kb en comparación con el amplificado de la cepa silvestre, por el casete de Km.

## 9.5. Construcción del plásmido pGEMP*dgcD*

El amplificado que incluye al gen *dgcD* con su promotor se clonó en el vector pGEM-TEasy y se transformó en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Las colonias obtenidas se seleccionaron por resistencia a Ap (100 $\mu$ g/mL) y con el DNA plasmídico, se comprobó la construcción pGEMP*dgcD* mediante PCR usando los iniciadores F-ORF210 y R-ORF210 (Figura 25A) y mediante restricción utilizando la enzima *Sall* generando dos fragmentos, de 4477 pb y 1618 pb (Figura 24 y 25B).

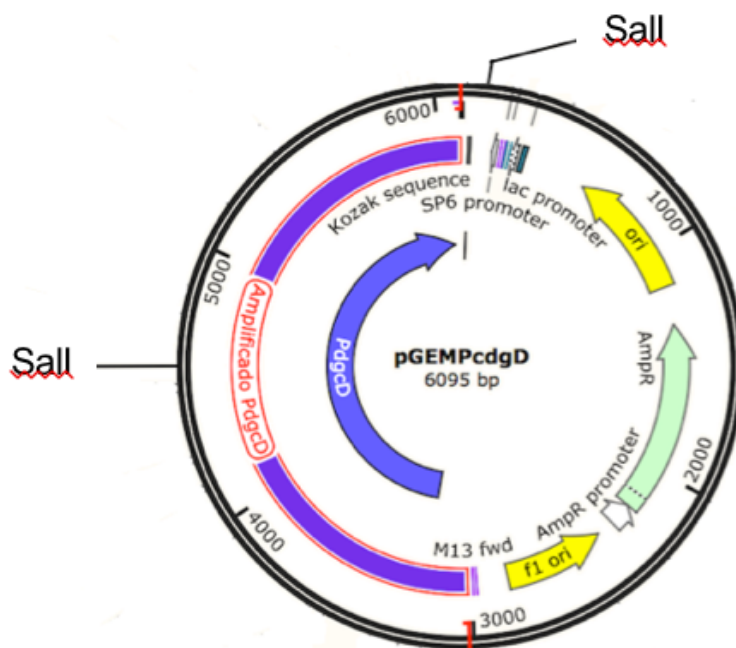
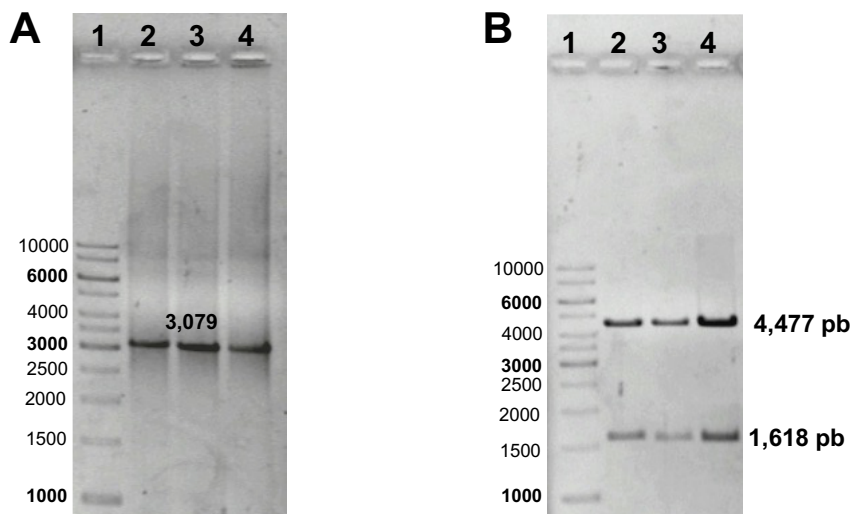


Figura 24. Mapa de la inserción del gen *dgcD* con su promotor en el vector pGEM-TEasy. Imagen que muestra los sitios de corte de la enzima *Sall* en el plásmido construido pGEMP*dgcD*.



**Figura 25. Verificación de la clonación del gen en el vector pGEM-Teasy. A)** Amplificado de 3,079 pb usando los iniciadores F-ORF210 y R-ORF210 a partir de DNA plasmídico de clonas 5, 8 y 15 de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con el plásmido pGEMPdgcD. **B)** Patrón de restricción de pGEMPdgcD proveniente de las mismas clonas con la enzima *Sall* obteniendo fragmentos de 4,477 pb y 1,618 pb.

### 9.5.1. Secuenciación

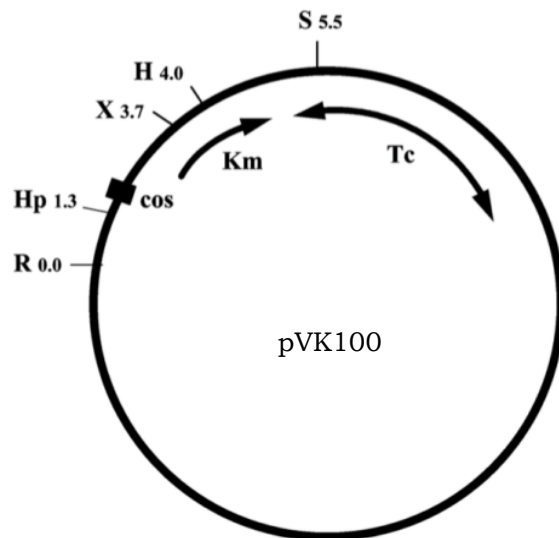
Una vez construido el plásmido pGEMPdgcD se procedió a realizar la secuenciación. Ésta se inició a partir de los iniciadores M13 fwd y M13 rev, seguido de un caminado con ayuda de dos iniciadores más para finalizar la secuenciación (Tabla 3). Se realizó un alineamiento de proteínas para determinar la conservación de los sitios importantes para la actividad de cada dominio. Se encontró dos cambios de aminoácidos en la proteína secuenciada, uno en el dominio PAS en donde hay un cambio de una treonina por alanina, y el segundo, al inicio del dominio GGDEF en donde el glutámico cambió por lisina, sin embargo, a pesar de estos cambios, el sitio activo se encuentra completo y sin cambios para llevar a cabo su función. (Figura 26).

dgcD	MGALEGRRSVGTGSFGTAMQRSSSPDFIDLAPSGSAADSVAVPKR <b>LPLLALLAALLLTAL</b>	60
dgcDsec	MGALEGRRSVGTGSFGTAMQRSSSPDFIDLAPSGSAADSVAVPKR <b>LPLLALLAALLLTAL</b> *****	60
dgcD	AWHDTRQRVAADAESRFALRVEELHRRFENQIQVYVQVTRSAAALFT <b>TAYPEVKRTEWNR</b>	120
dgcDsec	AWHDTRQRVAADAESRFALRVEELHRRFENQIQVYVQVTRSAAALFT <b>TAYPEVKRTEWNR</b> *****	120
dgcD	VDGLHLAERFPGITAVAFARVADQWTSPELVTEARM DGLRNFRIWPESTGPVRLVTLTYAA	180
dgcDsec	VDGLHLAERFPGITAVAFARVADQWTSPELVTEARM DGLRNFRIWPESTGPVRLVTLTYAA *****	180
dgcD	PVNERTLRTLGYDLLSEPVRRAAEQARDSGEPAVTRAVALRLDEGEASPPAFIVFQAVY	240
dgcDsec	PVNERTLRTLGYDLLSEPVRRAAEQARDSGEPAVTRAVALRLDEGEASPPAFIVFQAVY *****	240
dgcD	RDGLSPATQERRRATFAGLVMTPIHVAPLAESVFGRMNDIAATVFEGRREFPLYRSRPEP	300
dgcDsec	RDGLSPATQERRRATFAGLVMTPIHVAPLAESVFGRMNDIAATVFEGRREFPLYRSRPEP *****	300
dgcD	SEQPLLTASRDVTLGSRVWSVQYESRPSFEDAVIDSWKPTLVLATGLSLSVLLSTLLWALA	360
dgcDsec	SEQPLLTASRDVTLGSRVWSVQYESRPSFEDAVIDSWKPTLVLATGLSLSVLLSTLLWALA *****	360
dgcD	ATRDRLVIARRITTSLRRE <b>TELDLLFNQAPLGI</b> ALIGPDAKITDCNPAFAR <b>AVGVGRD</b>	420
dgcDsec	ATRDRLVIARRITTSLRRE <b>TELDLLFNQAPLGI</b> ALIGPDAKITDCNPAFAR <b>AVGVGRD</b> *****	420
dgcD	GLIGIDTKLRAQDPAVIAAIDAAIAGESVRLEVDRLLAGGRHSHFSLHLQPVSTPGDPP	480
dgcDsec	GLIGIDTKLRAQDPAVIAAIDAAIAGESVRLEVDRLLAGGRHSHFSLHLQPVSTPGDPP *****	480
dgcD	FVMAFVEDIGDKRRAR <b>Q</b> HIHYLAHYDPLTGLPNRVLLFDRIAQAARQARRDGGKVAVLFI	540
dgcDsec	FVMAFVEDIGDKRRAR <b>Q</b> HIHYLAHYDPLTGLPNRVLLFDRIAQAARQARRDGGKVAVLFI *****	540
dgcD	DLDFKVVINDSLGHSFGDEVLRVARRLHGGMRPTDTVGRGGDEFLLIVVPAIQKAAEAA	600
dgcDsec	DLDFKVVINDSLGHSFGDEVLRVARRLHGGMRPTDTVGRGGDEFLLIVVPAIQKAAEAA *****	600
dgcD	AVAQKVLQAAPFAIGGRNFVVSPIGSLFPDDAEDAEGEGLIRCADIAMYNADAGRNA	660
dgcDsec	AVAQKVLQAAPFAIGGRNFVVSPIGSLFPDDAEDAEGEGLIRCADIAMYNADAGRNA *****	660
dgcD	YRFVTREMGARSRE <b>RLDLEAALRRALQNRELFLVYQPQLRISDDL</b> VVGVEALLRWRHPEA	720
dgcDsec	YRFVTREMGARSRE <b>RLDLEAALRRALQNRELFLVYQPQLRISDDL</b> VVGVEALLRWRHPEA *****	720
dgcD	GLIMPNRFLPVAEETGLIQPIGDWVLDVCAQIGRWRDQIGLAVPVAVNVSAQQFRDQQL	780
dgcDsec	GLIMPNRFLPVAEETGLIQPIGDWVLDVCAQIGRWRDQIGLAVPVAVNVSAQQFRDQQL *****	780
dgcD	PAKVAAALDRNGLQGWELEIEVTEGTLIDDI <b>PSAIATLRALKQRGCLIALDD</b> FGTYSSL	840
dgcDsec	PAKVAAALDRNGLQGWELEIEVTEGTLIDDI <b>PSAIATLRALKQRGCLIALDD</b> FGTYSSL *****	840
dgcD	NYLHRFPIDKDKIDRSFIHDLEQDGAGDSIPRAIVGLGRSLGLSVVAEGVETE <b>AIQLLR</b>	900
dgcDsec	NYLHRFPIDKDKIDRSFIHDLEQDGAGDSIPRAIVGLGRSLGLSVVAEGVETE <b>AIQLLR</b> *****	900
dgcD	SLKCESFQGYLFSRPVLAEELEPILALRAARGHHASKVEPMARAPV 946	
dgcDsec	SLKCESFQGYLFSRPVLAEELEPILALRAARGHHASKVEPMARAPV 946 *****	

**Figura 26. Alineamiento de la proteína secuenciada con el programa clustal omega.** Se representa con colores cada dominio de la proteína. Dominios **TMD** (letras color anaranjado), dominio **CHASE** (letras color azul), dominio **PAS** (letras color rosa), dominio **GGDEF** (letras color verde), dominio **EAL** (letras en color morado). En letras blancas y fondo rosa, los cambios de aminoácidos encontrados.

## 9.6. Construcción del cósmido pVKP*dgcD*

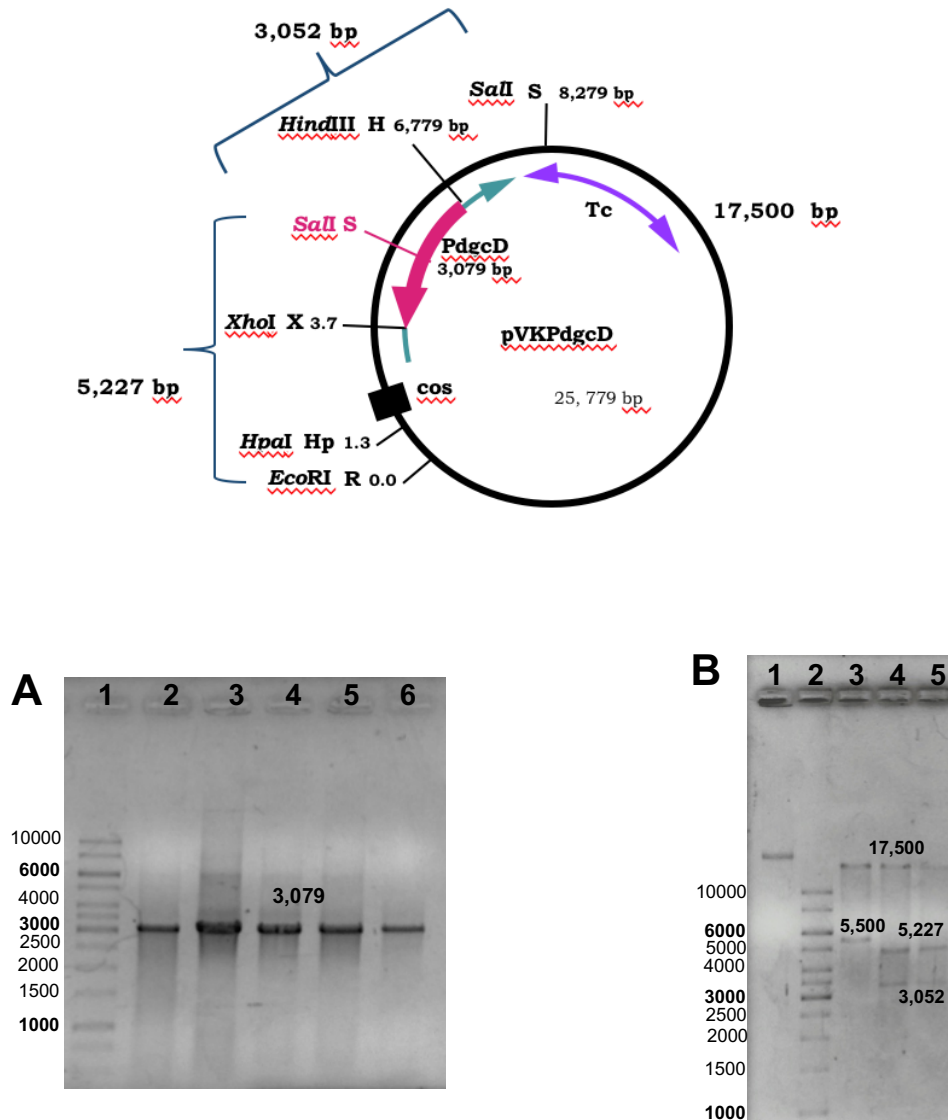
Para complementar la mutante 12-A se hará la construcción del cósmido pVKP*dgcD* usando al vector pVK100 el cual es de amplio rango de hospedero, reportado como estable en *Azospirillum*. Cuenta con sitios de restricción únicos y marcadores de resistencia a kanamicina y tetraciclina que permiten su selección y análisis después de la clonación (Figura 27).



**Figura 27. Mapa del vector pVK100.** Contiene el sitio cos del fago  $\lambda$ . Sitios de restricción únicos: (H) *Hind*III (S) *Sal*I (R) *Eco*RI (Hp) *Hpa*I (X) *Xho*I. Los números indican kbs. Codifica la resistencia Tc y Km (Knauf & Nester, 1982).

Con la construcción pGEMP*dgcD*, se procedió a realizar la subclonación en el cósmido pVKP*dgcD*, para lo cual se digirió a ambos vectores, pGEMP*dgcD* y pVK100 con las enzimas *Xho*I y *Hind*III para posteriormente ligar y al final transformar en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Al ligarse el fragmento *PdgcD* en el vector pVK100 se interrumpió el casete de resistencia a Km por lo que las clonas seleccionadas fueron aquellas resistentes en medio de cultivo con Tc

(15µg/ml) y sensibles en Ap (100µg/ml) y Km (50µg/ml). La construcción fue comprobada mediante PCR (Figura 28A) y cortes con enzimas de restricción obteniendo fragmentos de 17,500 pb, 5,227 pb y 3,052 pb (Figura 28B) a partir de DNA plasmídico.

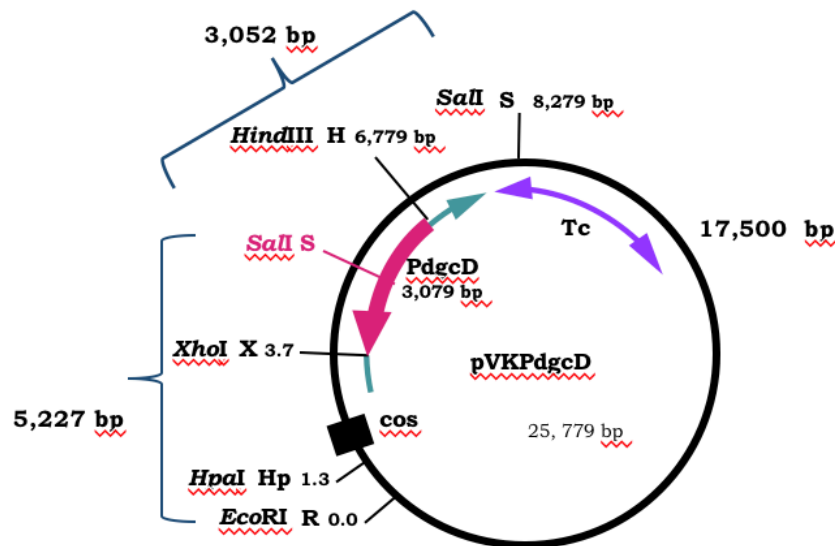


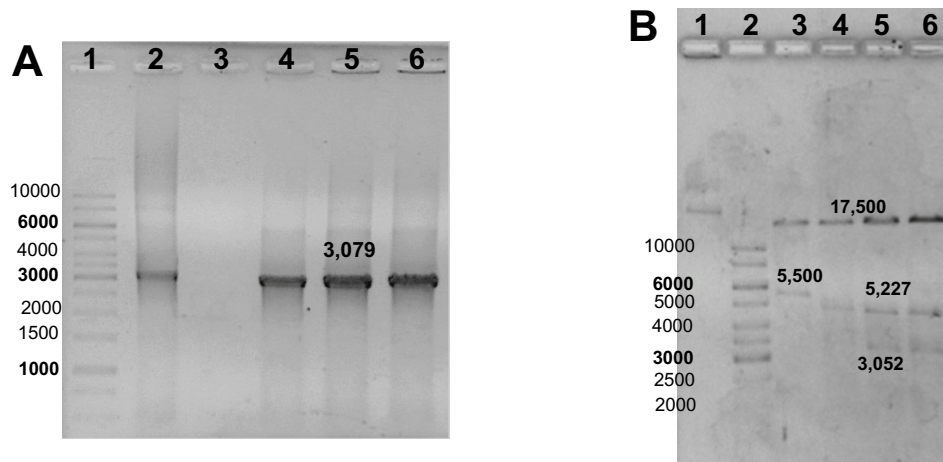
**Figura 28. Verificación de la clonación del gen *dgcD* en el cósmido pVK100.** **A)** Amplificado de 3,079 pb usando los iniciadores F-ORF210 y R-ORF210. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: *A. brasilense* Sp145; carril 3-6: clonas de *E. coli* DH5α (pVKPdgcD). **B)** Patrón de restricción de pVKPdgcD con las enzimas *SaII* y *EcoRI*. Carril 1: pVK100 sin digerir; carril 2: marcador de peso molecular; carril 3: pVK100 vacío con fragmentos de 17,500 pb y 5,500 pb; carril 4 y 5: clonas de *E. coli* DH5α (pVKPdgcD) con fragmentos de 17,500 pb, 5,227 pb y 3,052 pb.

Comprobada la construcción en *E. coli* DH5 $\alpha$ , el siguiente paso fue la transformación de esta construcción pVKP*dgcd* en células competentes de *E. coli* S17.1 comprobándola también con PCR y restricción (Anexo Figura 31) para después llevar a cabo la conjugación con la mutante 12-A.

### 9.7. Complementación de la mutante 12-A

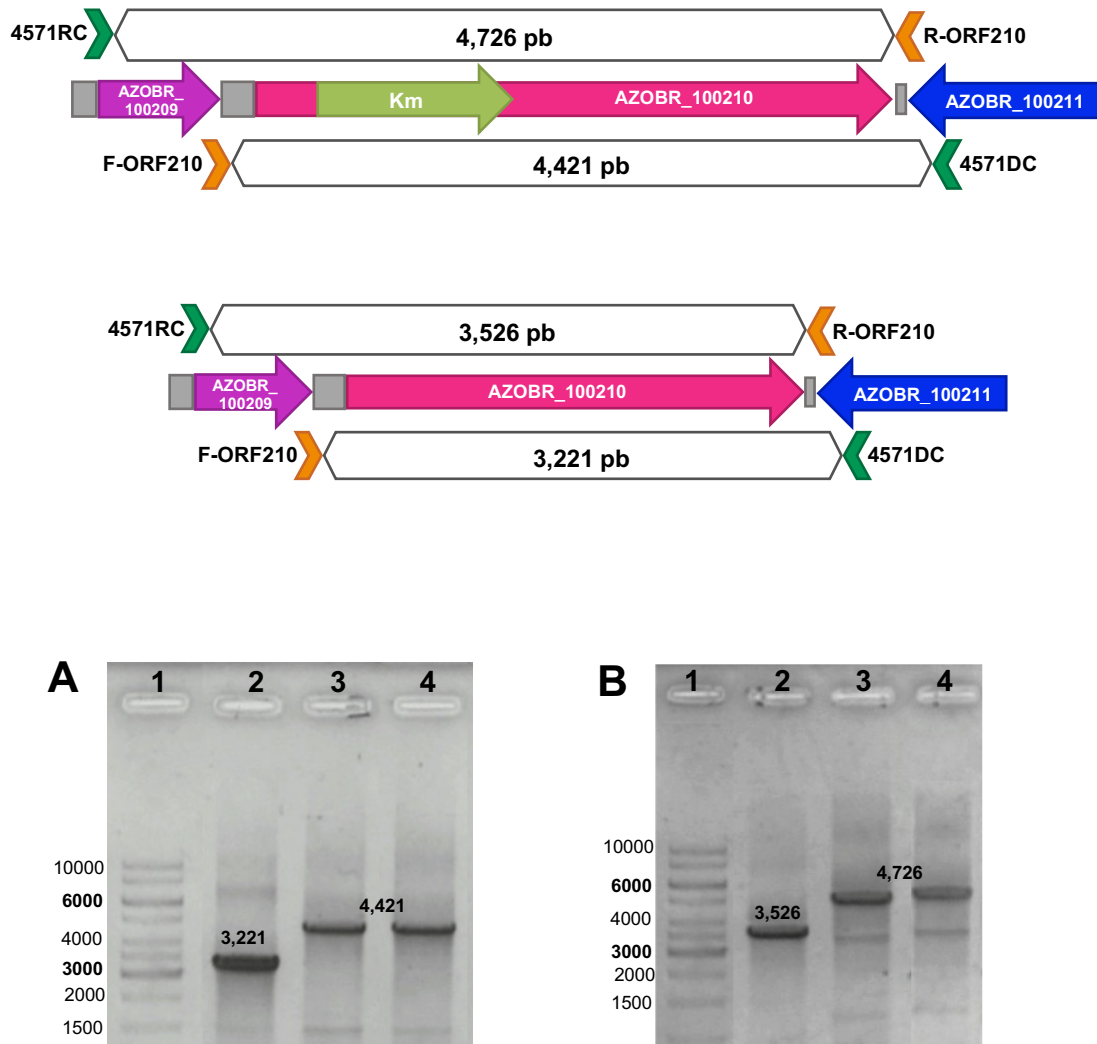
Obtenida la construcción, se hizo conjugación triparental para una complementación *in trans* de la mutante 12-A. Las transconjugantes obtenidas fueron seleccionadas mediante la resistencia a Tc (15 $\mu$ g/ml) y Km (50 $\mu$ g/ml) debido a que en el fondo genético de la mutante se encuentra la inserción del casete de resistencia a Km. Luego de lo anterior, se comprobó la complementación mediante PCR tanto de DNA plasmídico (Figura 29A) como de DNA genómico (Figura 30) y cortes con enzimas de restricción de DNA plasmídico (Figura 29B).





**Figura 29. Comprobación del cósmido pVKPdgcD. A)** Amplificado de 3,079 pb usando los iniciadores F-ORF210 y R-ORF210. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: DNA plasmídico de *E. coli* DH5 $\alpha$  (pVKPdgcD); carril 3: pVK100 vacío; carril 4-6: transconjugantes de la Mutante A-12 (pVKPdgcD). **B)** Patrón de restricción de pVKPdgcD con las enzimas *SalI* y *EcoRI*. Carril 1: pVK100 sin digerir; carril 2: marcador de peso molecular; carril 3: pVK100 vacío con fragmentos de 17,500 pb y 5,500 pb; carril 4 y 5: transconjugantes de la mutante 12-A(pVKPdgcD) con fragmentos de 17,500 pb, 5,227 pb y 3,052 pb.

Se eligió una de las transconjugantes 12-A (pVKPdgcD) denominada como C56-A para comprobar su fondo genético (Figura 30) y con ella, continuar los ensayos fenotípicos.



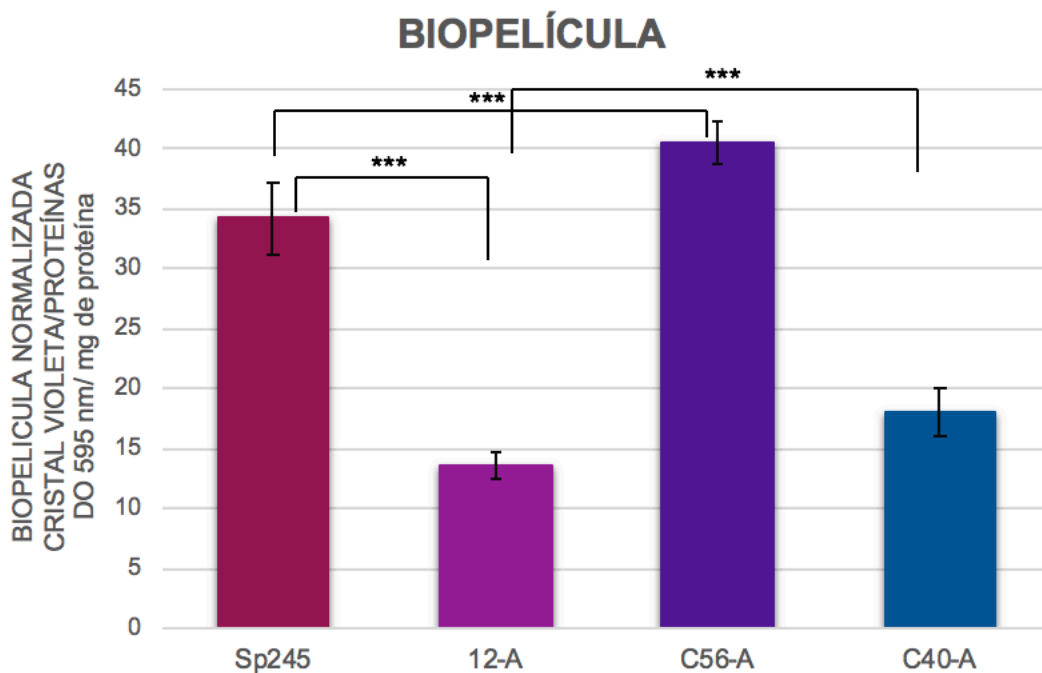
**Figura 30. Comprobación del fondo genético de la complementación. A)** Amplificado de 3,221 pb de la cepa *A. brasilense* Sp245 y 4,421 pb de las cepas mutante 12-A y C56-A, usando los iniciadores F-ORF210 y 4571DC. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: *A. brasilense* Sp245; carril 3: mutante 12-A; carril 4: C56-A. **B)** Amplificado de 3,526 pb de la cepa *A. brasilense* Sp245 y 4,726 pb de la cepas mutante 12-A y C56-A, usando los iniciadores 4571RC y R-ORF210. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: *A. brasilense* Sp245; carril 3: mutante 12-A; carril 4: C56-A (lo marcado con azul ponerlo en el texto pues así como está la redacción no es clara).

Se realizó también la conjugación entre *E. coli* S17.1 (pVK100) y la mutante 12-A para usarlo como control (Anexo Figura 32 y 33).

## 9.8. Ensayos fenotípicos

### 9.8.1. Determinación de la formación de Biopelícula

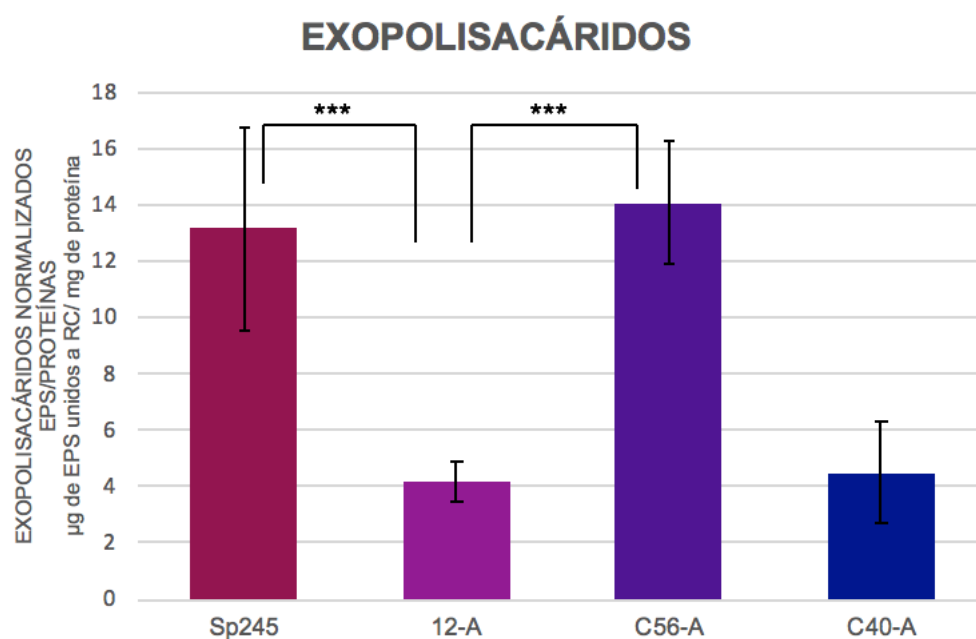
Se realizó primero ensayos de formación de biopelícula por el método de Cristal Violeta con  $\text{KNO}_3$  como fuente de nitrógeno usando las cuatro cepas: *A. brasilense* Sp245, mutante 12-A, C56-A y C40-A (Anexo Figura 34). Se observó una disminución en la cantidad de biopelícula formada en la mutante 12-A y en la cepa C40-A en comparación con la cepa silvestre y la biopelícula de la cepa C56-A ésta es similar y estadísticamente significativa a *A. brasilense* Sp245, (Gráfica 1).



**Gráfica 1. Cuantificación de formación de Biopelícula de las cepas *A. brasilense* Sp245, mutante 12-A, C56-A y C40-A.** Determinación de la producción de biopelícula a las 72h por el método de Cristal Violeta normalizada con la determinación de proteínas totales de las cuatro cepas, *A. brasilense* Sp245, mutante 12-A, C56-A y C40-A. Cada barra representa el promedio de tres ensayos independientes, con tres réplicas por ensayo. Se muestra la desviación estándar y la significancia estadística.

### 9.8.2. Cuantificación de Exopolisacáridos

La matriz extracelular es un componente de la biopelícula y esta matriz, a su vez está formada de EPS; se cuantificaron los EPS, mediante su unión al colorante Rojo Congo en la biopelícula formada por cada una de las cuatro cepas estudiadas (Anexo Figura 35). Se observó una disminución en la cantidad de EPS tanto en la mutante 12-A como en la cepa C40-A, en comparación con la cepa silvestre y una cantidad de EPS en la cepa C56-A que no es estadísticamente significativa a la obtenida en la cepa *A. brasilense* Sp245. Comparando a la mutante 12-A con la cepa C40-A tampoco se observa una diferencia estadísticamente significativa (Gráfica 2).



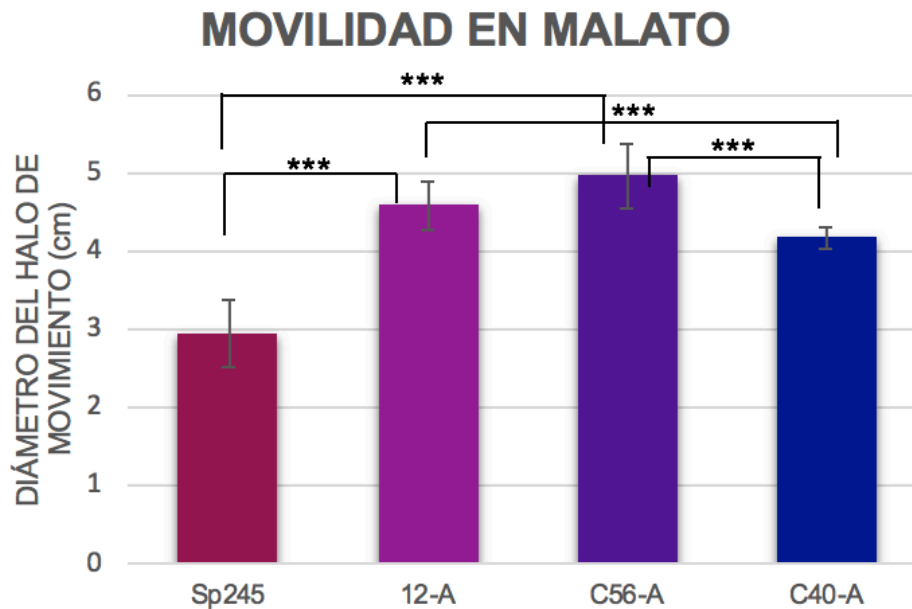
**Gráfica 2. Determinación de la cantidad de EPS en biopelícula de las cepas *A. brasilense* Sp245, mutante 12-A, C56-A y C40-A.** Cuantificación de EPS mediante su unión a RC normalizado con la determinación de proteínas totales de las cuatro cepas, *A. brasilense* Sp245, mutante 12-A, C56-A y C40-A en medio de cultivo NFb con KNO<sub>3</sub>. Cada barra representa el promedio de tres ensayos independientes, con tres réplicas por ensayo. Se muestra la desviación estándar y la significancia estadística.

P= 0.355 entre las cepas *A. brasilense* Sp245 y C56-A.

P= 0.520 entre las cepas 12-A y C40-A.

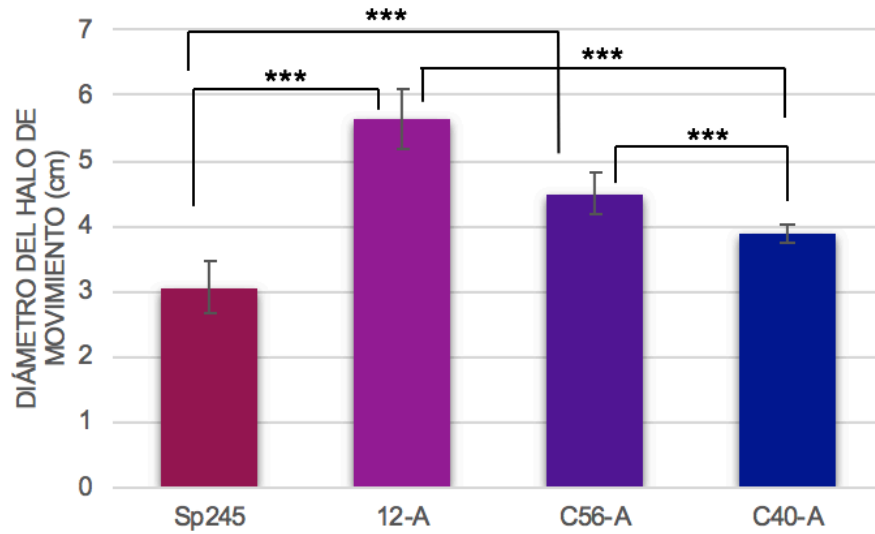
### 9.8.3. Determinación de la Movilidad

El ensayo de movilidad fue llevado a cabo con las cepas bajo estudio en medio mínimo con tres diferentes quimioattractantes (Malato, Fumarato y Prolina) midiendo los respectivos halos de crecimiento a las 48h (Anexo Figuras 36, 37 y 38). Se observó un aumento de la movilidad estadísticamente significativo de las cepas mutante 12-A, C56-A y C40-A en comparación con la cepa silvestre en los tres quimioattractantes probados a las 48h, siendo más marcado este aumento en presencia de Prolina. Se observó una diferencia en malato y prolina con la cepa C56-A pues presentó mayor movilidad, incluso que la cepa mutante 12-A, no así, en presencia de fumarato. Por otra parte, la cepa C40-A tuvo una movilidad menor estadísticamente significativa que la cepa mutante 12-A en malato y fumarato y un aumento en prolina y a su vez, esta misma cepa C40-A también tuvo una menor movilidad estadísticamente significativa en comparación con la cepa C56-A en los tres quimioattractantes (Gráficas 3, 4 y 5).



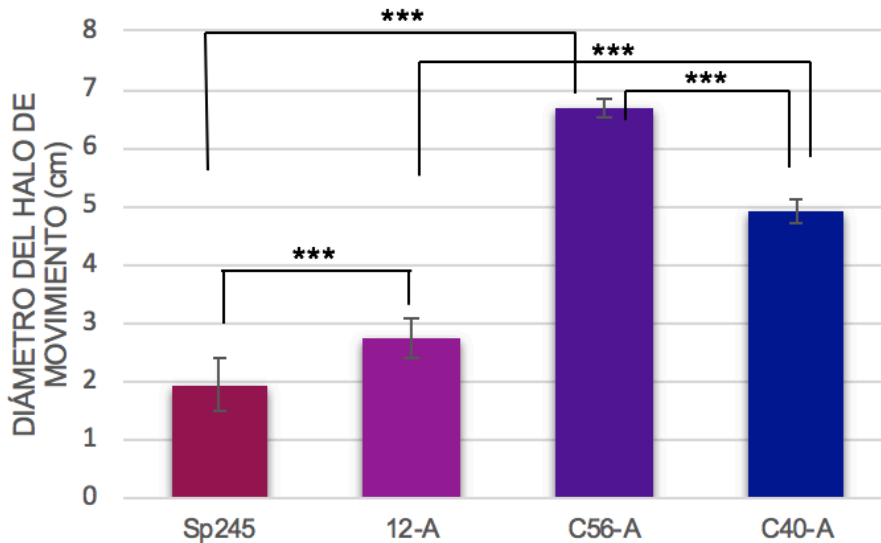
**Gráfica 3. Diámetro del halo de movilidad a las 48h de las cepas *A. brasilense* Sp245, mutante 12-A, C56-A y C40-A, en medio mínimo con malato.** Cada barra representa el promedio de cuatro ensayos independientes, con dos réplicas por ensayo. Se muestra la desviación estándar y la significancia estadística.

## MOVILIDAD EN FUMARATO



Gráfica 4. Diámetro del halo de movilidad a las 48h de las cepas *A. brasilense* Sp245, mutante 12-A, C56-A y C40-A, en medio mínimo con fumarato. Cada barra representa el promedio de cuatro ensayos independientes, con dos réplicas por ensayo. Se muestra la desviación estándar y la significancia estadística.

## MOVILIDAD EN PROLINA



Gráfica 5. Diámetro del halo de movilidad a las 48h de las cepas *A. brasilense* Sp245, mutante 12-A, C56-A y C40-A, en medio mínimo con prolina. Cada barra representa el promedio de cuatro ensayos independientes, con dos réplicas por ensayo. Se muestra la desviación estándar y la significancia estadística.

## 10. DISCUSIÓN

Las rizobacterias, definidas como bacterias del suelo que colonizan la rizósfera de las plantas favoreciendo su crecimiento, poseen sistemas de transducción de señales que les permiten sobrevivir y prosperar bajo las diferentes condiciones ambientales presentes en la rizósfera. En estos sistemas de transducción de señales, la bacteria reconoce señales o estímulos externos por medio de proteínas de señalización que incluyen en su arquitectura receptores integrados a la membrana. Los dominios que detectan las fluctuaciones del entorno de los receptores se localizan en el espacio periplásmico y la unión de moléculas de señal da como resultado un cambio conformacional de los dominios efectores localizados en el citoplasma; lo que desencadena cascadas de señalización interna responsables de procesos importantes para la actividad bacteriana como la regulación y control de la expresión génica, la quimiotaxis y movilidad (Shpakov & Pertseva, 2008).

En el genoma de *A. brasilense* Sp245 se localizaron 10 genes que presuntivamente codifican para proteínas que poseen ambos dominios GGDEF y EAL (Ramírez-Mata *et al.*, 2018), las cuales son de interés por su implicación en el metabolismo del di-GMPc y el papel de este segundo mensajero en la adaptación de la bacteria a su entorno, en otras rizobacterias estudiadas. Para iniciar el estudio del gen *dgcD* Gamboa-Pérez (2014), generó la mutante del gen por inserción de un casete de resistencia a la kanamicina.

Previo a construir un plásmido de amplio rango de hospedero que portara el gen *dgcD* para complementar la mutante se realizó un análisis bioinformático del producto de traducción del gen bajo estudio. En la figura 14 se muestran los dominios que la conforman. De especial interés es el dominio CHASE (cyclases/histidine kinases associated sensing extracellular), el cual por lo general se encuentra en el extremo N-terminal, localizado en regiones extracelulares o periplásmicas flanqueado por dos regiones transmembrana (Figura 15), seguido del

dominio PAS y los dominios GGDEF y dominios de fosfodiesterasa EAL (Pas *et al.*, 2004). El análisis de la arquitectura de dominio CHASE de las proteínas que contienen este reveló que forman parte en dos tipos de receptores: histidina cinasas y adenilil ciclasas en eucariotas o diguanilato ciclasas en procariontes (Steklov *et al.*, 2013; Mougél y Zhulin, 2001). Se predice que este dominio se une a ligandos de bajo peso molecular como péptidos o citocininas. Hasta el momento no se conocen reportes en bacterias que describan cual es el ligando que detectan. Una histidina cinasa putativa (AHK4) que posee el dominio CHASE identificada en *Arabidopsis thaliana*, se encontró juega un papel importante como sensor para la morfogénesis vascular en la planta (Mahonen *et al.*, 2000) y cuyo ligando presuntivo es el ion malonato o isopentiladenina.

Los dominios PAS (Per-ARNT-Sim) son dominios proteicos implicados en la transducción de señales. Las estructuras tridimensionales de los diferentes dominios PAS parecen estar conservadas, aunque las secuencias de aminoácidos muestren poca similitud. Estos dominios monitorean cambios en la intensidad de luz, el potencial redox, el oxígeno y median interacciones proteína-proteína o se unen a ligandos pequeños (Vreede *et al.*, 2003), por lo que se presume que este dominio podría sentir alguno de estos estímulos y transmitir la señal a los dominios GGDEF y EAL, los cuales se encuentran río abajo dentro de la proteína.

En cuanto a los dominios GGDEF y EAL, se realizó el alineamiento de la proteína en estudio y de otras proteínas con estos mismos dominios, presente en diferentes especies de *Azospirillum* comparándolas con proteínas ya cristalizadas y verificados sus dominios como funcionales como PleD de *C. crescentus* y RocR de *P. aeruginosa* (Figura 17 y 18). Se observó que todos los sitios importantes para la actividad enzimática de cada dominio están conservados, presumiendo que el gen en estudio, codifica para una proteína con ambas actividades diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa.

Previo a este trabajo se generó una mutante del gen *dgcD* de *A. brasilense* Sp245, por Gamboa-Pérez, (2014), insertando un casete de resistencia a kanamicina el cual interrumpe el marco de lectura impidiendo la traducción de la proteína y a la cual se le denominó mutante 12-A. Posteriormente se analizaron algunos fenotipos como formación de biopelícula y movilidad tanto de la cepa mutante 12-A como de la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245 (Ramírez-Mendoza, 2016) en donde la mutante presentó una disminución en la producción de biopelícula del 75% en medio adicionado con  $\text{KNO}_3$  como fuente de nitrógeno, en comparación con la cepa silvestre, resultado sugerente de que la actividad DGC se encuentra afectada. Asimismo, estos datos tuvieron correlación con los resultados de los ensayos de movilidad, obteniendo una mayor movilidad en la cepa mutante 12-A comparando con la cepa silvestre, en presencia de diferentes quimioattractantes (Ramírez-Mendoza, 2016). Para corroborar que estos cambios fueron debidos a la mutación del gen *dgcD*, en este trabajo se llevó a cabo una complementación en *trans*, y posteriormente se analizaron los fenotipos de formación de biopelícula, cuantificación de exopolisacáridos y determinación de movilidad.

Para llevar a cabo la complementación se tomó en cuenta al gen *dgcD* junto a su presunto promotor, hallado mediante análisis bioinformáticos (Figura 19 y 20). El amplificado del gen *dgcD* fue secuenciado y al hacer el análisis de la secuencia de nucleótidos obtenida, identificamos dos cambios que dan lugar a un aminoácido diferente en los dominios PAS y GGDEF de la secuencia proteica (Figura 26), sin embargo, estos cambios no se encuentran en ninguno de los sitios descritos como esenciales para la actividad enzimática (Figura 17 y 18).

Los resultados de la biopelícula formada por la cepa silvestre indican que fue restaurada por la cepa complementada (Gráfica 1). Este resultado además nos indicó que el promotor es funcional.

Del mismo modo que los resultados de biopelícula, los exopolisacáridos, principales componentes de la matriz que permite a las bacterias agruparse en una biopelícula,

fueron detectados por su unión al colorante RC (De Troch & Vanderleyden, 1996) y aunque en *Azospirillum* se han descrito tres diferentes tipos de EPS de los cuales solo uno de ellos se une a RC, los resultados tuvieron correlación con los de las biopelículas formadas por las diferentes cepas *A. brasilense* Sp245, mutante 12-A, C56-A y C40-A, teniendo menor cantidad de EPS en la cepa mutante 12-A y en la cepa control C40-A y mayor en las cepas silvestre y C56-A (Gráfica 2), datos que coinciden con lo obtenido por Ramírez-Mendoza en los experimentos realizados con las cepas silvestre y 12-A, confirmando la actividad DGC del gen *dgcD* bajo las condiciones probadas.

En general, niveles elevados de di-GMPc intracelular resultan de una mayor actividad DGC que da lugar a una mayor formación de biopelícula inhibiendo la movilidad. De forma contraria, niveles bajos de di-GMPc son resultado de la actividad PDE la cual promueve la movilidad de la bacteria (Krasteva *et al.*, 2012; Römling *et al.* 2013).

En el fenotipo de movilidad, se obtuvieron resultados aparentemente contradictorios a lo canónico en la cepa C56-A con los distintos quimioattractantes (Anexo Figura 36, 37 y 38) observando la falta de complementación en la movilidad, ya que la cepa C56-A presentó mayor movilidad que la mutante 12-A y la silvestre con malato y prolina (Gráfica 3, 4, y 5). Lo anterior podría explicarse por la redundancia de genes con la que cuenta *Azospirillum* Sp245, ya que quizás otras PDEs de dominio único podrían estar compensando la función en la mutante 12-A y el número mayor de copias del gen *dgcD* en la cepa C56-A bajo las condiciones probadas aumenta la función de PDE. Por otra parte, la cepa control C40-A mostró un aumento en movilidad (Gráfica 5), lo que sugiere que el cósmido usado para la complementación podría tener un efecto en la movilidad bajo las condiciones probadas, lo cual podría ser comprobado también con la movilidad de la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245 con el vector pVK100.

Algunas proteínas DGC con ambos dominios GGDEF / EAL han sido estudiadas. Una de ellas es la de *Agrobacterium tumefaciens* DcpA, la cual posee actividades de síntesis y degradación de di-GMPc. La actividad de la proteína es modulada por un metabolito pteridina reductasa denominada PruA, en donde DcpA actúa como PDE en presencia de PruA y como DGC en su ausencia (Feirer *et al.*, 2015). Por otro lado, *Rhodobacter sphaeroides* posee bacteriofitocromos (Bphs) los cuales se ha reportado regulan la biosíntesis de pigmentos fotosintéticos y no fotosintéticos y la movilidad. Este bacteriofitocromo se compone de módulos sensores PAS-GAF-PHY típicamente presentes en fitocromos, y vinculados a dominios GGDEF y EAL. Se encontró que al expresar el bacteriofitocromo en *E. coli*, este experimentó una escisión parcial en dos especies, la especie más pequeña tuvo actividad PDE y la más grande, actividad DGC activada por luz, siendo por lo tanto el primer bacteriofitocromo capaz de sintetizar e hidrolizar di-GMPc (Tarutina *et al.*, 2006). Sin embargo, aún falta mucho por dilucidar a este respecto, y en el caso de la proteína DgcD que cuenta con ambos dominios de síntesis y degradación de di-GMPc conservados, estudios posteriores deberán demostrar su bifuncionalidad y el ligando que es capaz de sensor.

## 11. CONCLUSIÓN

La restauración de la formación de biopelícula por la cepa complementada demuestra la actividad diguanilato ciclasa del gen en estudio.

## 12. PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar una complementación en cis para evitar un incremento en el número de copias del gen *dgcD*.
- ✓ Llevar a cabo el fenotipo biopelícula empleando otras fuentes de nitrógeno, así como biopelícula con más fuentes de carbono.
- ✓ Analizar la capacidad de colonización al trigo de las diferentes cepas.
- ✓ Realizar mutaciones puntuales en los dominios GGDEF y/o EAL para evaluar la actividad de cada uno.
- ✓ Realizar una mutación del dominio CHASE y realizar fenotipos.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

- Alen'kina SA, Bogatyrev VA, Matora LY, Sokolova MK, Chernyshova MP, Trutneva KA, Nikitina VE.** 2014a. Signal effects of the lectin from the associative nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 in bacterial-plant root interactions. *Plant Soil* 381:337-349.
- Alen'kina SA, Petrova LP, Sokolova MK, Chernyshova MP, Trutneva KA, Bogatyrev VA, Nikitina VE.** 2014b. Comparative assessment of inductive effects of *Azospirillum* lectins with different antigenic properties on the signal systems of wheat seedling roots. *Microbiology* 83:262-269.
- Alexandre G, Greer SE, Zhulin IB.** 2000. Energy taxis Is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol* 182:6042-6048.
- Alexandre, G.** 2015. Chemotaxis control of transient cell aggregation. *J Bacteriol* 197:3230-3237.
- Arruebarrena Di Palma A, Pereyra CM, Moreno Ramírez L, Xiqui Vázquez ML, Baca BE, Pereyra MA, Lamattina L, Creus CM.** 2013. Denitrification-derived nitric oxide modulates biofilm formation in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett* 338:77-85.
- Bahat-Samet E, Castro-Sowinski S, Okon Y.** 2004. Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett* 237:195-203.
- Baldani VLD, Alvarez DBMA, Baldani JI & Döbereiner J.**1986. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant Soil* 90:35-46.
- Bashan Y, de-Bashan LE.** 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *Advances in Agronomy* 108:77-136.
- Bashan Y, Levanony H.** 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can J Microbiol* 36:591-608.
- Bashan Y, Holguin G, de-Bashan LE.** 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can J Microbiol.* 50:521-577.
- Bashan Y, Ream Y, Levanony H, Sade A.** 1989. Nonspecific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. *Can J Bot* 67:1317-1324.
- Bashan Y.** 1986. Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants. *Soil Biol Biochem* 18:297-301.
- Bible A, Russell MH, Alexandre G.** 2012. The *Azospirillum brasilense* Che1 chemotaxis pathway controls swimming velocity, which affects transient cell-to-cell clumping. *J Bacteriol* 194:3343-3355.
- Bible AN, Khalsa-Moyers GK, Mukherjee T, Green CS, Mishra P, Purcell A, Aksenova A, Hurst GB, Alexandre G.** 2015. Metabolic adaptations of *Azospirillum brasilense* to oxygen stress by cell-cell clumping and flocculation. *Appl Environ Microbiol* 81:8346-8357.
- Bible AN, Stephens BB, Ortega DR, Xie Z, Alexandre G.** 2008. Function of a chemotaxis-like signal transduction pathway in modulating motility, cell clumping, and cell length in the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol* 190:6365-6375.
- Bogino, PC, Oliva MdeL, Sorroche FG, Giordano W.** 2013. The role of bacterial biofilms and surface components in plant–bacterial associations. *Int J Mol Sci* 14:15838-15859.
- Burdman S, Okon Y, Jurkevitch E.** 2000. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Crit Rev Microbiol* 26:91-110.
- Caballero-Mellado J, M Carcano, Montiel MG, Mascarua-Esparza MA.** 1992. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. *Symbiosis* 13:243-253.

- Carreño-López R, Sánchez A, Camargo N, Elmerich C, Baca BE.** 2009. Characterization of *chsA*, a new gene controlling the chemotactic response in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Arch Microbiol* 191:501-507.
- Cassán F, Vanderleyden J, Spaepen S.** 2013. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *J Plant Growth Regul* 33:440-459.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA.** 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol.* 71:4951-4959.
- D'Argenio DA, Miller SI.** 2004. Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology* 150:2497-2502.
- Dahlstrom KM, O'toole GA.** 2017. A Symphony of Cyclases: Specificity in diguanylate cyclase signaling. *Annu Rev Microbiol* 71:179-195.
- Danhorn T, Fuqua C.** 2007. Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Microbiol* 61:401-22.
- De Souza R, Ambrosini A, Passaglia LM.** 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet Mol Biol* 38:401-419.
- De Troch P, Vanderleyden J.** 1996. Surface properties and motility of *Rhizobium* and *Azospirillum* in relation to plant root attachment. *Microb Ecol* 32:149-169.
- Donlan RM.** 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8:881-90.
- Fazli M, Almlad H, Rytke ML, Givskov M, Eberl L, Tolker-Nielsen T.** 2014. Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. *Environ Microbiol* 16:1961-1981.
- Feirer N, Xu J, Allen KD, Koestler BJ, Bruger EL, Waters CM, White RH, Fuqua C.** 2015. A pterin-dependent signaling pathway regulates a dual-function diguanylate cyclase-phosphodiesterase controlling surface attachment in *Agrobacterium tumefaciens*. *MBio* 6:1-12.
- Fibach-Paldi S, Burdman S, Okon Y.** 2012. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett* 326:99-108.
- Figurski DH, Helinski DR.** 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:1648-1652.
- Filip'echeva Y, Shelud'ko A, Prilipov A, Telesheva E, Mokeev D, Burov A, Petrova L, Katsy E.** 2017. Chromosomal *flhB1* gene of the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 is essential for correct assembly of both constitutive polar flagellum and inducible lateral flagella. *Folia Microbiol (Praha)* 63:147-153.
- Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S.** 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 14:563-575.
- Flemming HC, Wingender J.** 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol* 8:623-633.
- Garrett TR, Bhakoo, M, Zhang Z.** 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog Nat Sci* 18:1049-1056.
- Greer-Phillips SE, Stephens BB, Alexandre G.** 2004. An energy taxis transducer promotes root colonization by *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol* 186:6595-6604.
- Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580.
- Hay ID, Remminghorst U, Rehm BHA.** 2009. MucR, a novel membrane-associated regulator of alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 1110-1120.
- Hengge R.** 2009. Principles of c-di-GMP signaling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 7:263-273.
- Heyl A, Wulfetange K, Pils B, Nielsen N, Romanov GA, Schmölling T.** 2007. Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain. *BMC Evol Biol* 7:1-8.

- Hrynkiewicz K, Baum C.** 2012. The potential of rhizosphere microorganisms to promote the plant growth in disturbed soils. In: Malik A, Grohmann E (eds) Environmental protection strategies for sustainable development, Strategies for sustainability. Springer, Netherlands, 35-64.
- Huang XF, Chaparro JM, Reardon KF, Zhang R, Shen Q, Vivanco JM.** 2014. Rhizosphere interactions: Root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany-Botanique*. 92:267-275.
- Jamal M, Ahmad QW, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, Hussian T, Ali M, Rafiq M, Kamil MA.** 2018. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc* 2018 81:7-11.
- Jenal U, Reinders A, Lori C.** 2017. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat Rev Microbiol* 15:271-284.
- Kalia D, Merey G, Nakayama S, Zheng Y, Zhou J, Luo Y, Guo M, Roembke BT, Sintim HO.** 2013. Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chem Soc Rev* 42:305-341.
- Karatan E. & Watnik P.** 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* 73:310-347.
- Kloepper JW, Schroth MN.** 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: Proceedings of the IVth International conference on plant pathogenic bacteria station de pathologie végétale et Phytobactériologie. Angers 2:879-882.
- Knauf VC & Nester EW.** 1982. Wide host range cloning vectors: a cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid. *Plasmid* 8:45-54
- Konnova ON, Boiko AS, Burygin GL, Fedonenko YuP, Matora LYu, Konnova SA, Ignatov VV.** 2008. Chemical and serological studies of lipopolysaccharides of bacteria of the genus *Azospirillum*, *Microbiology (Moscow)* 77:305-312.
- Krasteva PV, Giglio KM, Sonderrmann H.** 2012. Sensing the messenger: the diverse ways that bacteria signal through c-di-GMP. *Protein Sci* 21:929-948.
- López D, Vlamakis H, Kolter R.** 2010. Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2:1-11.
- Mahonen AP, Bonke M, Kauppinen L, Riikonen M, Benfey PN, Helariutta Y.** 2000. A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Dev* 14:2938-2943.
- Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers JM.** 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* 37:634-63.
- Michiels K, Croes CL, Vanderleyden J.** 1991. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *J Gen Microbiol* 137:2241-2246.
- Mills E, Pultz IS, Kulasekara HD, Miller SI.** 2011. The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling. *Cell Microbiol* 13:1122-1129.
- Moens S, Michiels K, Vanderleyden J.** 1995. Glycosylation of the flagellin of the polar flagellum of *Azospirillum brasilense*, a Gram-negative nitrogen-fixing bacterium. *J Microbiol*. 141:2651-2657.
- Mora P, Rosconi F, Fraguas LF, Castro-Sowinski S.** 2008. *Azospirillum brasilense* Sp7 produces an outer-membrane lectin that specifically binds to surface-exposed extracellular polysaccharide produced by the bacterium. *Arch Microbiol* 189:519-524.
- Mougel, C, & Zhulin IB.** 2001. CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends Biochem Sci* 26:582-584.
- Mukherjee T, Kumar D, Burriss N, Xie Z, Alexandre G.** 2016. *Azospirillum brasilense* chemotaxis depends on two signaling pathways regulating distinct motility parameters. *J Bacteriol* 198:1764-1772.
- Okon Y.** 1985. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. *Trends Biotech* 3:223-228.
- Okon, Y, Labandera-González CA.** 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol Biochem* 26:1591-1601.

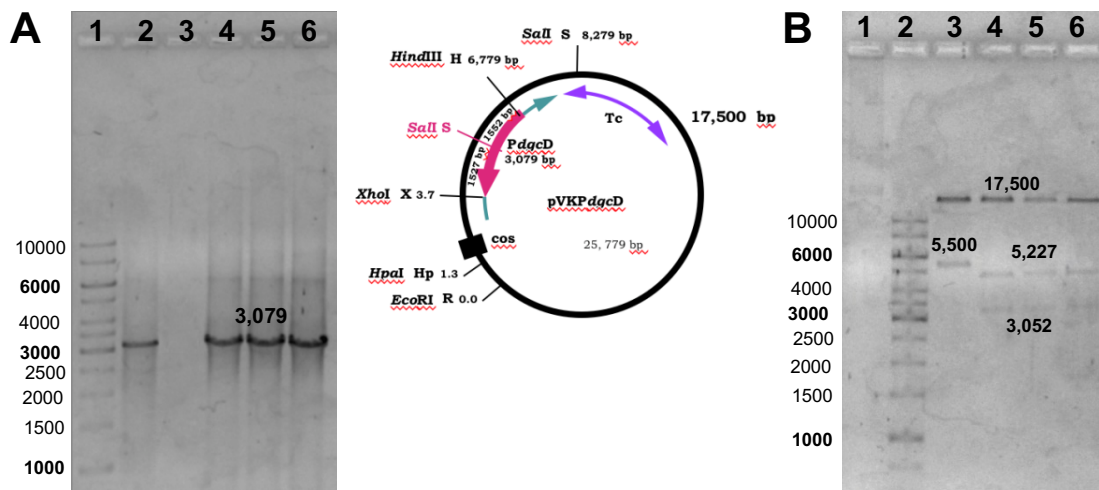
- Pas J, von Grotthuss M, Wyrwicz LS, Rylowski L, Barcisewski J.** 2004. Structure prediction, evolution and ligand interaction of CHASE domain. *FEBS Lett* 576:287-290.
- Pérez-Montaño F, Alías-Villegas C, Bellogín RA, del Cerro P, Espuny MR, Jiménez-Guerrero I, López-Baena FJ, Ollero FJ, Cubo T.** 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiol Res* 169:325-336.
- Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, Van der Putten WH.** 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Microbiol* 11:789-799.
- Ramey BE, Koutsoudis M, von Bodman SB, Fuqua C.** 2004. Biofilm formation in plant-microbe associations. *Curr Opin Microbiol* 7:602-609.
- Ramírez-Mata A, Fernández-Domínguez IJ, Nuñez-Reza KJ, Xiqui-Vázquez ML, Baca BE.** 2014. Redes de señalización en la producción de biopelículas en bacterias: quorum sensing, di-GMPc y óxido nítrico. *Asociación Argentina de Microbiología.* 46:242-255
- Ramírez-Mata A, Millán-Pacheco C, Cruz-Pérez JF, Minjárez-Sáenz M, Baca BE.** 2018. In silico comparative analysis of GGDEF and EAL domain signaling proteins from the *Azospirillum* genomes. *BMC Microbiology* 18:1-14.
- Reis VM, Baldani VLD, Baldani JI.** 2015. Isolation, identification and biochemical characterization of *Azospirillum* spp. and other nitrogen-fixing bacteria. In *Handbook for Azospirillum*. Switzerland: Springer International Publishing 3-26.
- Reis VM, dos Santos Teixeira KR, Pedraza RO.** 2011. What is expected from the genus *Azospirillum* as a plant growth-promoting bacteria? *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses* (Maheshwari DK, ed), 123-138, Springer-Verlag, Berlin.
- Rodrigues, AC, Bonifacio A, De Araujo FF, Andrade Lira Jr M, Figueiredo, MDVB.** 2015. *Azospirillum* sp. as a challenge for agriculture. In *bacterial metabolites in sustainable agroecosystem*. 29-51.
- Rodríguez-Cáceres EA.** 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl Environ Microbiol* 44:990-991.
- Römling U & Simm R.** 2009. Prevailing concepts of c-di-GMP signaling. *Contrib Microbiol* 16:161-181.
- Römling U, Galperin MY, Gomelsky M.** 2013. Cyclic di-GMP: the First 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* 77:1-52.
- Russell MH, Bible AN, Fang X, Gooding JR, Campagna SR, Gomelsky M, Alexandre G.** 2013. Integration of the second messenger c-di-GMP into the chemotactic signaling pathway. *mBio* 4, e00001-00013.
- Saharan BS, Nehra V.** 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research* 21:1-30
- Sambrook J, Russell DW,** 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schirmer T, Jenal U.** 2009. Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nat Rev Microbiol* 7:724-735.
- Shelud'ko AV, Burygin GL, Filip'echeva YA, Belyakov AE, Shirokov AA, Burov AM, Katsy EI, Shchegolev SY, Matora LY.** 2014. Serological relationships of *Azospirilla* revealed by their motility patterns in the presence of antibodies to lipopolysaccharides. *Microbiology* 83:102-109.
- Shpakov AO & Pertseva MN.** 2008. Signal transduction systems in prokaryotes. *J Evol Biochem Fisiol* 44:113-130.
- Sigida EN, Fedonenko YP, Zdorovenko EL, Burygin GL, Konnova SA, Ignatov VV.** 2014. Characterization of the lipopolysaccharides of serogroup II *Azospirillum* strains. *Microbiology* 83:326-334.

- Simon R, Prifer U, Puhler A.** 1983. A broad range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology* 1:784-791
- Siuti P, Green C, Edwards AN, Doktycz MJ, Alexandre G.** 2011. The chemotaxis-like Che1 pathway has an indirect role in adhesive cell properties of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett* 323:105-112.
- Spaepen S, Dobbelaere S, Croonenborghs A, Vanderleyden J.** 2008. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant Soil* 312:15-23.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Okon Y.** 2009. Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *Advances in Botanical Research* 51:283-320.
- Steenhoudt O, Vanderleyden J.** 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev* 24:487-506.
- Steklov MY, Lomin SN, Osolodkin DI, Romanov GA.** 2013. Structural basis for cytokinin receptor signaling: an evolutionary approach. *Plant Cell Rep* 32:781-793
- Stephens, Bonnie Baggett.** 2006. Chemosensory Responses in *Azospirillum brasilense*. Dissertation, Georgia State University 1:214.
- Tarrand JJ, Krieg NR, Döbereiner J.** 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. Nov *Can J Microbiol* 24:967-980.
- Tarutina M, Ryjenkov DA, Gomelsky M.** 2006. An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *J Biol Chem* 281:34751-34758.
- Vandenhove H, Merckx R, Van Steenberghe M, Vlassak K.** 1993. Microcalorimetric characterization, physiological stages and survival ability of *Azospirillum brasilense*. *Soil Biol Biochem* 25:513-519.
- Verbon EH, Liberman LM.** 2016. Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. *Trends in Plant Science* 21:218-229.
- Vreede J, Van Der Horst MA, Hellingwerf KJ, Crielaard W, van Aalten DM.** 2003. PAS domains. Common structure and common flexibility. *J Biol Chem* 278:18434-18439
- Wisniewski-Dyé F, Borziak K, Khalsa-Moyers G, Alexandre G, Sukharnikov LO, Wuichet K, Hurst GB, McDonald WH, Robertson JS, Barbe V, Calteau A, Rouy Z, Mangenot S, Prigent-Combaret C, Normand P, Boyer M, Siguier P, Dessaux Y, Elmerich C, Condemine G, Krishnen G, Kennedy I, Paterson AH, González V, Mavingui P, Zhulin IB.** 2011. *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. *PLoS Genet* 7:e1002430.
- Wisniewski-Dyé F, Lozano L, Acosta-Cruz E, Borland S, Drogue B, Prigent-Combaret C, Rouy Z, Barbe V, Mendoza-Herrera A, González V, Mavingui P.** 2012. Genome sequence of *Azospirillum brasilense* CBG497 and comparative analyses of *Azospirillum* core and accessory genomes provide insight into niche adaptation. *Genes* 3:576-602.
- Wolska KI, Grudniak AM, Rudnicka Z, Markowska K.** 2015. Genetic control of bacterial biofilms. *J Appl Genet* 57:225-238.

## 14. ANEXO

### 14.1. Comprobación de la construcción pVKP*dgcd* en *E. coli* S17.1

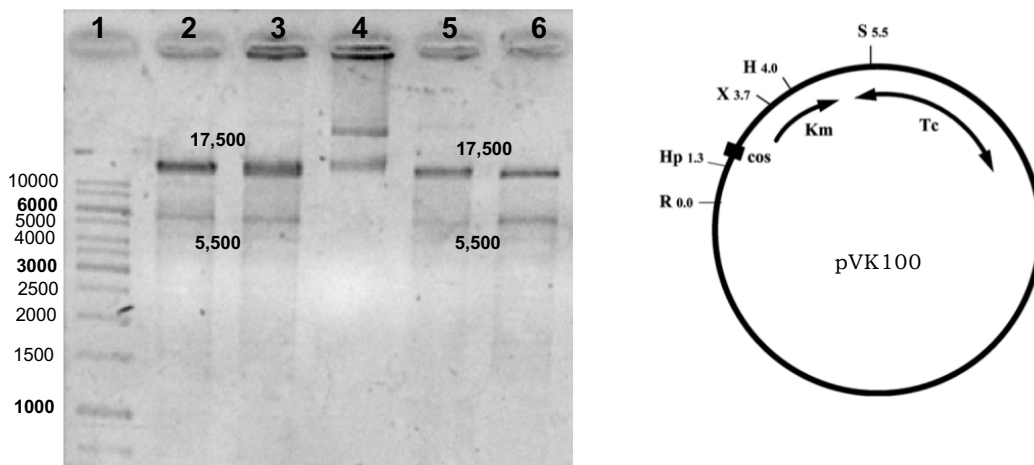
Se realizó la transformación de la construcción pVKP*dgcd* en *E. coli* S17.1 para, posteriormente llevar a cabo la conjugación con la mutante 12-A. Dicha transformación fue comprobada mediante PCR y cortes con las enzimas de restricción *Sall* y *EcoRI*, obteniendo tres fragmentos de 17,500 pb, 5,227 pb y 3,052 pb.



**Figura 31. Comprobación de la transformación de la construcción pVKP*dgcd* en células competentes de *E. coli* S17.1. A)** Amplificado de 3,079 pb usando los iniciadores F-ORF210 y R-ORF210. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: *A. brasilense* Sp145; carril 3: pVK100 vacío; carril 4-6: clonas de *E. coli* S17.1 (pVKP*dgcd*). **B)** Patrón de restricción de pVKP*dgcd* con las enzimas *Sall* y *EcoRI*. Carril 1: pVK100 sin digerir; carril 2: marcador de peso molecular; carril 3: pVK100 vacío con fragmentos de 17,500 pb y 5,500 pb; carril 4 y 5: clonas de *E. coli* S17.1 (pVKP*dgcd*) con fragmentos de 17,500 pb, 5,227 pb y 3,052 pb.

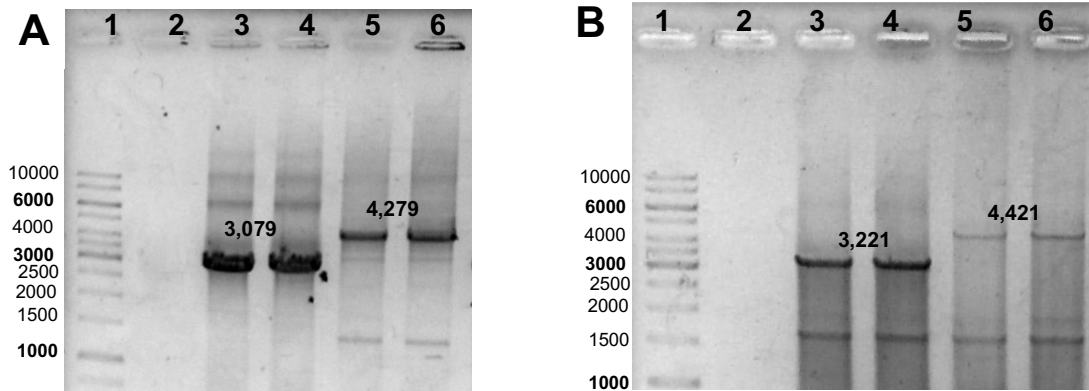
## 14.2. Comprobación del vector pVK100 en las cepas *A. brasilense* Sp245 y Mutante 12-A

A partir de DNA plasmídico de clonas tanto de *A. brasilense* Sp245 (pVK100) como de la mutante 12-A (pVK100) se hizo la comprobación del vector vacío PVK100, digiriéndolo con las enzimas *Sall* y *EcoRI* (Figura 32).



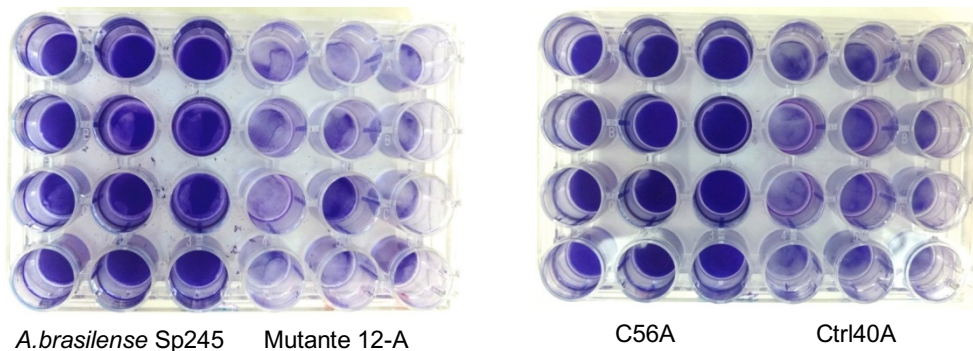
**Figura 32. Patrón de restricción del vector pVK100 con las enzimas *Sall* y *EcoRI*.** Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2 y 3: clonas de *A. brasilense* Sp245 (pVK100) con fragmentos de 17,500 pb y 5,500 pb; carril 4: DNA plasmídico de una de las clonas de *A. brasilense* Sp245 (pVK100) sin digerir; carril 5 y 6: clonas de la mutante 12-A (pVK100) con fragmentos de 17,500 pb y 5,500 pb.

Se realizó también PCR a partir de DNA genómico para comprobar el fondo genético tanto de la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245 (pVK100) como de la mutante 12-A (pVK100) (Figura 33).



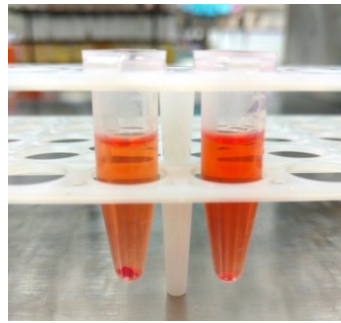
**Figura 33. A)** PCR usando los iniciadores F-ORF210 y R-ORF210. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: control negativo; carril 3 y 4: transconjugantes de *A. brasilense* Sp245 (pVK100) con amplificados de 3,079 pb; carril 4-6: transconjugantes de la mutante 12-A (pVK100) con amplificados de 4,279 pb. **B)** PCR usando los iniciadores F-ORF210 y 4571DC. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: control negativo; carril 3 y 4: transconjugantes de *A. brasilense* Sp245 (pVK100) con un amplificado de 3,221 pb; carril 4-6: transconjugantes de la mutante 12-A (pVK100) con un amplificado de 4,421 pb.

### 14.3. Biopelícula

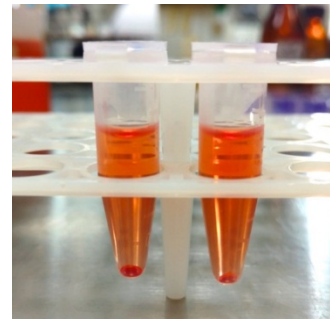


**Figura 34. Placas del ensayo de biopelícula por el método de Cristal Violeta.** Imágenes de las biopelículas formadas a las 72h por las cuatro cepas probadas. El cultivo fue crecido en medio NFb con  $\text{KNO}_3$  como fuente de Nitrógeno.

#### 14.4. Exopolisacáridos



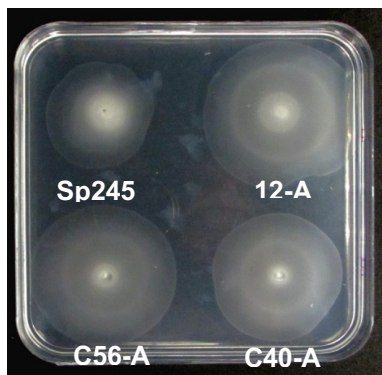
*A. brasiliense* Sp245 Mutante 12-A



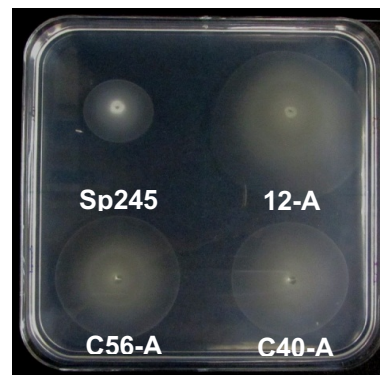
C56A Ctrl40A

**Figura 35. Sobrenadante para la cuantificación de Exopolisacáridos.** Imágenes del sobrenadante de las diferentes cepas después de la incubación de 2h, que muestran el RC que no fue unido a exopolisacáridos. El cultivo fue crecido en NFb con  $\text{KNO}_3$  como fuente de Nitrógeno.

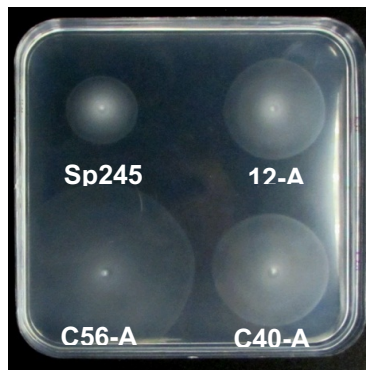
#### 14.5. Movilidad



**Figura 36.** Halo quimiotáctico de las diferentes cepas a las 48h en medio mínimo con Malato.



**Figura 37.** Halo quimiotáctico de las diferentes cepas a las 48h en medio mínimo con Fumarato.



**Figura 38.** Halo quimiotáctico de las diferentes cepas a las 48h en medio mínimo con Prolina.

## 14.6. Medios de Cultivo

### Medio K-Malato

Base para 1000 ml

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1.67 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.87 g
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O .....	0.29 g
NaCl .....	0.48 g
Ácido Málico .....	4.5326 g
Agar bacteriológico .....	1.5%

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

### Reactivos para complementar

CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O 0.7% .....	10 ml
FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O 1% .....	1 ml
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O 0.5% .....	1 ml
NH <sub>4</sub> Cl 20 % .....	5 ml
Oligoelementos .....	10 ml

Esterilizar a 5 libras, durante 30 minutos.

### Oligoelementos (1000 ml)

MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O .....	0.25g
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O .....	0.07g
CoSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O .....	0.014g
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O .....	0.0125g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	0.003g

Esterilizar a 5 libras, durante 30 minutos.

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

### **MEDIO LB\* (Luria Bertani Modificado)**

Para un 1000 ml

Peptona de caseína .....	10.0 g
Extracto de levadura .....	5.0 g
Cloruro de sodio (NaCl) 10 mM .....	0.5848 g
Sulfato de Magnesio (MgSO <sub>4</sub> ) 2.5 mM .....	0.6162 g
Cloruro de Calcio (CaCl <sub>2</sub> ) 2.5 mM .....	0.3675 g

Ajustar el pH a 7 con NaOH al 20%

Para medio sólido preparar con agar bacteriológico al 1.5 %

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

### Medio Rojo Congo (RC)

Para 1000 ml

DL-málico .....	5.0 g
Extracto de levadura .....	0.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 % .....	5 ml
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O 10% .....	2 ml
NaCl 10% .....	1ml
FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O 1% .....	1.4 ml
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O 0.1% .....	2 ml
KOH .....	4.0 g
Rojo Congo 0.25% .....	15 ml

Ajustar el pH a 6.8 con KOH al 10%

**Nota:** Ajustar el pH antes de agregar el rojo congo.

Para medio sólido preparar agar bacteriológico al 1.5 %

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

### Medio NFb (Nitrogen Fixation Biological)

Para 1000 ml

Ácido málico .....	3.70 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10% .....	5 ml
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O 10% .....	2 ml
NaCl 10% .....	1 ml
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O 1% .....	2 ml
Micronutrientes .....	2 ml
Fe-EDTA 1.64% .....	4 ml

Fuente de Nitrógeno para 1000ml

KNO <sub>3</sub> .....	1.39 g
------------------------	--------

Stock de Micronutrientes

Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O .....	0.200 g
MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O .....	0.235 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	0.280 g
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O .....	0.008 g
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O .....	0.024 g
H <sub>2</sub> O .....	200 ml

Ajustar el pH a 6.5 con KOH al 10%

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

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

## 14.7. Soluciones

### Buffer de fosfato (BF) 66 mM estéril

Preparar las siguientes soluciones stock:

Para 1L de agua destilada

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	9.08 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> {	
Anhidro .....	9.372 g
2H <sub>2</sub> O .....	11.8 g
7H <sub>2</sub> O .....	17.88 g

Para preparar 1L de BF, mezclar:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	392 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	608 ml

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

### Solución de cristal violeta (CV) con agua destilada.

Se prepara de preferencia con material de laboratorio de vidrio.

**Nota:** Se suele filtrar después de preparada pues puede dejar grumos al usarla.

### Solución de ácido acético al 33% con agua destilada.

Esta solución no se prepara en grandes volúmenes para que sea reciente al momento de usarse para el ensayo.

**Nota:** Se prepara con ácido acético glacial.

### Rojo Congo (RC) al 0.25% con agua destilada.

Se prepara de preferencia con material de laboratorio de vidrio.

**Nota:** Se deja mezclar varios minutos.