



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

“Aislamiento y caracterización de cepas de *Azotobacter* spp. y el efecto de la sobreexpresión de los sRNA: *RsmZ1* y *RsmZ6* sobre la producción de alginato”

T E S I S

que para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

GARCÍA GONZÁLEZ DIEGO

**DIRECTORA DE TESIS:
D.C DALIA MOLINA ROMERO**

**CO-DIRECTORA DE TESIS:
D.C. LILIANA LOPEZ PLIEGO**



DICIEMBRE 2019

Dedicatoria

A mi Mamá

A Hilda

A Gabi

A Regina



AGRADECIMIENTOS

A mi Mamá. Te agradezco por darme la vida, fuiste y serás siendo mi motor en mi vida, no hay palabras para decirte lo muchísimo que te quiero, a pesar de las tormentas que vivimos siempre estuvimos los dos hasta el último momento, no me alcanzaría la vida para agradecerte todo lo que hiciste por mí, me haces mucha falta.

A mi tía Hilda, Siempre serás una de las personas más importantes de mi vida, siempre te preocupaste por nosotros, no me alcanzaría la vida para agradecerte todo lo que has hecho por mí, te quiero muchísimo.

A mi prima Gabriela, Eres una persona muy valiosa, amorosa, te agradezco por todo la ayuda que me has dado, por tu cariño, tus consejos.

A mi asesora de Tesis; Dalia Molina Romero, Gracias profa por darme la oportunidad y la confianza de trabajar en su laboratorio, le doy las gracias por sus enseñanzas, por la paciencia, por sus consejos, por su apoyo incondicional en los momentos buenos y difíciles, es una gran persona, tiene un gran corazón, le agradezco a la vida por a ver me encontrado con usted.

A mi co-asesora de Tesis; Liliana López Pliego... Lili gracias por tu paciencia, por tu ayuda en el laboratorio, por tu confianza, por tu apoyo moral en los momentos difíciles que pase, eres una gran persona.

Al Doc Miguel Castañeda por abrirme las puertas de su Laboratorio.

A las doctoras del Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología; Alejandra de Gante González, Lorena Milflores Flores, Berenice Venegas Meneses por todo su apoyo incondicional, las quiero mucho.

A los chicos del laboratorio de Genética Molecular Microbiana; Laris, Ara, Viki, Jime, Lennis, Verito, Dianita, Brenda, Emanuel, Alan, gracias por su apoyo en el laboratorio.

A la Maestra Ana Lucia Castillo Meza por su apoyo en la parte experimental de este proyecto.



**A DIOS
A LA VIDA**

ÍNDICE

RESUMEN.....	8
I INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Generalidades del género <i>Azotobacter</i>	9
1.2 Características principales de <i>Azotobacter chroococcum</i>	9
1.3 Características principales de <i>Azotobacter vinelandii</i>	10
1.4 Generalidades, Naturaleza bioquímica y función biológica del alginato.....	10
1.5 Aplicaciones del alginato	12
1.7 Biosíntesis del alginato	12
1.8 Genes implicados en la biosíntesis de alginato.....	14
1.9 El sistema maestro de doble componente.....	14
1.10 El Sistema de Regulación GacS/GacA.....	15
1.11 El sistema postrancricional Rsm.....	16
II ANTECEDENTES.....	19
2.1 El sistema Rsm / sRNAs en <i>A. vinelandii</i> y la relación en la producción de alginato.....	19
2.2 Efecto de la sobreexpresión de los sRNAs reguladores de la familia Rsm en <i>A. vinelandii</i>	20
III JUSTIFICACIÓN	22
IV HIPÓTESIS	22
V OBJETIVOS.....	23
5.1 Objetivo general.....	23
5.2 Objetivos particulares.....	23
VI MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
VII RESULTADOS.....	33
VIII DISCUSIÓN	47
IX CONCLUSIONES.....	53
X PERSPECTIVAS.....	53
XI BIBLIOGRAFÍA.....	54
XII ANEXOS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del alginato.....	11
Figura 2. Modelo de caja de huevo.....	11
Figura 3. Diagrama de la biosíntesis de alginato.....	13
Figura 4. Genes involucrados en la biosíntesis de alginato	14
Figura 5. Sistema de doble componente GacS/GacA.....	15
Figura 6. Sistema post-trascricional Gac-Rsm en <i>Azotobacter vinelandii</i>	17
Figura 7. Estructura secundaria de los sRNAs del sistema Rsm en <i>Azotobacter vinelandii</i>	18
Figura 8. Producción de alginato en mutantes con sobreexpresión de los sRNAs de <i>A. vinelandii</i>	21
Figura 9 Aislamiento primario. Siembra de gránulos de tierra en medio sólido de Ashby-Manitol.	33
Figura 10. Fenotipo de los aislados ambientales.....	34
Figura 11. Marcadores moleculares.....	36
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los amplificadores del gen DNAr 16S de los aislamientos.....	37
Figura 13. Filogenia de cepas.....	
Figura 14. Cuantificación de alginato en cepas aisladas de <i>A. vinelandii</i>	40
Figura 15. Cuantificación de alginato en cepas aisladas de <i>A. vinelandii</i>	41
Figura 16. Cuantificación de alginato en cepas aisladas de <i>A. chroococcum</i>	42
Figura 17. Mapa del vector pUMAgyrkm.....	44
Figura 18. Cuantificación de alginato en cepas transformantes de <i>A. vinelandii</i> ...	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas aisladas y plásmidos utilizados.....	25
Tabla 2. Marcadores moleculares utilizados para caracterizar aislados ambientales de suelo de <i>A. vinelandii</i>	29
Tabla 3. Oligonucleotidos utilizados para verificar las células recombinantes....	31
Tabla 4. Pares de oligonucleotidos utilizados para verificar los sRNAs transformados en aislados de <i>A. vinelandii</i>	31
Tabla 5. Caracterización molecular con marcadores moleculares y descripción de la morfología colonial de cada cepa.....	35
Tabla 6. Correspondencia de los aislados según el análisis tipo BLAST reportados en la base de datos del 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archacea) del NCBI.....	38

RESUMEN

Algunas especies del género *Azotobacter* spp. se caracterizan por su capacidad de fijar nitrógeno y la producción de dos polímeros de uso industrial: el poliéster polibeta hidroxibutirato (PHB) y el alginato; el segundo es un polímero con uso principalmente en la industria alimenticia, farmacéutica y médica. Actualmente el alginato es extraído de las algas cafés, sin embargo, la calidad del polímero varía de acuerdo con la estación del año en el que se cosechen las algas. Una alternativa a este problema es la producción de alginato bacteriano a través de fermentadores que permitan tener control en la producción de un polímero de calidad. La biosíntesis de alginato en *A. vinelandii* se encuentra bajo el control de un sistema de señalización denominado sistema de doble componente GacS/GacA, que a su vez está vinculado a un sistema de regulación postranscripcional llamado Csr/Rsm, éste involucra a una proteína represora CsrA y pequeños sRNAs no codificantes pertenecientes a dos familias, RsmZ y RsmY según la clasificación realizada en las cepas de *Pseudomonas* spp., de los cuales *A. vinelandii* posee siete alelos de RsmZ y uno de RsmY. La participación de estos sRNAs en la regulación de la producción de alginato es a través de su unión con la proteína represora RsmA que actúa como un regulador negativo de la expresión de los genes blancos que controla, en este caso, la proteína RsmA se une al RNA mensajero del gen *algD* provocando su desestabilización y consecuente degradación.

El objetivo de este trabajo fue aislar cepas de *A. vinelandii* a través de la identificación fenotípica y genotípica; la primera etapa fue llevada a cabo utilizando medios de cultivos selectivos y la segunda a través de la amplificación de regiones altamente conservadas de cuatro genes considerados como marcadores genéticos para el género *Azotobacter* spp. además del gen 16S rDNA. Se obtuvo una alta identidad nucleotídica de cinco cepas aisladas con la secuencia del gen 16S ADNr de *A. vinelandii* strain IAM 15004. Para el caso de dos cepas se obtuvo una alta identidad con la especie de *A. chroococcum* strain NBRC 102613. Se cuantificó la producción de alginato para cada cepa; cuatro de las cepas aisladas de *A. vinelandii* producen diez veces mayor cantidad de polímero que la cepa tipo AEIV (E) de *A. vinelandii*. En el caso de las cepas de *A. chroococcum* su producción fue cuatro veces mayor en comparación a la cepa control. En uno de los aislados de *A. vinelandii* nombrado S4T se sobreexpresaron los pequeños sRNAs, *RsmZ1* y *RsmZ6*; donde se obtuvieron dos recombinantes: S4T_Z1 y S4T_Z6, a las cuales se les cuantificó la producción de alginato; donde se evidenció que la cepa recombinante S4T_Z1 presentó una producción similar a la cepa aislada silvestre S4T. Por el contrario, se observó una disminución del 38.13 % en la producción de alginato de la cepa recombinante S4T_Z6 en comparación a la cepa silvestre S4T.

I. INTRODUCCIÓN

Generalidades del género Azotobacter

El género *Azotobacter* está distribuido generalmente en distintos entornos ambientales como suelo, agua, superficies de hojarasca y la rizosfera de las plantas (Mazinani y Asgharzadeh 2014). *Azotobacter* es un género perteneciente al dominio de las γ -proteobacterias que está emparentada filogenéticamente con el género de las *Pseudomonas*. Dentro del género *Azotobacter* se encuentran clasificadas al menos siete especies: *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter armeniacus*, *Azotobacter beijerinckii*, *Azotobacter nigricans*, *Azotobacter paspali*, *Azotobacter salinestris* y *Azotobacter vinelandii* (Kennedy *et al.*, 2005). Algunas especies de este género han sido bien documentadas por su capacidad de producir exopolisacáridos (EPS) de interés comercial, fijar nitrógeno atmosférico con una tasa de respiración alta y por la promoción general del crecimiento de plantas (PGPR) (Gauri *et al.*, 2012).

Las estrategias más utilizadas para el aislamiento de bacterias del género de *Azotobacter spp.* incluyen medios de cultivo libres de trazas de nitrógeno, con el uso de diferentes fuentes de carbono y el estado físico del medio (sólido o líquido). Otro parámetro importante es el inóculo de las muestras de suelo como; gránulos individuales, o suspensión de suelo (Hendrik, 2006). Para su identificación preliminar se utilizan pruebas a nivel fenotípicas como morfología colonial, tinción de gram y pruebas bioquímicas (Torres-Rubio *et al.*, 2000). Sin embargo, estas pruebas no resultan tan eficientes para la caracterización de *Azotobacter* a nivel especie, principalmente a sus similitudes fenotípicas que presenta con la familia de las *Pseudomonadaceae*; por lo que se han desarrollado métodos para su detección en base a análisis moleculares como la restricción del ADNr (ARDRA) (Aquilanti *et al.*, 2004).

El primer reporte del género de *Azotobacter spp.* data en 1952 la cual fue nombrada como *Azotobacter agilis* posteriormente fue designado como *Azotobacter vinelandii* y fue aislada por primera vez de suelos en Vineland, Nueva Jersey (Noar y Arcena, 2018.) La cepa de *A. vinelandii* O que posee un fenotipo viscoso y mucoide de color blanco, esta cepa forma parte de la colección bacteriana de la universidad de Winconsin, Madison. Posteriormente Bush y colaboradores 1959 designó a un aislamiento del género *Azotobacter spp.* con fenotipo fluorescente y no mucoide como *A. vinelandii* OP. La cepa OP también se ha llamado UW y CA. Por otro parte la cepa DJ de *A. vinelandii* es una variante transformante de la cepa UW de *A. vinelandii* generada en 1984 a través de múltiples rondas de transformaciones, utilizando ADN cromosómico de cepas con resistencia antibióticos sensibles como la rifampicina. Existen poco genomas secuenciados del género *Azotobacter spp.* Setubal *et al.*, 2009 llevo a cabo la secuenciación del genoma de la cepa DJ y se encuentra disponible en el banco la American Type Culture Collection (ATCC) por sus siglas en inglés con número ATCC BAA-1303.

Características principales de Azotobacter chroococcum

Dentro de las siete especies descritas de *Azotobacter spp.*, *A. chroococcum* fue la primera especie en aislarse en suelos de Holanda en 1901 (Mrkovacki y Miliv, 2001). Entre los saprófitos y las bacterias nodulares, *A. chroococcum* fue considerado como el más estudiado en aspectos relacionados con la nutrición de plantas, su contribución a la fertilidad de los suelos y su utilización en investigaciones como inoculante microbiano. *A. chroococcum* varía en distintas formas morfológicas como células pleomorfas ovoides hasta células cocoides de 1.5 a 2.0 µm de diámetro, es una gram negativa (Wani *et al.*, 2016). Se ha documentado que *A. chroococcum* produce giberilinas, auxinas y citoquininas (Mrkovacki y Miliv, 2001). Además, tiene la capacidad de producir un pigmento color marrón oscuro soluble en agua llamado melanina, que está involucrado en el metabolismo durante la fijación del nitrógeno, y se cree que la síntesis de este metabolito protege el sistema de la nitrogenasa del oxígeno (Wani *et al.*, 2016). Otro metabolito secundario que produce *A. chroococcum* es el alginato (Khanafari y Sepahei, 2007).

Características principales de Azotobacter vinelandii

La morfología colonial que presenta son colonias opacas, convexas, para la mayoría de las cepas son mucoides, brillantes y lisas. Su morfología microscópica presenta un estado pleomórfico variando desde formas bacilar hasta formas cocoides, las células tienen un diámetro que va de 1.6-2.5 x 3-5 μm . Se les puede observar como bacilos individuales, en pares o formando agregados irregulares (Kennedy *et al.*, 2005).

Es una bacteria gram negativa que ha sido considerado un microorganismo modelo diazotrófico, debido a su capacidad de fijación de nitrógeno bajo condiciones de aerobiosis mientras que protege su complejo de la nitrogenasa del daño oxidativo (Setubal *et al.*, 2009). La fijación biológica del nitrógeno (FBN) se lleva a cabo por algunas bacterias que contienen un sistema enzimático llamado di-nitrogenasa y está conformado por dos proteínas; proteína-Fe, proteína-Mo-Fe (Espín, 2008). *A. vinelandii* posee tres sistemas diferentes de di-nitrogenasas; una de las principales contiene molibdeno (Mo), vanadio (V) y una tercera con hierro (Fe), la fijación biológica de nitrógeno es un proceso donde el N_2 es reducido y luego fijado en la forma de iones amonio (NH_4) o nitrato (NO_3), para que este elemento sea biodisponible para las plantas y microorganismos (Mayz-Figueroa, 2004). Además, presenta similitudes con el género *Pseudomonas*, entre las que destacan su genoma y la producción de alginato (Tavafi *et al.*, 2017); *Azotobacter* spp. se distingue de este género por poseer características como su estilo de vida aeróbico y la formación de quistes (Adaya *et al.*, 2018). La capacidad de producir quistes como formas de resistencia metabólica latentes cuando hay una disminución de nutrientes, proceso conocido como enquistamiento (Nosrati *et al.*, 2014). El proceso de enquistamiento se produce naturalmente en la fase estacionaria tardía o bajo la inducción de células vegetativas con butanol, este proceso le confiere resistencia a la desecación y a diferentes adversidades ambientales, pudiendo sobrevivir durante más de 10 años en suelo seco almacenado (Rodríguez-Salazar *et al.*, 2017). Otra de las características que posee *A. vinelandii*, son las múltiples copias de su DNA cromosomal, se calcula que pueden tener hasta ochenta copias de este DNA (Maldonado *et al.*, 1994). La cepa de *A. vinelandii* DJ presenta un genoma de tamaño 5,365,318 pb (Setubal *et al.*, 2009).

Descripción de los alginatos

Generalidades, naturaleza bioquímica y función biológica del alginato

Existen diferentes organismos con la capacidad de producir alginato, estos pueden ser vegetales, algas marinas y bacterias. Las bacterias del género *Pseudomonas spp.* y *Azotobacter spp.* son las únicas procariotas productoras de este polisacárido (Miranda *et al.*, 2008). Los alginatos son polisacáridos lineales extracelulares que están compuestos por proporciones variables de ácido β -D manurónico (M) y su epímero el ácido α -L-gulurónico (G) unidos por enlaces β 1-4 (Hay *et al.*, 2013) (Fig.1).

La distribución de estos monómeros consiste en bloques consecutivos de ácido manurónico (M) y bloques de ácido gulurónico (G). Este polisacárido puede estar acetilado y la cantidad relativa de residuos de G/M varía según las condiciones de crecimiento y el ambiente donde se desarrolla el organismo productor del alginato (Urtuvia *et al.*, 2017). Los alginatos presentan características estructurales de gelificación y termorresistencia en donde se involucra la interacción de este polímero con cationes divalentes, como el calcio, estos se unen entre los bloques del ácido α -L-gulurónico (G), formando puentes intercelulares iónicos (asociación cadena-cadena) conocido como “Modelo caja de huevo” (Fig.2) (Braccini y Pérez, 2001).

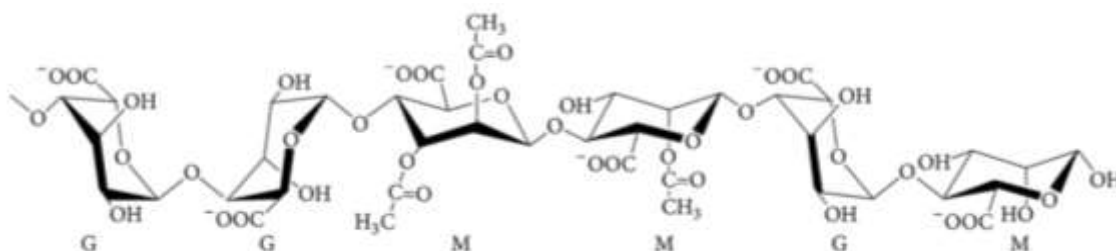


Fig. 1 Estructura química del alginato (Urtuvia *et al.*, 2017).

El alginato en *Pseudomonas* spp. actúa como material extracelular para la formación de biopelículas como mecanismo de protección celular, y para restringir la difusión de antibióticos clínicos. En cambio *Azotobacter* spp. lo produce para formar una cápsula que le permite protección a sus di-nitrogenasas o como etapa de reposo para formar quistes resistentes a la desecación, difusión de oxígeno y metales pesados (Manzo *et al.*, 2011).

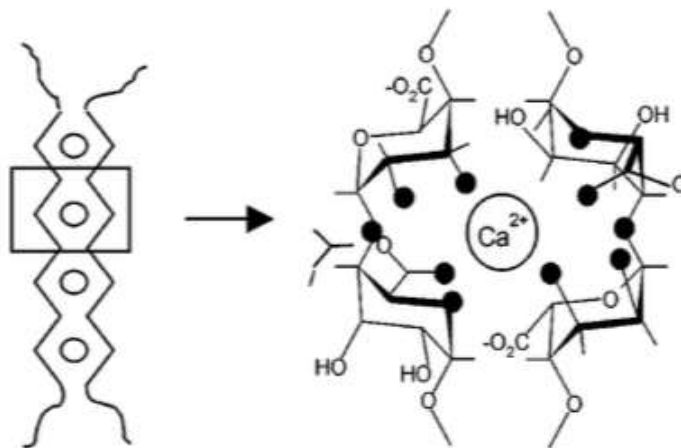


Fig. 2 “Modelo de caja de huevo” tomado de Braccini, I., y Pérez, S. 2001.

Aplicaciones biotecnológicas de los alginatos

Los alginatos son utilizados en diferentes industrias, en la alimenticia son empleados como espesantes en salsas, jarabes y helados, en el área farmacéutica y médica se usa para la elaboración de impresiones dentales, producción de apósitos para heridas y en el área de la biotecnología se utiliza para la inmovilización de células. Los alginatos producidos por algas marinas como *Cyanophyceae* (algas verdes azuladas) y *Chlorophyceae* (algas verdes) presentan una calidad muy variable del polímero, ya que la constitución del polímero depende de las condiciones del medio ambiente en el que crece el alga (Miranda *et al.*, 2008). Por otra parte, el alginato de origen bacteriano presenta un gran potencial industrial y biotecnológico por sus características estructurales homogéneas, en consecuencia, los geles son más estables y termoresistentes (Hay *et al.*, 2014).

Biosíntesis del alginato bacteriano

La biosíntesis de alginato se puede dividir en cuatro eventos: 1) la síntesis de precursores, 2) la polimerización del ácido GDP-manurónico y su transporte hacia la membrana citoplasmática, 3) transferencia hacia el sitio periplásmico y modificaciones post-polimerización y 4) la exportación a través de la membrana externa (Fig.3) (Hay *et al.*, 2010).

Las fuentes de carbono son metabolizadas por la vía Entner-Doudoroff generando gliceraldehido-3-fosfato y piruvato, siendo la ruta central para el catabolismo de la fructosa-6-fosfato, el metabolito inicial de la biosíntesis de alginato. El primer paso es isomerizar a la fructosa-6-fosfato mediante la enzima *fosfomanosa isomerasa (PMI-GMP-*algA*)* a manosa-6-fosfato que será convertida en manosa-1-fosfato por la enzima *fosfomanomutasa (PMM-*algC*)*, el siguiente paso es catalizar la conversión de la manosa-1-fosfato a GDP-manosa por la enzima *fosfomanosa isomerasa (PMI-GMP-*algA*)*, posteriormente se genera una reacción para la formación del ácido GDP-manurónico por la oxidación de la enzima *GDP-manosa deshidrogenasa (GMD-*algD*)* siendo el sustrato directo y el punto crucial de control cinético para la biosíntesis del alginato. La enzima glicosil-transferasa y c-di-GMP participan en la polimerización y transporte del ácido GDP-manurónico que es el sustrato que se polimeriza a nivel de membrana interna para formar ácido polimanurónico. En último lugar el ácido polimanurónico sufre una serie de modificaciones post-polimerización por un complejo de acetilasas que comprende AlgI, AlgV, AlgF y los residuos de manuronato no acetilados se epimerizan a guluronato por una epimerasa de manuronato AlgG o ME y finalmente se exporta a través de la membrana externa por una proteína con actividad de canal iónico AlgE, el polímero exportado es convertido finalmente a alginato por una familia de siete epimerasas homologas AlgE1-7 (Fig.3)(Galindo *et al.*, 2007).

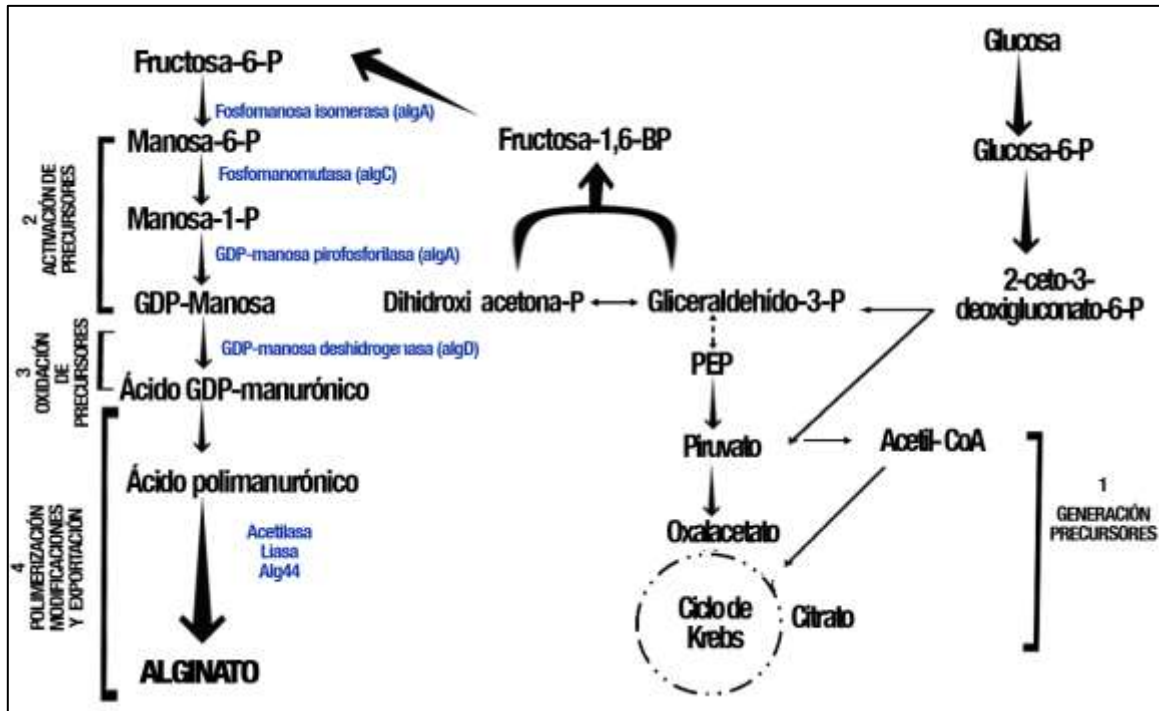


Fig. 3 Diagrama de la biosíntesis del alginato tomado y modificado de Galindo et al., 2007.

Genes implicados en la biosíntesis de alginato

En *A. vinelandii* los genes involucrados en la biosíntesis del alginato son similares al género *Pseudomonas* spp. La disposición de los genes centrales de la biosíntesis, están organizados en un operón que está constituido por, *algD*, *alg8*, *alg44*, *algK*, *algE* (llamado *algJ* en *A. vinelandii*), *algG*, *algX*, *algL*, *algI*, *algJ* (denominado *algV* en *A. vinelandii*), *algF* y *algA* (Fig.4) (Hay et al., 2014).



Fig. 4 Genes involucrados en la biosíntesis de alginato. Tomado de Galindo et al., 2007.

Sistema de regulación de doble componente

Las bacterias de vida libre se enfrentan a constantes cambios ambientales; para su supervivencia, requieren de la adaptación de su metabolismo a través de una regulación génica flexible (López-Pliego *et al.*, 2018). El sistema de regulación de doble componente ayuda a responder a estos cambios tanto abióticas como bióticas (Krell *et al.*, 2010). Este sistema de transducción de señales permite regular la densidad poblacional a través de un proceso de comunicación celular denominado *quorum-sensing* (QS) (Castañeda *et al.*, 2001). Por otra parte, las señales abióticas como la temperatura, tensión de oxígeno y pH son censadas por este sistema, permitiendo a la bacteria adaptarse a su ambiente. Estas señales desencadenan la activación de factores de transcripción que activan la expresión de genes que permiten a la bacteria responder a diferentes cambios ambientales (Krell *et al.*, 2010).

Se han identificado más de 200 sistemas de doble componente en diversos genomas bacterianos (Gao *et al.* 2009). Los sistemas de doble componente están conformados por una cinasa sensora (CS) que posee un dominio transmisor que incluye un residuo de histidina (His) conservado y un dominio de unión de ATP conocido como caja G y un regulador de respuesta (RR) (Barba-Ostria, 2014). El dominio de entrada reconoce una señal específica del ambiente, la cual da como resultado la activación del dominio transmisor y su autofosforilación en el dominio de salida que incluye un residuo de His conservado. El dominio de salida de la CS fosforilado interactúa con el dominio RR, catalizando la transferencia de un grupo fosfato a un residuo de aspartato conservado dentro del dominio receptor. La fosforilación del regulador respuesta activa su dominio de salida, lo que resulta en cambios conformacionales en el RR ayudando a actuar en actividades biológicas específicas (fig.5) (Bretl *et al.*, 2011).

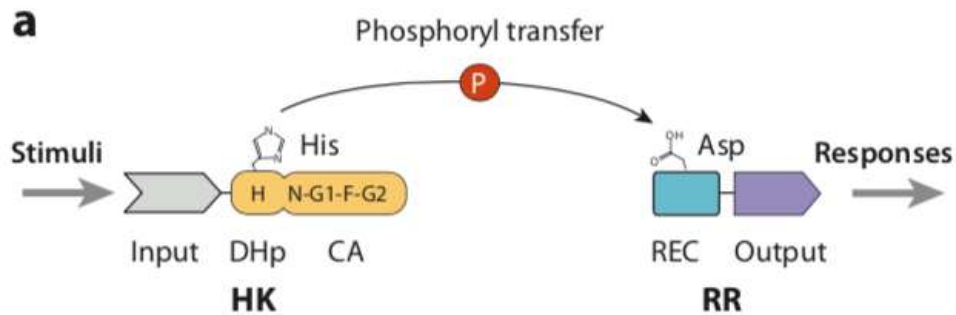


Fig.5 Sistema de doble componente, mecanismos de activación de una cinasa histidina clásica tomada de Gao y Stock, 2009.

GacS/ GacA

En *A. vinelandii* el sistema de transducción de señales se llama GacS/GacA que regula la expresión de distintos genes de diversas rutas metabólicas (Castañeda *et al.*, 2001). El sensor quinasa GacS, inicialmente se llamó LemA descubierta por primera vez en *Pseudomonas syringae*, y el regulador de respuesta GacA se descubrió en *Pseudomonas fluorescens*. Se han estudiado sistemas de doble componente homólogos a GacS/GacA, en una gran variedad de bacterias gram negativas (Heeb y Haas, 2001). Los componentes estructurales del sistema pertenecen a una clase de quinasas sensoras de histidina poco ortodoxas, la estructura de esta cinasa está constituida por un transmisor de fosforilo, un receptor y un dominio intermediario en la transferencia conocido como (Hpt). El segundo componente, el regulador respuesta GacA contiene un motivo de hélice-giro-hélice involucrado en la unión del ADN. La vía de transducción de señales inicia con la autofosforilación de GacS en el primer residuo de histidina, para posteriormente, fosforilar a GacA en su aspartato conservado, actuando este regulador de respuesta como un aceptor de fosforilo, GacA fosforilado activa o reprime la transcripción de elementos que a su vez controlan la expresión de genes diana (Heeb y Haas, 2001) (Fig.6).

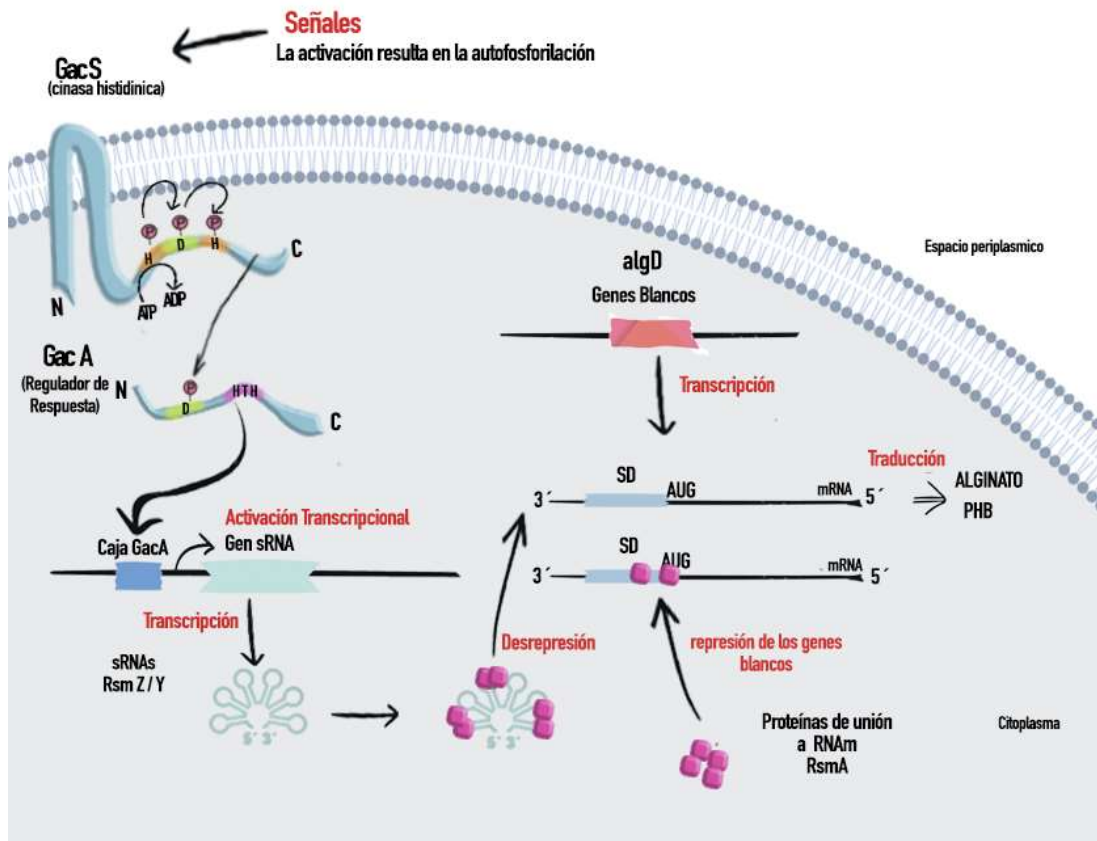


Fig. 6 Modelo de la cascada de regulación Gac-Rsm en *A. vinelandii*. Tomado y modificado de Lapouge et al., 2008.

Sistema de regulación postranscripcional Rsm

El sistema GacS/GacA está ligado a un sistema postranscripcional llamado Csr/Rsm que involucra a una proteína represora CsrA y pequeños sRNAs no codificantes (Castañeda et al., 2016). El sistema Csr (denominado así por sus siglas en inglés carbon storage regulator) es un regulador global en el almacenamiento de carbono o Rsm (por sus siglas en inglés repressor of stationary phase metabolites), este sistema se encarga de la regulación del metabolismo secundario en *A. vinelandii* Castañeda et al., 2016.

Este regulador maestro está constituido por la proteína de unión CsrA, la cual se encarga de unirse a la secuencia Shine-Dalgarno (SD) localizada en el RNA mensajero generando la represión de la traducción, considerándose un regulador negativo postranscripcional (fig.6) (Romeo et al., 2012). Se han identificado muchos homólogos a CsrA (CsrB y CsrC) en *E.coli.*, (RsmA) en *Erwinia carotovora* y en *P. fluorescens* (RsmA y RsmE) (Romeo et al., 2012). El otro elemento regulador del sistema Rsm son los pequeños sRNAs no codificantes que interactúan con CsrA ya que contienen múltiples

sitios de unión, estos secuestran y contrarrestan la actividad de represión de la proteína CsrA (Lapouge *et al.*, 2007). En *Pseudomonas* spp. están presentes tres familias de pequeños sRNA no codificantes RsmZ, RsmY y RsmX (Moll *et al.*, 2010). Los pequeños rRNAs tiene en su estructura secundaria secuencias altamente conservadas que contiene motivos en forma de horquilla y de tallo que facilitan el reconocimiento de la proteína CsrA (Dubey *et al.*, 2005)

Así mismo en *A. vinelandii* se ha demostrado la existencia de siete alelos sRNAs de la familia RsmZ denominados RsmZ1, RsmZ2, RsmZ3, RsmZ4, RsmZ5, RsmZ6 y uno de la familia RsmY (fig.7) (Manzo *et al.*,2012). Se ha demostrado que estos sRNAs participan en la regulación de la síntesis de metabolitos secundarios como PHB, alquiorescinoles (AR) y el alginato. GacA actúa como activador transcripcional de los pequeños sRNAs del sistema Rsm (Hernández-Eligio, 2012).

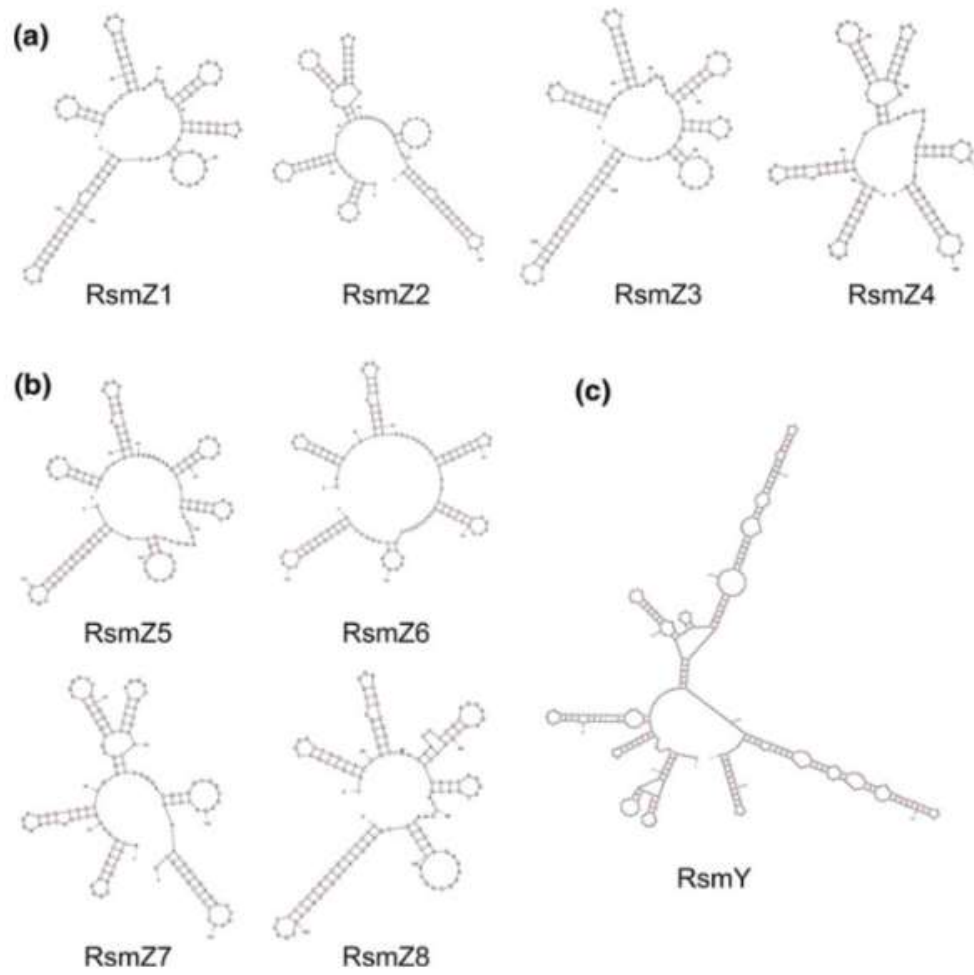


Fig. 7 Estructura secundaria de los sRNAs del sistema Rsm en *A. vinelandii* Castañeda et al., 2016.

II. ANTECEDENTES

Genes con regiones altamente conservadas en el género Azotobacter spp.

A. vinelandii presenta similitudes bioquímicas con la familia de las *Pseudomonadaceae*; sin embargo, se ha documentado que *Azotobacter spp.* posee características fenotípicas y genéticas muy particulares. Consideramos como marcadores genéticos a cuatro genes que se encuentran en el genoma de *A. vinelandii* DJ, debido a que dos genes son únicos en el genoma de *Azotobacter* y otros dos genes presentan diferencias con el género de la *Pseudomonas spp.* Se realizó un análisis Bioinformático, tipo BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos NCBI, se compararon estas secuencias de nucleótidos con los genes del género de *Pseudomonas spp.* mostrando que estas secuencias efectivamente se encuentran conservadas en el género *Azotobacter* y no en *Pseudomonas spp.* (Tabla1).

El factor sigma (*rpoS*) que está involucrado en el control de la síntesis de AR, se obtuvo una mutante *rpoS* incapaz de sintetizar estos lípidos implicados en el proceso de enquistamiento de *A. vinelandii* (Romero *et al.*, 2016). Por otra parte, Cocotl-Yañez, (2011) demostró que en *A. vinelandii*, *rpoS* activa uno de los tres promotores del gen *algD*, involucrado en la biosíntesis de alginato; este también activa el gen *phbB* involucrado en la biosíntesis de polihidroxitiratos.

El gen *oprF* codifica una proteína multifuncional de la membrana externa del género *Pseudomonas spp.*, este gen presenta una secuencia altamente conservada (Bodilis y Barry, 2006). Sin embargo, Rediers (2004) afirmó que en *A. vinelandii*, el gen *oprF* es ortólogo, ya que mostró una alta identidad de aminoácidos con *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (68% de homología), mientras que en *P. fuscovaginae* y *P. aeruginosa* PAO1 tan sólo fue del 49%, además realizaron la construcción de un árbol filogenético basado en estas secuencias, confirmando la estrecha relación entre *P. aeruginosa* PAO1 y *A. vinelandii*.

Una característica distintiva de esta proteína ortóloga de OprF en *A. vinelandii* es su contenido de aminoácidos ubicado en un dominio central con cuatro residuos de cisteína conservados, característica que se encuentra ausente en la proteína OmpA homóloga a OprF de enterobacterias (Mot *et al.*, 1994). Con lo antes expuesto se asume que el gen

oprF puede ser empleado como un marcador molecular para la identificación de microorganismos pertenecientes al género de *Azotobacter spp.*

El gen *alyA1* fue identificado en el genoma de *A. vinelandii*, en conjunto con dos enzimas de alginato liasas AlyA2 y 3 (Gimmestad *et al.*, 2009), que pertenecen a la familia PL7 (degradantes de polisacáridos), cuya actividad radica en la ruptura del enlace glucosídico beta-1-4 entre el ácido gulurónico y el ácido manurónico, generando un residuo de ácido gulurónico. El gen *alyA1* codifica módulos de aminoácidos de pesos moleculares bajos, que forman parte de las alginato liasas, en este estudio se secuenció el gen *alyA1-2* de la cepa AEIV de *A. vinelandii* y se mostró una identidad del 99% con los genes de la cepa DJ de *A. vinelandii*.

Por otra parte, Romero (2016) explicó que durante la fase de enquistamiento de *A. vinelandii* se induce la síntesis de los lípidos fenólicos alquiresorcinoles, estos forman parte de la capa externa del quiste. El operón *arsABCD* codifica las enzimas que sintetizan los alquiresorcinoles, una de las enzimas expresadas por este operón es la proteína ArsB, que es una policétido sintasa de tipo III, esta proteína es el producto de la expresión del gen *arsB*. Por lo antes mencionando, este gen también se empleará como marcador molecular para la identificación de las cepas aisladas en este estudio.

Tabla 1. Análisis tipo BLAST de los genes con regiones altamente conservadas en *Azotobacter spp.*

<i>gene</i>	<i>A. vinelandii</i> CA, Complete genome		<i>A. chroococcum</i> NCIMB 8003 complete genome		<i>P. areuginosa</i> PA01	
	<i>E Value</i>	<i>P. identidad</i>	<i>E Value</i>	<i>P. identidad</i>	<i>E Value</i>	<i>P. identidad</i>
<i>oprF</i>	0.0	100%	1e-143	83.54%		
<i>rpoS</i>	0.0	100%	0.0	92.43%	0.0	86.61%
<i>arsB</i>	1e-109	100%	3e-111	100%		
<i>alyA1</i>	4e-11	100%				

Sistema Rsm / sRNAs en *A. vinelandii* y la relación en la producción de alginato

Manzo y colaboradores, (2011) realizaron un estudio donde demostraron la dependencia de la proteína GacA para la expresión de los sRNAs del sistema Rsm en *A. vinelandii* y la participación del sistema Rsm sobre la expresión del gen *algD*. Al generar una mutación de los genes *rsmZ1* y *rsmZ2*, la producción de alginato se ve disminuida alrededor del 80%, siendo complementada al realizar la expresión de estas moléculas de RNA en trans. Asimismo, se demuestra la participación de la proteína RsmA en la regulación del gen blanco *algD* al realizar el ensayo de movilidad electroforética (EMSA) y la sobreexpresión genética que dio por resultado la disminución del polímero en cuestión.

Adicionalmente López-Pliego y colaboradores (2018), estudiaron el efecto diferencial en la expresión de los genes; *RsmZ1*, *RsmZ2*, *RsmZ3*, *RsmZ4*, *RsmZ5*, *RsmZ6*, *RsmZ7* utilizando diferentes fuentes de carbono y su relación con la producción de alginato. Sus resultados indicaron que el tipo de fuente de carbono influye en la transcripción de los pequeños sRNA *Rsm* donde la expresión de *rsmZ* fue mayor en presencia de succinato; también reportan que los genes rsm con mayor nivel de expresión fueron *RsmZ2*, *RsmZ6* y *RsmZ7* en contraste con la disminución de la expresión de *RsmZ1*. Las cepas mutantes con deleciones individuales de los *RsmZ* 1-7, se cultivaron en medio Burk con diferentes fuentes de carbono y se cuantificó la producción de alginato. La mutación del gen *RsmZ1* y *RsmZ4* inhibió casi por completo la producción de alginato, mientras que la ausencia de los sRNAs restantes redujo de 3 a 5 veces la producción de alginato. En cambio, cuando se utilizó succinato como fuente de carbono y la deleción de *RsmZ1*, y *RsmZ4* disminuyó la producción del polímero hasta un 80%, en el caso particular de *RsmZ2* se eliminó por completo la producción de alginato. En contraste, la ausencia de *RsmZ3*, *RsmZ5*, *RsmZ6* o *RsmZ7* solo redujo la producción del polímero en un 25%, bajo esta condición. Estos resultados mostraron que los sRNAs Z1, Z2 y Z4 tuvieron un efecto positivo en la producción de alginato independientemente de la fuente de carbono (succinato, fructosa y glucosa) empleada para el crecimiento.

Efecto de la sobreexpresión de los sRNAs reguladores de la familia Rsm en *A. vinelandii*

May Compañ, (2016), observó el efecto individual de cada uno de los sRNAs de la familia Rsm. Se generaron mutantes en el gen *gacA* (regulador respuesta) de *A. vinelandii*, y en esta cepa se sobreexpresaron los genes que codifican para los pequeños sRNAs bajo el control de un promotor constitutivo, el promotor de la DNA girasa de *A. vinelandii* *gyrA*, cuyos resultados demuestran que la expresión individual de los sRNAs son capaces de restaurar el fenotipo de producción de alginato en la mutante *gacA* carente de esta capacidad. La recombinante de RsmZ1 causa una producción similar a la cepa silvestre AEIV como se había reportado por estudios de Manzo y colaboradores (2011), por su parte, la sobreexpresión de *RsmZ6* y *RsmY3* produce una menor cantidad de alginato comparado con la cepa silvestre AEIV (Fig.8) con lo que concluye que *RsmZ1*, *RsmZ6* y *RsmY* participan en la regulación positiva de la biosíntesis de alginato.

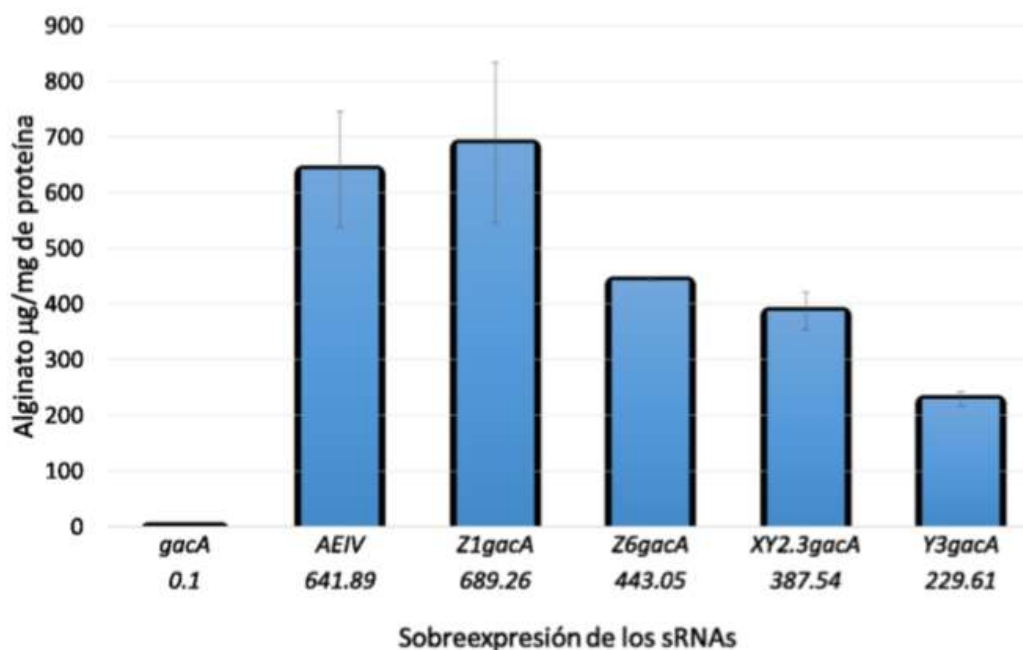


Fig.8 Producción de alginato en mutantes *gacA* con sobreexpresión de los sRNAs de *A. vinelandii* AEIV. May Compañ, (2016).

III. HIPÓTESIS

La sobreexpresión de los sRNA reguladores *RsmZ1* y *RsmZ6* en cepas aisladas de *A. vinelandii* generará un incremento en la producción de alginato.

IV. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se tienen estudios del papel que desempeñan los sRNAs *RsmZ1* y *RsmZ6* en la regulación post-transcripcional de la biosíntesis de alginato en las cepas tipo de *A. vinelandii* E, DJ, ATCC; por lo que una estrategia para poder obtener una mayor producción de alginato podría ser expresar estos sRNAs en cepas aisladas de *A. vinelandii* que tengan una alta producción del polímero y posteriormente con aplicaciones biotecnológicas en el sector industrial.

V. OBJETIVOS

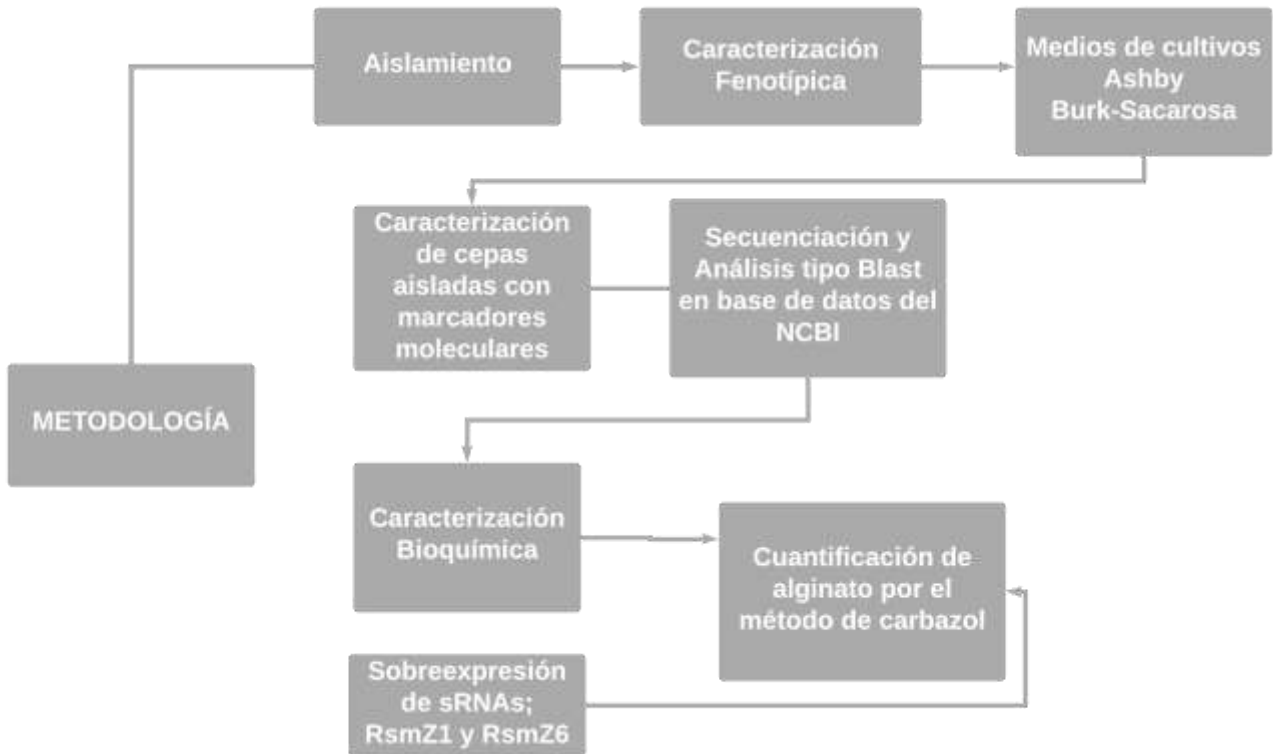
OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar molecularmente cepas de *Azotobacter spp.*

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar cepas de *Azotobacter spp.* a partir de muestras de suelo
2. Caracterizar molecularmente los aislados del género *Azotobacter spp.*
3. Cuantificar la producción de alginato en cepas aisladas de *Azotobacter spp.*
4. Determinar el efecto de sobreexpresión de los genes *RsmZ1* y *RsmZ6* sobre la producción de alginato en los aislados de *A. vinelandii*

VI. ESQUEMA DE TRABAJO



VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas aisladas y plásmidos utilizados

Tabla 2. Cepas y plásmidos aislados y utilizados en este trabajo.

CEPAS		ZONA DONDE FUE AISLADO	DESCRIPCIÓN FENOTÍPICA	REFERENCIA
AEIV (E)		Cepa silvestre también llamada cepa E.	Cepa no mucoide	Larsen and Houg (1971).
ATCC 9046	American Type Culture Collection		Hipermucoides	ATCC (American Type Culture Collection)
S 3.5	Muestreo del suelo 3.5	Tlaxcolpan, Estado de México Suelo de nopal	Fluorescente	Este trabajo.
S 7.1 (B)	Muestreo del suelo 7.1 zona B	Atlapulco, Xochimilco Suelo de Palma.	Fluorescente Hipermucoides, blanquecinas	Este trabajo.
S 7.2 (C)	Muestreo del suelo 7.1 zona C	Atlapulco, Xochimilco Suelo de Palma.	Colonias irregulares, color blanquecinas, hipermucoides	Este trabajo.
B+B1	Zona 1	Suelo del Estado de México	blanquecinas, hipermucoides	Este trabajo.
SM3	Muestreo del suelo de la mesquitera zona 3	Mesquitera-cause del rio	Colonias irregulares, color blanquecinas, hipermucoides	Este trabajo.
S4T	Muestreo del suelo de tetecho zona 4	Tetecho-risosfera	Colonias hipermucoides	Este trabajo.
S6R	Muestreo del suelo de rio zona 6	Suelo-rio	Cepa no mucoide	Este trabajo.
PLÁSMIDOS				
pUMAgryAKmrsmZ1		Vector integrativo derivado del pUMAgryAkm, que tiene clonado al sRNA RsmZ1.		May Compañ, 2016.
pUMAgryAKmrsmZ6		Vector integrativo derivado del pUMAgryAkm, que tiene clonado al sRNA RsmZ6.		May Compañ, 2016.

Caracterización Fenotípica

- *Aislamiento*

Las cepas silvestres de *Azotobacter spp.* fueron aisladas a partir de los muestreos de la Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán y del Estado de México.

Se realizó la recolección de las muestras de suelo en diferentes zonas ambientales y su posterior procesamiento mediante tamizados hasta obtener muestras de suelo con un tamaño de partícula de 4760 micrones (4.76 mm).

Para aislar cepas de *Azotobacter vinelandii*, a partir de muestras de suelo se utilizaron dos técnicas de aislamiento. La primera técnica empleada fue el uso de medios de cultivo líquidos como Burk-sacarosa (BS). Para ello se hizo un pre-cultivo colocando 1 gramo de suelo en un matraz de Erlenmeyer con 20 mL de medio Burk-sacarosa líquido, se incubó a 48 horas a 28°C y 180 rpm; posteriormente se realizó un sub-cultivo de 25 mL de medio líquido BS, el cual se inoculó con 2 mL del pre-cultivo, y se incubó durante 5 días a 28°C y 180 rpm. Se realizó la inoculación de 20 µl de sub-cultivo en medio sólido BS, incubando a 28°C por un periodo de 1 a 7 días, dependiendo del crecimiento colonial (Fig.9A). Se aislaron colonias que presentaban el fenotipo mucosas y color blanquecino (Tejera *et al.*, 2005).

La segunda técnica de aislamiento se fundamentó en colocar granos de suelo de un tamaño de 4.76 mm en medio sólido de Ashby-Manitol, los granos de suelo se mantuvieron a una distancia de un centímetro entre ellos, las condiciones de incubación fueron: 28°C por 3 a 7 días. Se aislaron y purificaron cepas con fenotipo mucosoide, brillantes y con producción de exopolisacárido (Alquilanti *et al.*, 2004).

- *Medios de cultivos*

Ashby (Ash)

Para el aislamiento de bacterias diazotróficas se formuló un medio mínimo con fuente de carbono manitol, adicionado con benzoato de sodio, en una concentración de 5 g/L, sulfato de monopotasio (KH₂PO₄ 1 g/L), sulfato de magnesio (MgSO₄ 0.2 g/L), sulfato de hierro (FeSO₄ 0.005 g/L), cloruro de sodio (NaCl 0.2 g/L), cloruro de calcio (CaCl₂ 0.2

g/L) y finalmente se ajusta el pH 7.0, en el caso de ser medio sólido se adiciona agar bacteriológico con una concentración de 15 g/L (Tejera, *et al.*, 2005).

Burk-Sacarosa (BS)

Es un medio de cultivo mínimo y se utiliza para el crecimiento de bacterias del género *Azotobacter*, previamente a la formulación del medio se deben preparar el stock de cada una de las sales y se esterilizan. Las sales se van adicionando en volumen final de 80% de agua destilada previamente esterilizada o en caso de ser medio sólido se utiliza agar bacteriológico con una concentración de 15 g/L. Inicialmente se agrega sacarosa al 20%, seguida de una solución de buffer fosfatos (en un stock de K_2HPO_4 8 g/L y KH_2PO_4 2 g/L) esta solución debe ajustarse previamente a pH 7 de la cual se les adicionará 100 ml/L, cloruro de calcio ($CaCl_2$ en un stock 7 g/L) 100 ml/L, sulfato de sodio (Na_2SO_4 en un stock 18 g/L) 10 mL/L, cloruro de magnesio ($MgCl_2$ en un stock 160 g/L) 1 ml/L, sulfato de hierro ($FeSO_4$ en un stock 5 g/L) 1 ml/L, y finalmente se agrega molibdato de sodio (Na_2MnO_4 en un stock 0.2 g/L) 1 ml/L.

Medio de Competencia (CM)

El medio CM presenta una composición similar al medio Burk-Sacarosa, la diferencia radica en la eliminación de trazas de la fuente de nitrógeno en el medio CM, que se utiliza para potenciar la competencia de las células de *A. vinelandii*.

Luria Bertani (LB)

Es un medio empleado para el crecimiento de *E. coli*, el cual contiene peptona de caseína 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 10 g/L, y en caso de ser medio sólido se adiciona agar bacteriológico con una concentración de 15 g/L.

Metodologías para la caracterización genotípica

- *Extracción de DNA genómico con el protocolo de sílica*

El crecimiento de *Azotobacter spp.* se realizó en medio BS sólido, se incubó por 2 días a 30°C, después se tomó el tapete celular y se por centrifuga a 13,000 rpm y se lavaron con MgSO₄ 10 mM hasta eliminar el alginato y se re suspendieron en 450µl de buffer TE (TRIS /EDTA) 50/20, se homogeinizaron y se agregaron 50µL de lisozima (10mg/mL), incubando a 37°C 30 min, se agregaron 30µL de proteasa (10 mg/mL), incubando a 37°C 30 min. Agregar 50µL de SDS 10% (dodecilsulfato sódico) incubar a 37°C 15 min o más tiempo hasta que se observe una solución turbia y viscosa. Agregamos 100µL de NaCl 5M, mezclar e incubar 65°C durante 10 min. Adicionar 80µL de solución CTAB al 10% (Bromuro de hexadeciltrimetil amonio) /NaCl 0.7M (previamente incubada a 65°C) e incubamos a 65°C 15-20 min). Posteriormente se extrajo una vez con un volumen de (600µL) de solución cloroformo-alcohol isoamilico 24:1 agitar y centrifugar por 5 min. Se recuperó la fase de arriba (DNA) y se sigue con el protocolo por sílica, se agregó 10µl de sílica y dejar reposar por 5 min. Se centrifugo por 1 min, se decantó el sobrenadante. Agregamos 500µl de solución. de lavado y se resuspendió por homogenización. Se realizó este procedimiento 3 veces. Dejamos secar la pastilla a 37°C o 50°C. Ya seca se resuspendió en 30µl de RNA diluida incubamos a 37°C por 1 horas finalmente se centrifugo por 2 minutos a 13,000 rpm y tomamos el sobrenadante finalmente a un tubo nuevo.

- *Electroforesis en gel de agarosa*

Se empleó como fase sólida el gel de agarosa al 1%, y la fase líquida el buffer amortiguador de Tris-acetatos, EDTA (TAE 1X), y ácido acético. Se usó un buffer de carga para las muestras y un marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb (Thermo Scientific MR). Los productos fueron visualizados en un fotodocumentador marca UVP multiDoc-it Digital Imaging System.

- *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

Se llevó a cabo la amplificación de cuatro genes de mantenimiento que se emplearon como marcadores moleculares, estos son específicos para la familia *Pseudomonadaceae*, (Tabla 3). Las condiciones de PCR dependen de cada oligonucleótido (Tab.3).

-*Diseño de marcadores genéticos*

Se utilizaron cuatro genes que se consideraron como marcadores genéticos; el gen *arsB* y *alyA1* que solo se encuentran en el genoma de *Azotobacter* y por otro lado dos genes *rpoS* y *oprF* con regiones altamente conservadas en el género de *Azotobacter spp.* (Tabla.3)

Tabla 3. Marcadores moleculares utilizados para caracterizar aislados ambientales de suelo de *A. vinelandii*.

Genes	Secuencia de oligonucleótidos 5'→3'	Tm °C	Tamaño del amplificado
<i>arsB</i>	pks_Fw ACGGCCACGGTTGAGGTTTTTC	62.4 62.9	217 pb
	pks_Rv GTCCCGACGCCGTTCTTGATGC		
<i>alyA1</i>	Algly_Fw GCTCGGTGCACGGCTGTGTGAACT	65.8 62.4	233 pb
	Algly_Rv CATCGGCGTTGCGAACAAACCACTT		
<i>rpoS</i>	DrpoS ATCGCTCTCAATATAAAAGCAA	50.7	740pb
	RrpoS CGATCGTCGGTCAGCACG	58.7	
<i>oprF</i>	DoprF CAAGCACTGGTTCAGCGATGA	62	553 pb
	RoprF GGGAGTATCCGGGCAGCG	60.9	

- *Amplificación de gen DNAr 16s*

Se realizó la amplificación del gen DNAr 16S, ya que esta es una herramienta estandarizada para la identificación de organismos existentes en diversos ambientes, utilizando los oligonucleótidos bacterianos universales fD1: 5'CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' y rD1: 5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3'. Las condiciones de PCR son las siguientes; Temperatura de alineamiento (Tm) de 60°C, con un tiempo de extensión de 45 segundos y 30 ciclos.

- *Purificación de la banda de DNA a partir de gel de agarosa*

Para verificar la integridad de las muestras de DNA, se realizó una electroforesis, posteriormente el gel se visualizó en un transiluminador, se cortaron los fragmentos de tamaño 1500 pb que corresponde al gen 16S rDNA, se agregaron tres volúmenes yorudo de sodio (NaI) 6M, y se incubó a 15 min (55°C) hasta disolver la agarosa. Agregamos 10µL de sílica, y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó 1 minuto y posteriormente se decantó el sobrenadante, luego se lavó la pastilla tres veces con 500µl de New Wash, se dejó secar la pastilla y re suspendió en H₂O (15µL) y se centrifugó 5 minutos para verificar que no contuviese sílica, finalmente se tomaron 14µL que fueron transferidos a un tubo nuevo.

- *Extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina Maxi-prep*

Se cultivó la cepa en 50 mL de LB de 8-12 horas con el antibiótico de correspondiente a 37°C en agitación, se lavaron las células en 10mL de MgSO₄ a una concentración de 10mM y se resuspendieron en 1.5mL de solución de lisis alcalina I (glucosa [50mM]; EDTA [10 mM]; Tris HCl pH 8, [25mM]) y se incubaron por 3 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 3.5 mL de solución II (NaOH 0.2 N y SDS 1%) y se invirtió el tubo lentamente de 2-3 veces, se incubó en frío a una temperatura de 4°C por 10 minutos. Se añadieron 2.5 mL de solución III acetato de potasio (CH₃COOK, 5M;) se agitó fuertemente con la mano e incubo en frío por 15 minutos. Se centrifugó a 6,000 rpm por

10 min y se transfirió el sobrenadante en tubos cónicos de (poner volumen), posteriormente se le agregó un volumen de isopropanol, y se mezcló para ser centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla 2-3 veces con 2 mL de etanol al 70% para ser centrifugado 13,000 rpm por 2 min. Se dejó secar la pastilla y finalmente se resuspendió en 200 μ L de RNAasa diluida finalmente se incubó toda la noche a 37°C.

- *Preparación de células competentes de A. vinelandii*

Se cultivó la cepa de interés en medio sólido BS, posteriormente se resembró por el método de estría cruzada en el medio CM el cual fue utilizado para potenciar la competencia de las células de *A. vinelandii*, se incubó a 30°C por 48 horas, posteriormente de esa placa se resembró la colonia aislada de forma masiva y se incubó a 30°C durante 24 horas, pasado ese tiempo se recogió el tapete celular y se colocó en un eppendorf estéril, se lavaron con 1 mL de MgSO₄ 10mM a 13,000 rpm durante 3 min.

- *Trasformación de cepas aisladas de A. vinelandii con DNA plasmídico.*

Se tomó 200 μ L de células competentes de *A. vinelandii* y se mezcló con 1 μ g de DNA plasmídico del vector integrativo en el cual se quiere recombinar, se utilizó un tubo de eppendorf de 1.5 mL, y se colocó la mezcla en centro de las placas de CM, se incubó a 30°C por 48 horas.

Se recolectó el tapete celular con 1mL de MgSO₄ a 10mM y se quitó cualquier residuo de alginato, se plaquearon con perlas de vidrio en placas de medio BS con antibiótico de selección a 30°C por 48 horas. Finalmente se seleccionaron las candidatas y se verificaron las células recombinantes con PCR utilizando los oligonucleotidos correspondientes (Tabla. 4)

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para verificar las células recombinantes

Genes	Secuencia de oligonucleótidos 5'→3'	Tm por el fabricante
CrsmB5' (rsmZ1)	5'GTCGATGGAACGACGTCGGCTGAC3'	72.29°C
Ged (rsmZ6)	5'CGTCGACGGTACCACGCAAGCC3'	72.2°C
TacR (pUMAgyrAKm)	5'CTCGAGAATAAGGGCGACACGGAAAT3'	60°C

Tabla 5. Pares de oligonucleótidos utilizados para verificar los sRNAs RsmZ1 y RsmZ6 de transformantes de *A. vinelandii*

PARES DE PRIMERS	Tamaño del amplificado
rsmB5'- TacR	744 pb
Ged -TacR	795 pb

- *Cuantificación de alginato por el método de carbazol*

Para la cuantificación se inoculó 25 mL de medio BS sin antibiótico con células de *Azotobacter spp.*, la inoculación se realizó por triplicado y se incubó a 30°C por 48 horas. Posteriormente se centrifugó el cultivo y se colectó el sobrenadante en tubos de 15 mL, se lavaron las células con una solución de EDTA al 0.01M y se volvió a recolectar el sobrenadante. Después se separó y se guardó las células para posteriormente determinar la proteína por el método de Lowry. Una porción del sobrenadante se precipitó con dos volúmenes de isopropanol y se observó un precipitado blanco el cual se centrifugó a 13,000 Rpm por 10 Min. El precipitado formado se dejó secar toda la noche, posteriormente se resuspendió en un volumen adecuado de una solución de NaCl al 0.85%. Una vez obtenido el precipitado de alginato, se procedió a medir por la reacción de alginato-carbazol. La prueba consistió en lo siguiente: en tubos de ensaye sumergidos previamente en hielo, se agregaron 3 mL de una solución ácido sulfúrico-boratos, y se agregaron 300 µL de la solución problema de alginato. Asimismo, se realizó una curva

estándar de alginato con concentraciones conocidas, la cual se realizó con 100 μ L de una solución de carbazol al 0.1%, las muestras se incubaron en un baño de agua a 50°C por 30 minutos. La prueba es una reacción colorimétrica y se desarrolla un color violeta-bugambilia y brillante. Se dejó que los tubos tomen T° Ambiente (la reacción es estable de 1-2 horas), finalmente se midió la absorbancia a 530 nm. En caso de que el alginato esté contaminado el color es café.

Paralelmante a la cuantificación de alginato de las muestras se corre una curva estándar de alginato con las concentraciones: 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05 y 0.025 mg alginato en un mL de solución, se añade 100 μ L de carbazol al 0.1% (1 gr de carbazol en 100 mL de etanol) se agita suavemente. Se colocó está reacción en un baño de agua a 50°C por 30 minutos. Se desarrolló un color violeta-bugambilia. Retirar los tubos del baño y dejar que tomen la temperatura ambiente, el color es estable de 1-2 horas. Se cuantificó la absorbancia a 530 nm y se interpolaron las lecturas en base la curva de calibración (Tabla 6).

Tabla 6. Curva de calibración de alginato

Tubo	alginato / μ L de sol. Stock	μ L de H ₂ O	Concentración mg/mL
0		175	0
1	175	-	0.5
2	140	35	0.4
3	105	70	0.3
4	70	105	0.2
5	35	140	0.1
6	17.5	157.5	0.05
7	8.75	166.25	0.025

- *Cuantificación de proteínas por el método de Lowry*

Se tomó 1 mL del cultivo de células de *Azotobacter spp.* y se centrifugó hasta obtener el paquete celular, posteriormente se lavó las células con MgSO_4 a 10mM, se resuspendió en 1mL de la misma solución. Para procesar las muestras se tomaron 10 μL de muestra de células y se añadieron con 190 μL de MgSO_4 a 10mM, se agregó 1mL de solución reactiva recién preparada (A: Na_2CO_3 2% en NaOH 0.1N, B: Tartrato de Na y K 2%, C: CuSO_4 1%) y se dejó reposar por 10 minutos con el fin de lisar las células y que el contenido celular se liberé. Se añadió 100 μl de reactivo de Folin diluido 1:2 en agua, se dejó reposar por 30 minutos. Finalmente se leyó la absorbancia a 625 nm. Paralelamente se corrió una curva de calibración usando albúmina con las siguientes concentraciones conocidas 0, 2, 4, 8, 16, 32 $\mu\text{g/mL}$.

VIII RESULTADOS

Identificación fenotípica de cepas presuntivas del género *Azotobacter spp.*

Para la identificación morfológica de bacterias diazotróficas se hizo un aislamiento secundario en medio de cultivo *Ashby*, este medio selectivo permite el crecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno ya que es libre de trazas de nitrógeno. Se obtuvieron un total de siete cepas aisladas que presentaron la morfología característica del género *Azotobacter spp.* como son: colonias color blanquecinas con bordes irregulares y de aspecto mucoso (Fig.9).

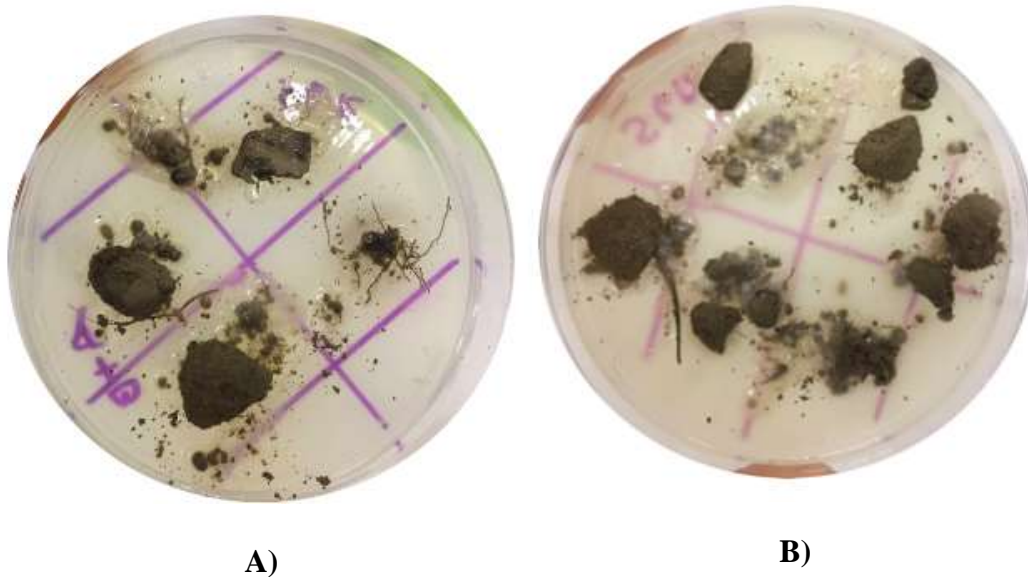


Fig. 9 A) Aislamiento primario. Siembra de gránulos de tierra en medio sólido *Ashby-Manitol*. B) Se observa crecimiento de hongos después de la incubación.

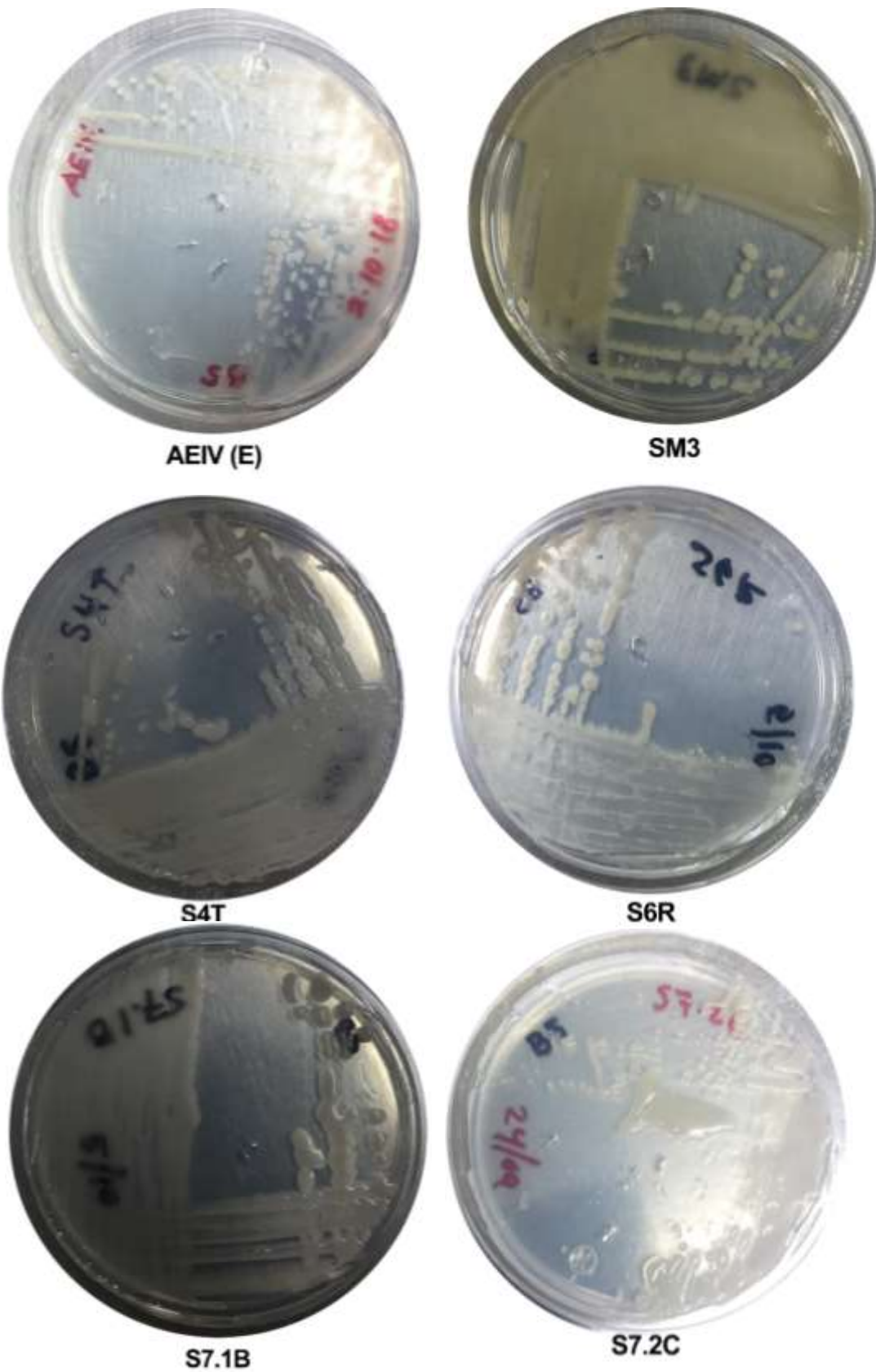


Fig. 10 Fenotipo de los aislados ambientales evidenciando la morfología característica del género *Azotobacter* spp. Se observan colonias aisladas, de cepas hipermucoides, segundo aislamiento crecimiento en medio de cultivo Ashby (ash).

Identificación Molecular de cepas presuntivas del género *Azotobacter* spp.

Para la primera identificación molecular de las siete cepas caracterizadas fenotípicamente (S4T, S7.2 (C), S7.1, 3.5, B+B1, SM3, S6R), se realizó la amplificación de los cuatro genes propuestos como marcadores genéticos para el género *Azotobacter* spp. Estos marcadores genéticos que codifican para; *policétido sintasa tipo III (arsB)*, es un factor sigma y modulador maestro en la regulación de la fase estacionaria (*rpoS*), alginato liasa involucrada en la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii (alyA1)*, y un gen que codifica para proteína principal membrana externa (*OmpA*). Se ocupó como control para todos los marcadores los genes la cepa tipo AEIV E de *A. vinelandii*.

Para todas las cepas aisladas se amplificaron los cuatro marcadores moleculares (Fig.11); sin embargo, para el caso de la cepa SM3 no se logro obtener la amplificación de los genes *oprf*, y *alkyR* (Tabla 7).

Tabla 7. Caracterización molecular con marcadores moleculares y descripción de la morfología colonial de cada cepa

AISLADOS	Genotipo	Fenotipo
S7.1(B)	<i>oprf, rpoS, arsB, alyA1</i>	Colonias irregulares, color blanquecinas, hipermucosas,
S7.2(C)	<i>oprf, rpoS, arsB alyA1</i>	Colonias irregulares, color blanquecinas, hipermucosas,
S3.5	<i>oprf, rpoS, arsB alyA1</i>	Colonias no mucoides
B+B1	<i>oprf, rpoS, arsB alyA1</i>	Colonias irregulares, color blanquecinas, hipermucosas,
S4T	<i>oprf, rpoS, arsB, alyA1</i>	Colonias irregulares, color blanquecinas, hipermucosas,
SM3	<i>oprf, rpoS</i>	Colonias irregulares, color blanquecinas, hipermucosas,
S6R	<i>oprf, rpoS, arsB, alyA1</i>	Colonias irregulares Color blanquecinas hipermucosas

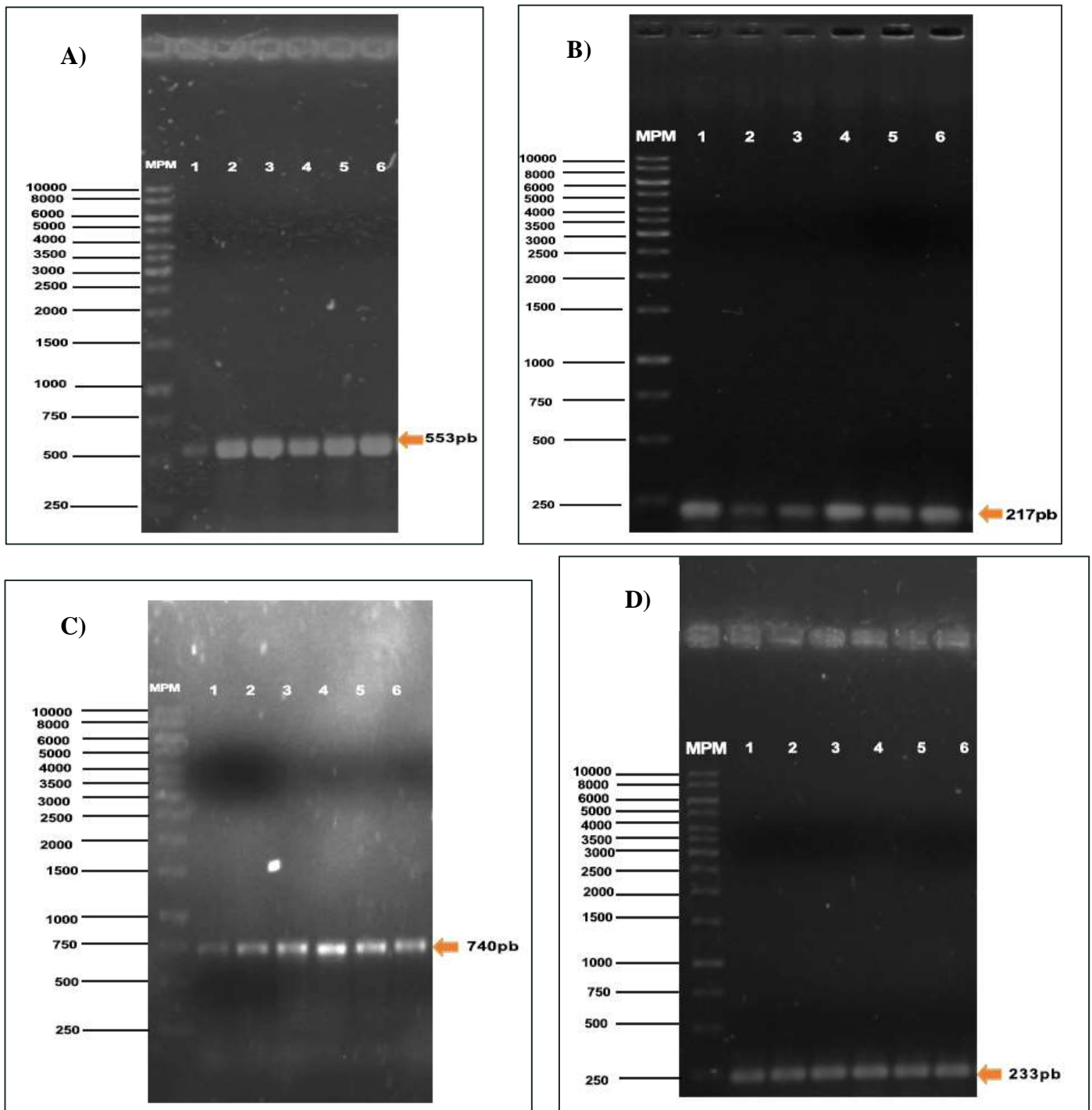


Fig. 11 Electroforesis en gel de agarosa (1%) de Amplificaciones de regiones altamente conservadas de genes en *Azotobacter* spp. a) gen *oprF* b) gen *arsB* c) gen *rpoS* d) gen *alyA1*. En el carril MPM)Se muestra el Marcador de peso molecular GeneRuler (Thermo Fisher scientific®) de 1kb, 1) La cepa control E, 2)S7.1(B), 3)S7.2(C), 4)S3.5, 5) S4T, 6) SM3, 7)S6R. 8)B+B1.

Análisis de secuencias

Para la segunda caracterización molecular, se amplificó el gen ADNr 16S, utilizando los oligonucleótidos fD1 y rD1, cuyo amplificado es un fragmento de 1500 pb, correspondientes al gen ADNr 16S (Fig.12).

Una vez obtenidos los amplificados de cada cepa aislada, se realizó la secuenciación y la comparación con secuencias ya reportadas en la base de datos del NCBI, se realizó un análisis tipo BLAST, obteniendo una alta identidad nucleotídica entre los aislados S7.1(B), S7.2(C), S3.5, B+B1, S4T, con la secuencia del gen ADNr 16S de *A. vinelandii* (>96%) (Tabla 8). Para el caso de los aislados SM3 y S6R se obtuvo una alta indentidad con la especie de *A. chroococcum* (>97%) lo cual se sugiere que estos aislados se corresponden al género de *Azotobacter spp.*

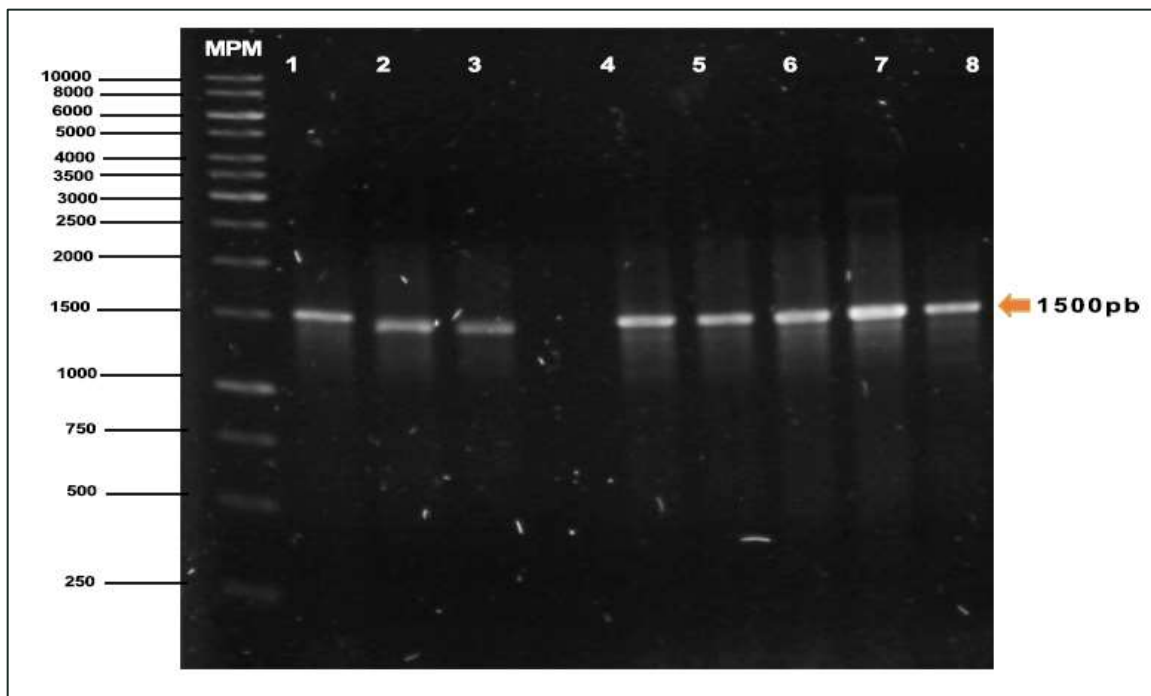


Fig.12 Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los amplificados del gen DNAr 16S de los aislamientos. En el carril MPM)Se muestra el Marcador de peso molecular GeneRuler (Thermo Fisher scientific®) de 1kb, 1) La cepa control E, 2)S7.1(B), 3)S7.2(C), 4)S3.5, 5) S4T, 6) SM3, 7)S6R. 8)B+B1.

Tabla 8. Correspondencia de los aislados según el análisis tipo BLAST reportados en la base de datos del 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea) del NCBI.

AISLADOS	Alineamiento	E value	Identidad nucleotídica (%)	Base de Datos
S7.1(B)	<i>Azotobacter vinelandii</i> strain IAM 15004	0.0	97.87	16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)
S7.2(C)	<i>Azotobacter vinelandii</i> strain IAM 15004	0.0	98.42	16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)
S3.5	<i>Azotobacter vinelandii</i> strain IAM 15004	0.0	96.30	16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)
B+B1	<i>Azotobacter vinelandii</i> strain NBRC 102612	0.0	96.25	16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)
S4T	<i>Azotobacter vinelandii</i> strain NBRC 102612	0.0	97.57	16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)
SM3	<i>Azotobacter chroococcum</i> strain NBRC 102613	0.0	98.24	16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)
S6R	<i>Azotobacter chroococcum</i> strain NBRC 102613	0.0	97.36	RNA sequences (Bacteria and Archaea)

Producción de alginato en aislados de *Azotobacter* spp.

A las cinco cepas aisladas de *A. vinelandii* y las dos cepas de *A. chroococcum* se les evaluó la producción de alginato por triplicado con el método del carbazol.

Los resultados obtenidos de las cuatro cepas aisladas de *vinelandii*, mostraron que éstas producen una cantidad superior del polímero en comparación a la cepa tipo de *A. vinelandii* AEIV (2.5 ± 0.30 de SD *mg alginato por mg proteína*). La producción de cepa S7.2(C) es 19 veces mayor (20.78 ± 0.87 de SD *mg alginato por mg proteína*), el aislado S7.1(B) produjo 15 veces más (16.97 ± 1.25 de SD *mg alginato por mg proteína*) (Fig.14). La cepa B+B1 sintetizó 9 veces más (10.61 *mg alginato/mg proteína*) (Fig.15a), y el aislado S4T superó a la cepa control 9 veces (10.41 ± 1.70 de SD *mg alginato por mg proteína*) (Fig.15b). En contraste la cepa S3.5 produjo (1.37 ± 0.16 de SD *mg alginato por mg proteína*) menor cantidad de alginato que la cepa control AEIV.

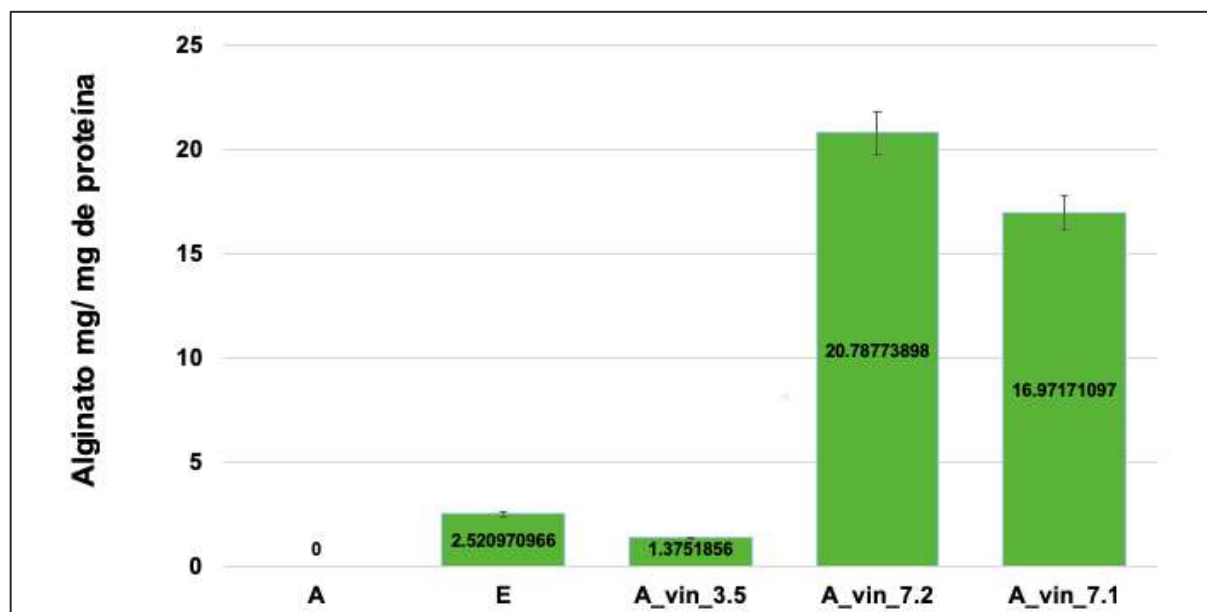
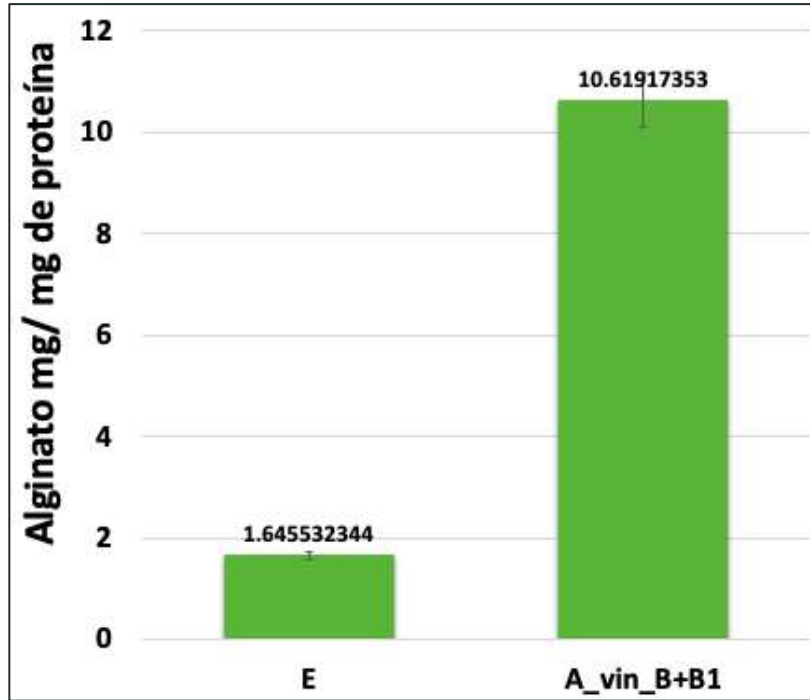


Fig. 14 Cuantificación en la producción del alginato de cepas aisladas de *A. vinelandii*, *A_vin_3.5*, *A_vin_7.2*, *A_vin_7.1* utilizando a AEIV E como control (Medio BS sólido, 48 hrs a 30°).

A



B

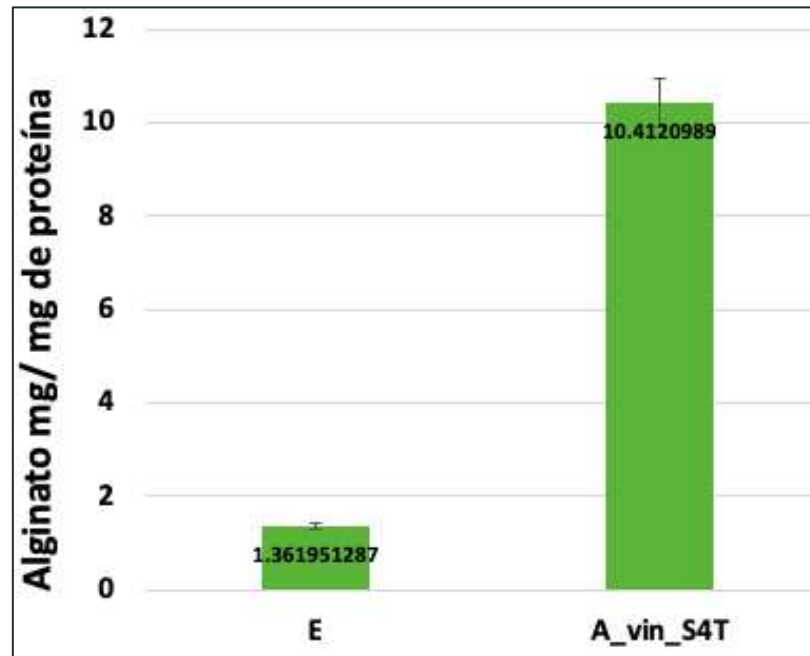


Fig.15 Cuantificación en la producción del alginato de cepas aisladas de *A. vinelandii*, A) *A_vin_B+B1*, B) *A_vin_S4T* utilizando a AEIV E como control (Medio BS sólido, 48 hrs a 30°).

La cuantificación de alginato en las cepas aisladas de *A. chroococcum* mostraron una producción del polímero de 3 veces superior al aislado de SM3 (4.5 ± 1.71 de SD *mg alginato por mg proteína*) en comparación a la cepa control AEIV (1.64 ± 0.38 de SD *mg alginato por mg proteína*) (Fig.16).

En contraste, la cepa aislada S6R presentó una producción similar a la cepa control AEIV (1.34 ± 0.97 de SD *mg alginato por mg proteína* y $1.63 \text{ mg} \pm 0.38$ de SD *alginato por mg proteína*, respectivamente).

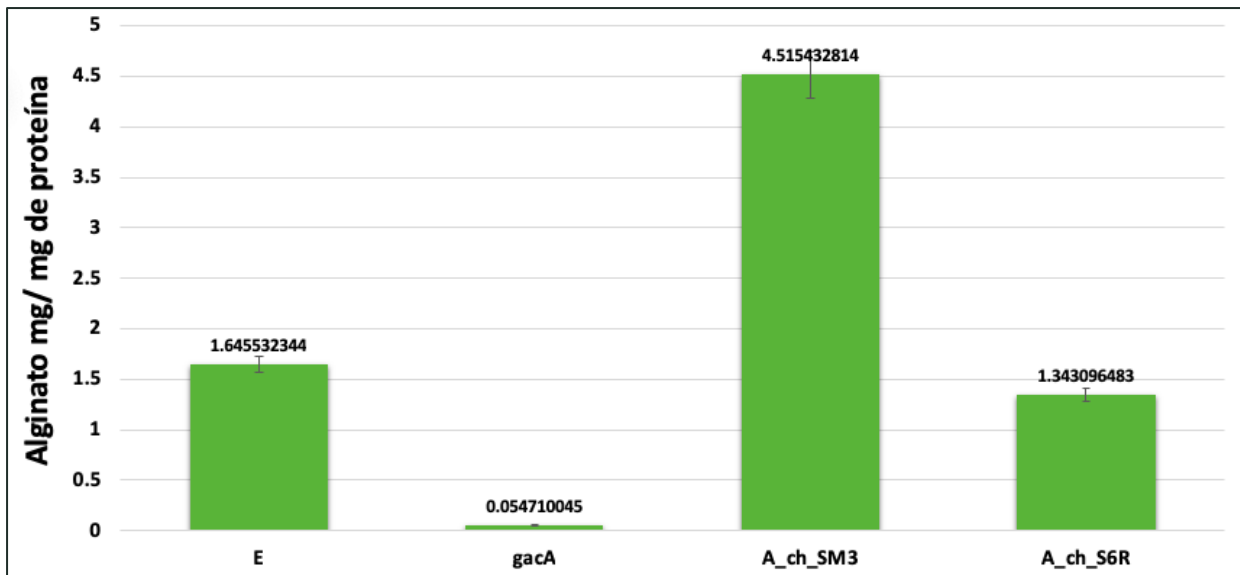


Fig. 16 Cuantificación en la producción del alginato de cepas aisladas de *A. chroococcum*, *A_ch_SM3*, *A_ch_S6R* utilizando a AEIV E como control (Medio BS sólido, 48 hrs a 30°).

Sobreexpresión de los genes *RsmZ1* y *RsmZ6* en clonas de *A. vinelandii*

Se seleccionaron las cepas aisladas S4T, S7.2(C) y S7.1(B) de *A. vinelandii* para llevar a cabo la sobreexpresión de los genes *smZ1* y *smZ6*, el criterio de selección de estas cepas fue su alta capacidad productora de alginato.

Para transformar los aislados, se empleó el vector pUMAgyrAkm y se obtuvieron solo dos recombinantes de la cepa S4T donde se evidenció la sobreexpresión de RsmZ1 Fig.17 y RsmZ6 Fig 18. Las dos recombinantes se verificaron mediante PCR utilizando los oligonucleótidos CrsmB5'-TacR para corroborar la transformación de RsmZ1, y se obtuvo un amplificado de 744-pb (Fig.17 y Fig 18). Para el caso del RsmZ6 se usaron los oligonucleotidos GeD-TacR obteniendo un amplificado de 796 pb Fig 19. El fenotipo de las dos recombinantes obtenidas fue mucoide, al igual que la cepa aislada silvestre (Fig.18).

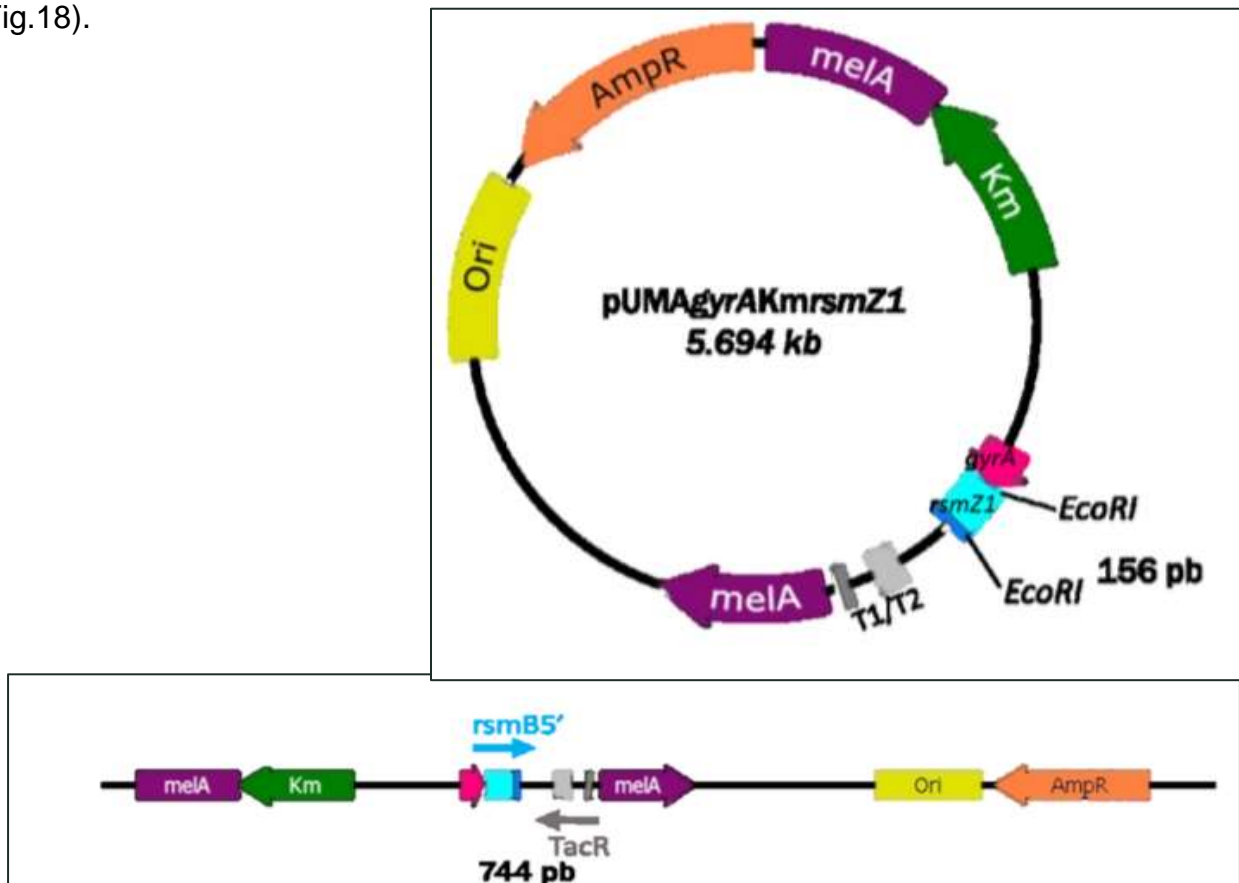


Fig.17 Vector integrativo derivado del pUMgyrAkm que tiene clonado al sRNA *RsmZ1* May Compañ, 2016.

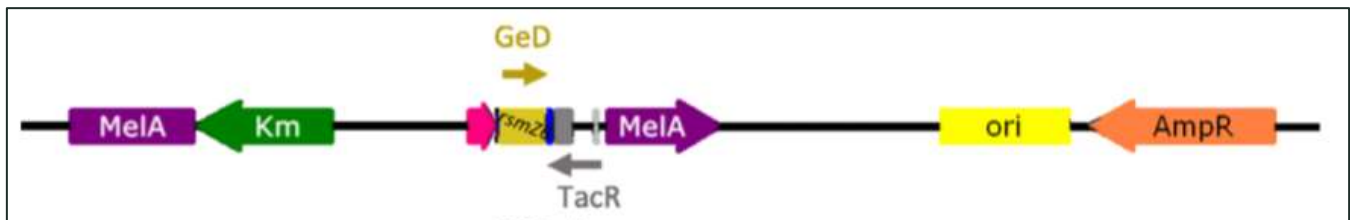
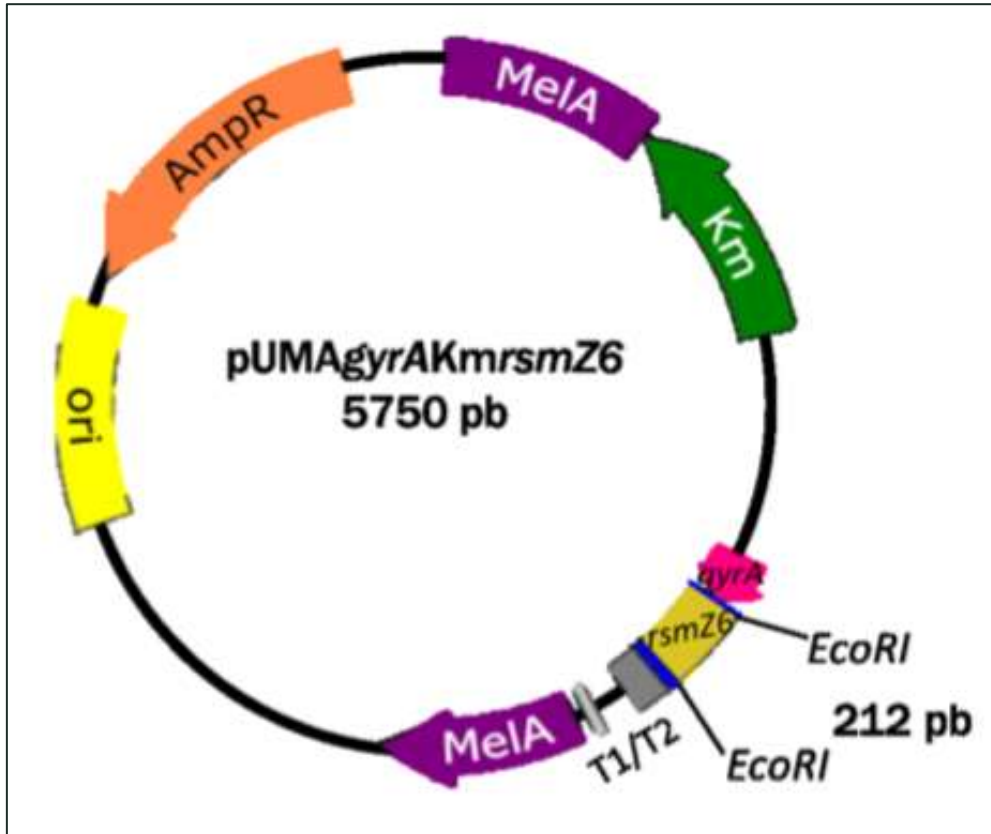


Fig.18 Vector integrativo derivado del pUMgyrAkm que tiene clonado al sRNA RsmZ6. Tomado de May Compañ, 2016.

A)

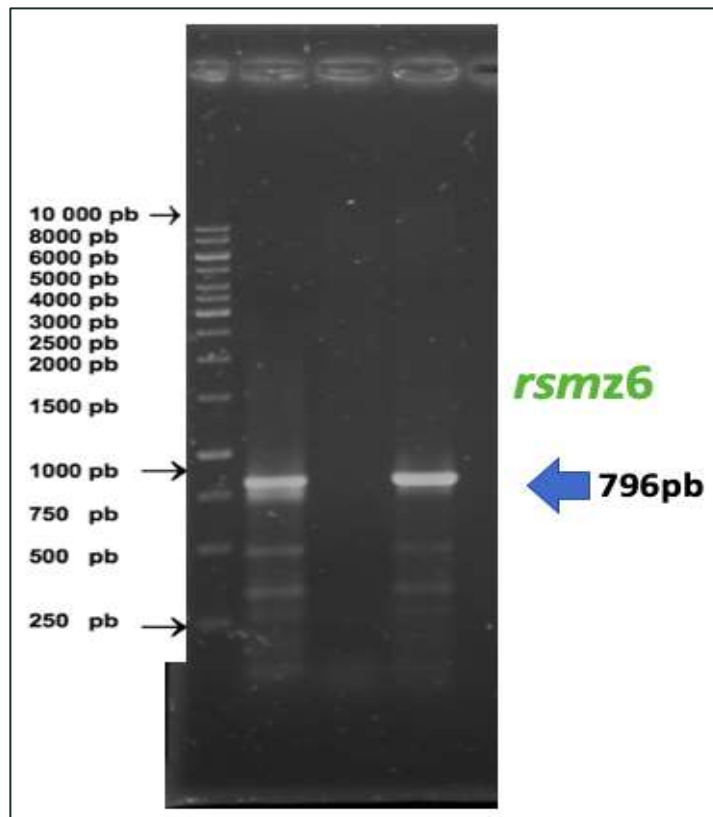
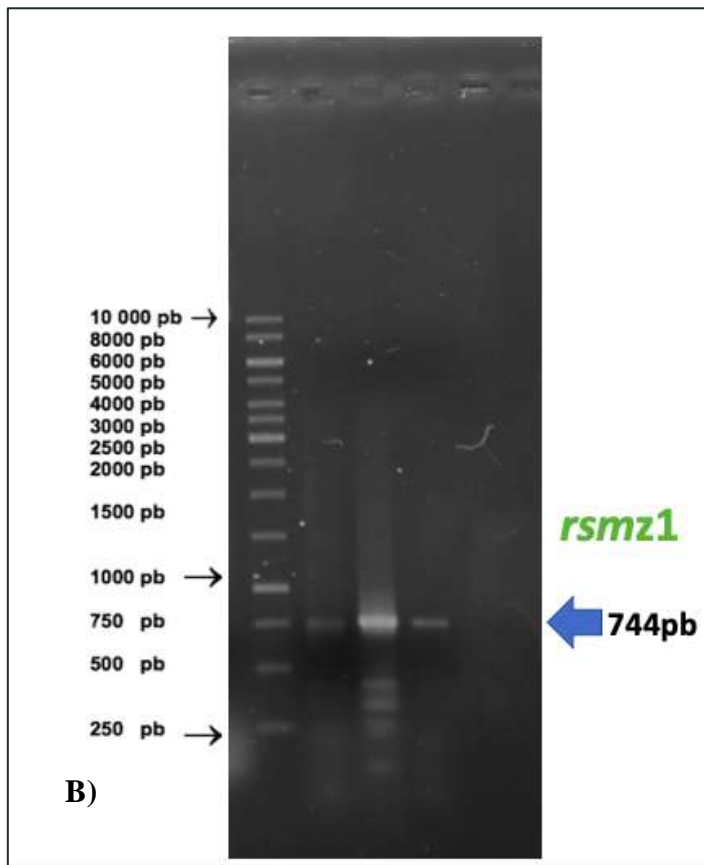


Fig.19 Electroforesis en gel de agarosa (1%). A) Se observa en el 1) primer carril el MPM, 2) amplicación del plasmido integrativo , 3) recombinante S4T_Z1. B). En primer carril MPM, 2) amplicación del plasmido integrativo, 4) recombinante S4T_Z6.

Producción de alginato de las recombinantes de *A. vinelandii*

A las recombinantes se les cuantificó la producción de alginato por triplicado con el método del carbazol, se empleó como control positivo la cepa ATCC 9046 altamente mucoide (productora de alginato) y la cepa AEIV de *A. vinelandii* como control negativo.

En la recombinante S4TZ6 se observó una disminución significativa del 38.13 % en la producción de alginato (6.44 ± 1.41 de SD *mg alginato por mg proteína*) en comparación con la cepa ATCC 9046 (10.59 ± 4.6 de SD *mg alginato por mg proteína*) (Fig.22). Para el caso de la recombinante S4TZ1 la producción de alginato fue similar a la cepa silvestre S4T (11.34 ± 1.48 de SD *mg alginato/mg proteína*) (Fig.20).

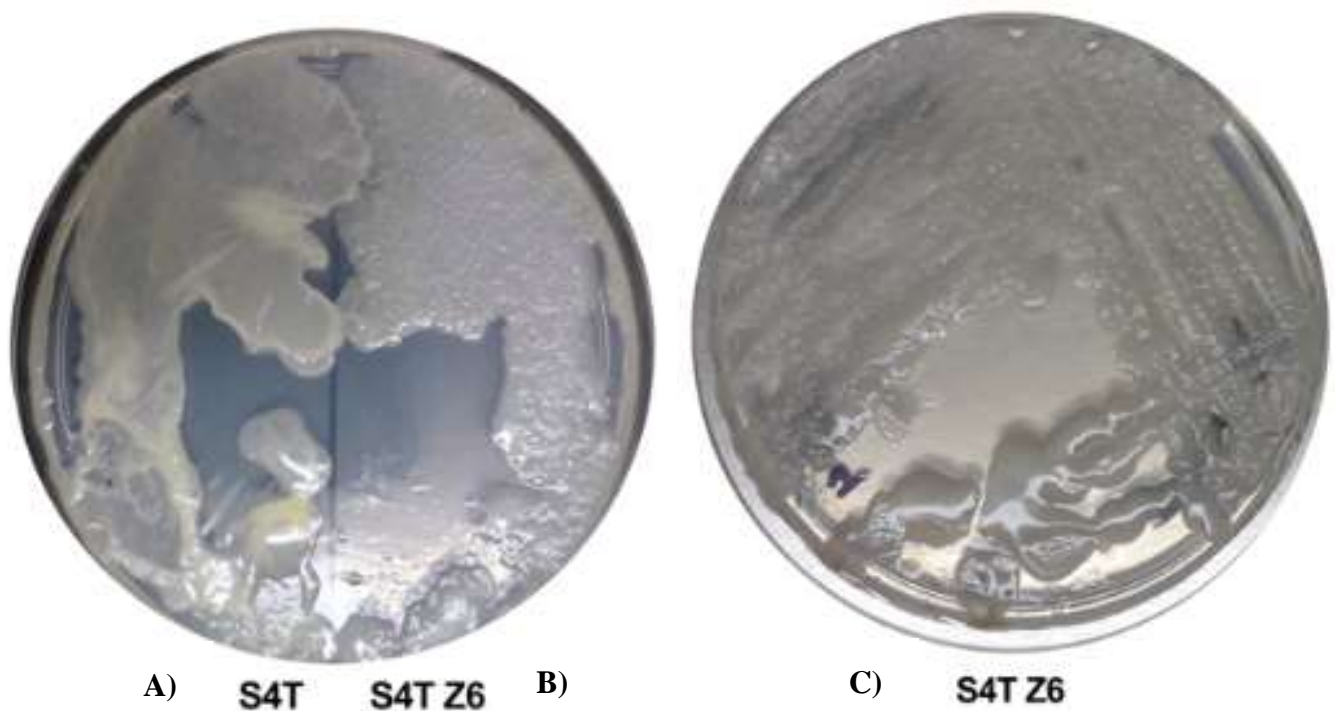


Fig. 19 A) Se observa la morfología colonial de cepa silvestre S4T hipermucoide. B) Morfología colonial de la recombinante S4T_Z6, (Medio BS/KM sólido, 48 hrs a 30°).

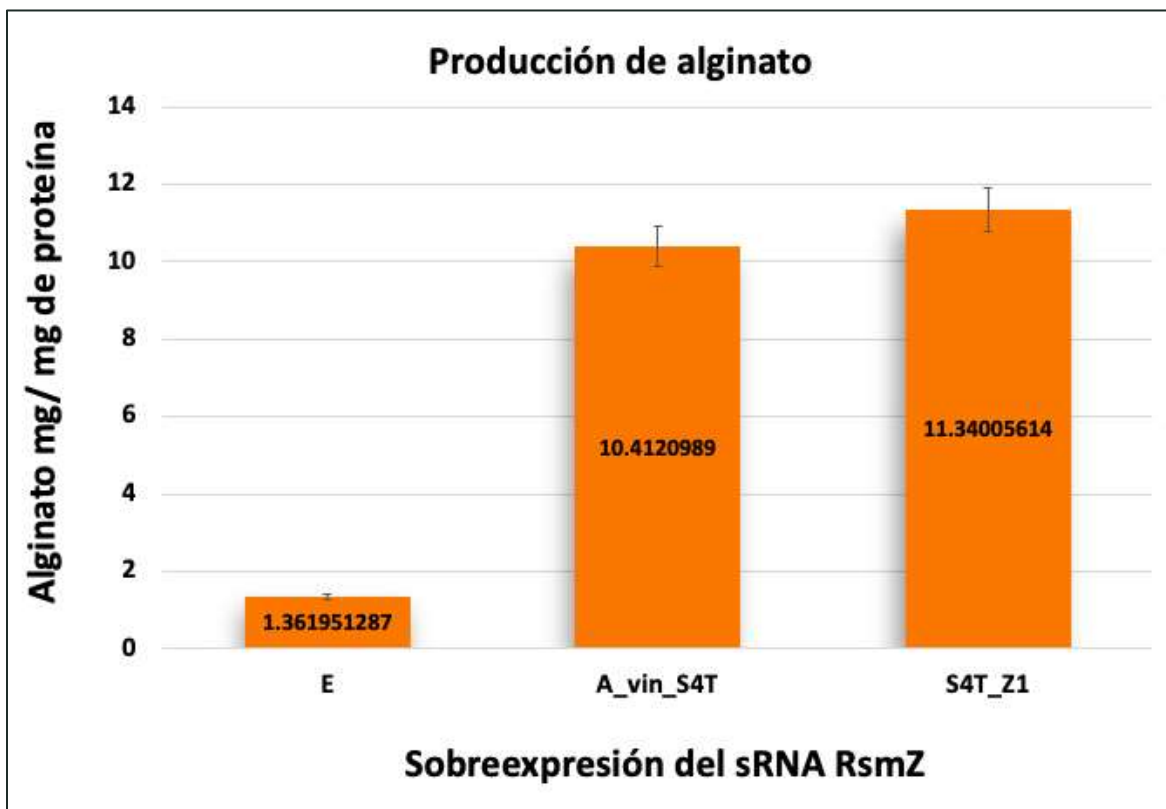


Fig. 20 Cuantificación en la producción del alginato de recombinante S4T_Z1, A_vin_S4T utilizando a AEIV E como control (Medio BS sólido, 48 hrs a 30°C).

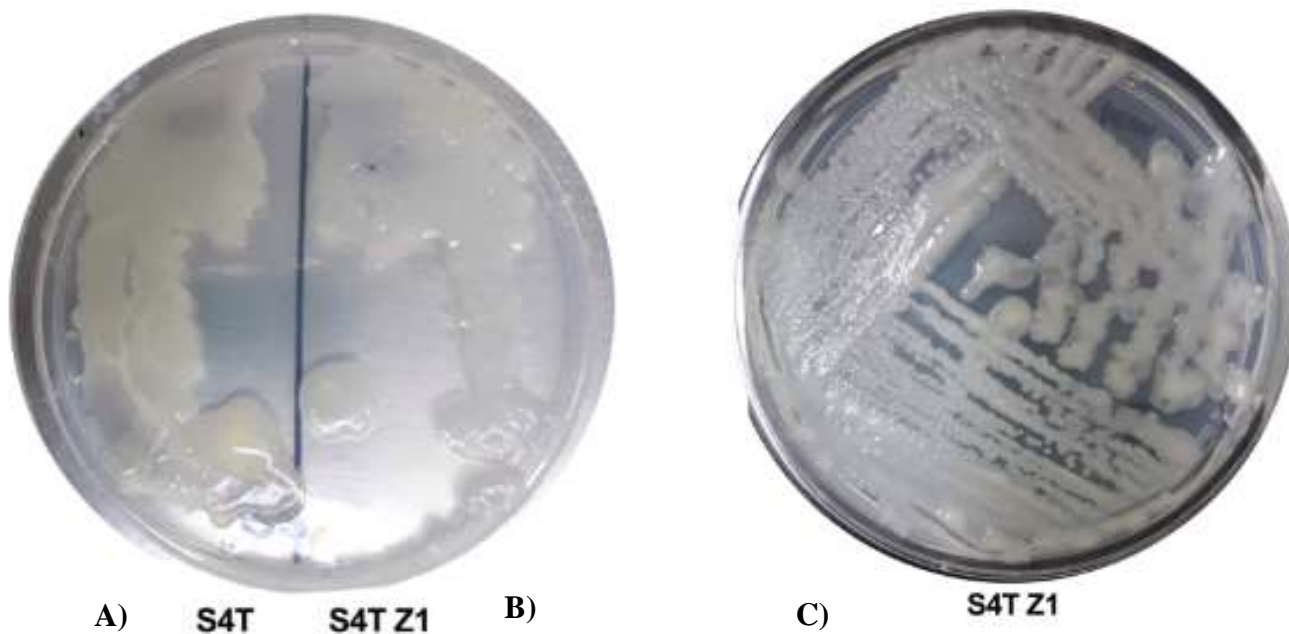


Fig. 21 A) Se observa la morfología colonial de cepa silvestre S4T hipermucoide. B) Morfología colonial de la recombinante S4T_Z1, (Medio BS/KM sólido, 48 hrs a 30°).

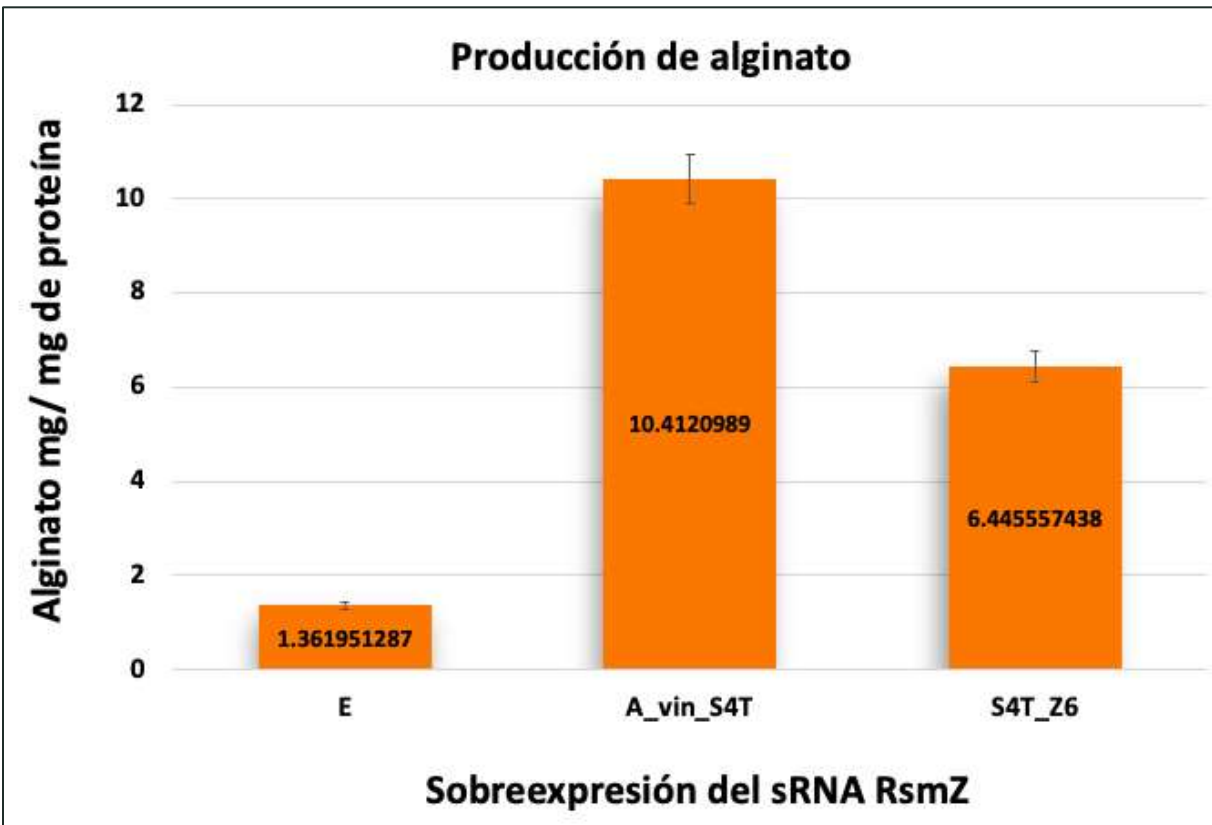


Fig. 22 Cuantificación en la producción del alginato de recombinante S4T_Z6, A_vin_S4T utilizando a AEIV E como control (Medio BS sólido, 48 hrs a 30°C).

IX DISCUSIÓN

De cinco aislados de *Azotobacter spp.* se obtuvo una alta identidad nucleotídica con la secuencia del gen 16S ADNr de *A. vinelandii* y dos cepas con la especie de *A. chroococcum* lo que se sugiere que estas cepas corresponden al género *Azotobacter*. De las cuales cuatro cepas aisladas fueron hiperproductoras de alginato, comparada con la cepa tipo AEIV (E) de *A. vinelandii*. En el estudio de Tejera, 2006, se tomaron muestras de la rizosfera de dos especies de plantas y observaron que las especies bacterianas *Beijerinckia spp.* y *Azotobacter spp.* presentaron mejor asociación con la raíz en lugar de la superficie de las hojas de las plantas, esta característica le proporciona la ventaja de incrementar la posibilidad de explotar diversos sustratos de carbono proporcionado por la planta (Tejera *et al.*, 2006).

En este trabajo de tesis, empleamos el medio de cultivo Ashby con distintas fuentes de carbono para realizar el aislamiento primario y condiciones diazotróficas, esto nos permitió observar la morfología colonial característica de este género y la producción de melanina (pigmentación de color café-negra) en colonias de *A. vinelandii*. El fenotipo encontrado en nuestras cepas se ha reportado cuando el medio de cultivo es adicionado como fuente de carbono benzoato de sodio (Hendrik, 2006).

En este trabajo realizamos dos técnicas de aislamiento descritas por Alquilanti, 2004, que son adecuadas para el aislamiento de cepas presuntivas de *Azotobacter spp.* Esta técnica se fundamenta en la siembra directa de granos de suelos en medio Ashby con manitol-benzoato como fuente de carbono, lo que nos permitió el aislamiento y la identificación de *A. chroococcum*, estas bacterias con el envejecimiento del cultivo se modifican presentando un mayor tamaño y la presencia de un pigmento negro en las colonias. En la segunda técnica se emplearon medios de cultivos sólidos Burk libre de nitrógeno y subcultivos sólidos descrito por Tejera, 2005.

Nuestros resultados del aislamiento bacteriano concuerdan con lo reportado en los caldos de cultivos selectivos modificados Ashby-benzoato de sodio que permitieron una rápida identificación de cepas *Azotobacter spp.* A pesar de que en el suelo de la rizósfera de cultivos de zanahoria predominan otros géneros bacterianos (Gaviria *et al.*, 2017) como *Pseudomonas spp.*, *Agrobacterium spp.*, *Pantoea spp.*, *Klebsiella spp.*, *Achromobacter spp.*, *Gluconacetobacter spp.*, *Enterobacter spp.*; estos géneros

bacterianos han sido descritas como bacterias solubilizadoras de fosfatos y fijadoras de nitrógeno. Con este estudio se confirma la presencia de bacterias de la familia *Pseudomonadaceae* en la rizósfera de las plantas en la cuales se incluyen los géneros *Azotobacter spp.* y *Pseudomonas spp.*

Con las metodologías de aislamiento que se realizaron, se evaluó la morfología colonial y celular que presentaron las siete cepas aisladas, estas características concordaron con el fenotipo descrito para el género *Azotobacter spp.*

A. vinelandii comparte algunas características bioquímicas con el género *Pseudomonas spp.*, sin embargo, *Azotobacter spp.* se caracteriza por su estilo de vida aeróbico, y la formación de quistes. De acuerdo con Ozen y Ussery (2012), se afirma que la diversidad en algunas de sus características fenotípicas podría ser el resultado de sus propiedades de adaptación de los dos géneros, a pesar que comparten algunos genes de mantenimiento, como caso del gen *rpoS*.

En este trabajo se realizó la amplificación de los genes: *algy*, *arsB*, *rpoS* y *oprF*, (de las regiones altamente conservadas para el género *Azotobacter* de los últimos dos genes) en las cepas aisladas que presentaron el fenotipo característico de *Azotobacter sp.*, estos genes ayudaron a confirmar el género de los aislados presuntivos. Con estos resultados podemos sugerir que los genes: *oprF*, *algy*, *rpoS* y *arsB* pueden ser empleados como marcadores moleculares para la identificación del género *Azotobacter sp.*

Por otra parte, Valenzuela-González y colaboradores (2015), describen que el gen 16S ADNr es un poderoso marcador presente en todos los microorganismos conocidos, además de su uso para reconstruir las relaciones filogenéticas entre las diversas especies bacterianas. El tamaño del gen, de aproximadamente 1500 nucleótidos, que minimiza los cambios y presenta regiones altamente conservadas en las diversas especies. Existe una controversia en donde se afirmaba que *A. vinelandii* es una *Pseudomonas* disfrazada, ya que Rediers (2004), demostró que el análisis de secuencias del gen 16S rRNA de *A. vinelandii*, ubicó a esta bacteria en el clado de *P. Aeruginosa* compartiendo el 96% de identidad, sugiriendo que este género en realidad era una *Pseudomonas spp.*

Por otra parte, Ozen y Ussery (2012), analizaron las relaciones evolutivas del género de las *Pseudomonas spp.* con *A. vinelandii*, discutiendo la clasificación de *A. vinelandii*,

usando diferentes métodos genómicos comparativos como el análisis filogenético del gen 16S rDNA. Se realizó el análisis de los genomas y el análisis de las proteínas mediante el algoritmo Blast, permitiendo dilucidar la filogenia de estos dos géneros. Con los genomas de *Acinetobacter spp.*, *Psychrobacter spp.*, *Cellvibrio spp.* *Pseudomonas spp.* y *Azotobacter spp.*, se encontró que todos son integrantes del orden de la Pseudomonales, en cambio *Pseudomonas spp.*, *Azotobacter spp.* y *Cellvibrio spp.* pertenecen a la familia *Pseudomonadaceae*, y efectivamente *Pseudomonas* y *Azotobacter* son dos géneros independientes que pertenecen a la misma familia. Lo anterior concuerda con los análisis realizados a los aislados de *A. vinelandii* de este trabajo.

Campos y colaboradores (1995), cuantificaron la producción de alginato en diferentes cepas tipo de *A. vinelandii*; ATCC 9046 considerada una cepa hipermucoide la cual produce 4.47 mg de alginato por mg de proteína; sin embargo, la cepa no mucoide UW136 produce 0.73 mg de alginato por mg de proteína. En cambio, la cepa AEIV (E) mucoide produce 1.74 mg de alginato por mg de proteína.

Por otra parte, Manzo y colaboradores (2012), cuantificaron la producción de alginato en esta misma cepa tipo AEIV (E) reportando que produjo 1.147 μg alginato por mg proteína; mientras que en las cepas aisladas y caracterizadas de este trabajo de *Azotobacter spp.*: S7.2(C), S7.1(B), B+B1y S4T, se observó una producción del polímero de 10 veces mayor cantidad en comparación a la cepa tipo AEIV (>10.41 mg alginato por mg proteína) es por esto que se consideraron cepas hiperproductoras de alginato.

Para mejorar la producción de alginato se han diseñado estrategias genéticas para la construcción de mutantes de *A. vinelandii* (Galindo et al.,2007); mediante el aumento de la transcripción del gen *algD*; gen clave que codifica para una enzima (GDP-manosa deshidrogenasa), clave para biosíntesis de alginato y el cual está bajo el control del sistema GacS/GacA y los pequeños sRNAs. En este estudio se demuestra que el gen *algD* de *A. vinelandii* está involucrado con la producción de alginato, se obtuvieron mutates *mucA* y *mucABCD*, en estas se observó un aumento de dos y cuatro veces más la transcripción del gen *algD*, cuando esta mutación se transfirió a la cepa AEIV, las mutaciones aumentaron los niveles de producción de alginato hasta seis veces.

Por otra parte, Manzo y colaboradores (2011) hallaron mediante un experimento de Northern que GacA activa directamente la expresión de *rsmZ1* y *rsmZ2* en la cepa AEIV. En este estudio se generaron mutantes simples en *rsmZ1*, *rsmZ2* y una mutante doble. Y se observó que en estas mutantes la producción de alginato es reducida hasta un 80%, sugiriendo que GacA y Rsm son parte de la cascada de señales para la síntesis de alginato.

En este trabajo exploramos la sobreexpresión de los pequeños sRNA RsmZ1 y RsmZ6 en las cepas aisladas hiperproductoras de alginato S4T, S7.2(C) S7.1(B) Todos los aislados fueron transformados con los dos sRNAs; sin embargo, se obtuvieron únicamente cepas recombinantes del aislado S4T. La recombinante S4T_Z1 presentó una producción del polímero análoga en comparación al aislado silvestre S4T, esta tendencia fue similar a lo reportado por May Compañ (2016), donde se sobreexpresó *rsmZ1* en la cepa mutante *A. vinelandii* *EgacA*, esta mutante presentó una producción de alginato de 689.26 $\mu\text{g alginato} / \text{mg proteína}$, análogo a lo obtenido en la cepa silvestre AEIV 641.89 $\mu\text{g alginato por mg proteína}$.

En contraste, la cepa recombinante S4T_Z6 disminuyó un 38.13% la producción del polímero en comparación a la cepa aislada silvestre S4T, tendencia semejante a lo reportado por May Compañ (2016), en la cepa mutante *A. vinelandii* E Z6gacA. Con los resultados generados por May Compañ (2016) se corrobora que RsmZ1 y RsmZ6 presentaron un efecto positivo en la producción de alginato en la cepa E de *A. vinelandii*. Con los resultados generados en este trabajo de tesis sobre la producción de alginato de las cepas transformantes S4T_Z1 y S4T_Z6, sugerimos que los pequeños sRNA RsmZ1 y RsmZ6 están implicados en la regulación de la biosíntesis de alginato en la cepa aislada hiperproductora S4T. En la hipótesis planteada al inicio de este trabajo, esperábamos que al incrementar la expresión de los genes *rsmz1* y *rsmz2*, se bloqueara de forma energética a la proteína represora RsmA, en consecuencia, se incrementaría la biosíntesis del polímero.

Por otra parte, se ha documentado en *Pseudomonas fluorescens*, una interacción altamente específica entre todos los pequeños sRNAs (Duss et al., 2014) formando un multicomplejo entre estos, llamado efecto esponja, para proteger a los sRNAs de la

degradación de la enzima RNAasaE y mantener la función reguladora del sistema RsmZ, probablemente este proceso también ocurra en *Azotobacter spp*S4T Z6.

Para corroborar o declinar lo antes sugerido se requiere realizar diversos estudios moleculares donde se compruebe este primer acercamiento de la regulación de síntesis de alginato en esta cepa aislada S4T de *Azotobacter vinelandii*.

Como lo reportado por López-Pliego y colaboradores 2018, donde documentan que la síntesis de alginato está bajo la regulación de los pequeños *sRNA*: RsmZ1, RsmZ2 y RsmZ4, demuestran que estos *sRNA* ejercen un control positivo en la biosíntesis de este polímero independientemente de la fuente de carbono utilizada (succinato, fructosa, glucosa). También documentaron la existencia de factores adicionales involucrados en la regulación del sistema RsmZ y su impacto en la producción de alginato (López-Pliego et al., 2018).

X CONCLUSIONES

1. El medio de cultivo selectivo fueron eficientes para el aislamiento de *Azotobacter spp.*
2. Los marcadores genéticos fueron efectivos para la identificación preliminar.
3. Las cepas aisladas de *Azotobacter spp.* son sobreproductoras de alginato.
4. La sobreexpresión de los sRNAs; RsmZ1 y RsmZ6 no afecta la producción de alginato en esas condiciones.

XI PERSPECTIVAS

1. Conocer el efecto de la sobreexpresión de los cinco pequeños sRNAs no explorados en este trabajo (*RsmZ2, RsmZ3, RsmZ4, RsmZ5, Rsm7*) pertenecientes al sistema de regulación post-transcripcional Rsm sobre la producción de alginato y PHB.
2. Generar una mutante en el gen *gacA* de la cepa aislada S4T.
3. Conocer la regulación post-transcripcional RsmZ en otros metabolitos secundarios como alquirorsinoles.
4. Realizar estudios en *A. chroococcum* sobre la producción del pigmento melanina y su papel durante la fijación del nitrógeno.

XII BIBLIOGRAFIA

Braccini, I., & Pérez, S. (2001). Molecular Basis of Ca²⁺-Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited. *Biomacromolecules*, 2(4), 1089–1096. <https://doi.org/10.1021/bm010008g>

Farajzadeh, D., Yakhchali, B., Aliasgharzad, N., Sokhandan-Bashir, N., & Farajzadeh, M. (2012). Plant Growth Promoting Characterization of Indigenous Azotobacteria Isolated from Soils in Iran. *Current Microbiology*, 64(4), 397–403. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0083-x>

Gauri, S. S., Mandal, S. M., & Pati, B. R. (2012). Impact of Azotobacter exopolysaccharides on sustainable agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(2), 331–338. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4159-0>

Hay, I. D., Ur Rehman, Z., Ghafoor, A., & Rehm, B. H. A. (2010). Bacterial biosynthesis of alginates. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(6), 752–759. <https://doi.org/10.1002/jctb.2372>

Hay, I. D., Wang, Y., Moradali, M. F., Rehman, Z. U., & Rehm, B. H. A. (2014). Genetics and regulation of bacterial alginate production. *Environmental Microbiology*, 16(10), 2997–3011. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12389>

Kennedy, C., Rudnick, P., MacDonald, M. L., & Melton, T. (2015). Azotobacter. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–33. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01207>

Mazinani, Z., & Asgharzadeh, A. (2014). Genetic diversity of Azotobacter strains isolated from soils by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Cytology and Genetics*, 48(5), 293–301. <https://doi.org/10.3103/s0095452714050041>

Minh Tam, H. (2015). Isolation and Identification of Rhizospheric Bacteria in Sugarcane (*Saccharum* spp. L.) Cultivated on Acrisols and Ferrasols of Dong Nai Province, the Southeast of Vietnam. *American Journal of Life Sciences*, 3(2), 109. <https://doi.org/10.11648/j.ajls.20150302.18>

Noar, J. D., & Bruno-Bárcena, J. M. (2018). Azotobacter vinelandii: the source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology*, 164(4), 421–436. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000643>

Tejera, N., Lluch, C., Martínez-Toledo, M. V., & González-López, J. (2005). Isolation and characterization of Azotobacter and Azospirillum strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and Soil*, 270(1), 223–232. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-1522-7>

Urtuvia, V., Maturana, N., Acevedo, F., Peña, C., & Díaz-Barrera, A. (2017). Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production.

World Journal of Microbiology and Biotechnology, 33(11).
<https://doi.org/10.1007/s11274-017-2363-x>

Valenzuela-Gonzalez, F. (2015). The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*, 41(4), 297–313. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>

Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K., . . . Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), 635–645. <https://doi.org/10.1038>

Krell, T., Lacal, J., Busch, A., Silva-Jiménez, H., Guazzaroni, M., & Ramos, J. L. (2010). Bacterial Sensor Kinases: Diversity in the Recognition of Environmental Signals. *Annual Review of Microbiology*, 64(1), 539–559. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134054>

Setubal, J. C., Dos Santos, P., Goldman, B. S., Ertesvag, H., Espin, G., Rubio, L. M., . . . Wood, D. (2009). Genome Sequence of *Azotobacter vinelandii*, an Obligate Aerobe Specialized To Support Diverse Anaerobic Metabolic Processes. *Journal of Bacteriology*, 191(14), 4534–4545. <https://doi.org/10.1128/jb.00504-09>

Romeo, T., Vakulskas, C. A., & Babitzke, P. (2012). Post-transcriptional regulation on a global scale: form and function of Csr/Rsm systems. *Environmental Microbiology*, 15(2), 313–324. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02794.x>

Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F. H., & Haas, D. (2007). Gac/Rsm signal transduction pathway of γ -proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Molecular Microbiology*, 67(2), 241–253. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06042.x>

Dubey, A. K. (2005). RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction. *RNA*, 11(10), 1579–1587. <https://doi.org/10.1261/rna.2990205>

Manzo, J., Cocotl-Yañez, M., Tzontecomani, T., Martínez, V. M., Bustillos, R., Velásquez, C., . . . Castañeda, M. (2011). Post-Transcriptional Regulation of the Alginate Biosynthetic Gene *algD* by the Gac/Rsm System in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 21(3-4), 147–159. <https://doi.org/10.1159/000334244>

Moll, S., Schneider, D. J., Stodghill, P., Myers, C. R., Cartinhour, S. W., & Filiatrault, M. J. (2010). Construction of an *rsmX* co-variance model and identification of *fiversmXnon-*

coding RNAs in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *RNA Biology*, 7(5), 508–516. <https://doi.org/10.4161/rna.7.5.12687>

Castañeda, M., López-Pliego, L., & Espín, G. (2016). *Azotobacter vinelandii* Small RNAs: Their Roles in the Formation of Cysts. *Cyst and Other Processes. Non-coding RNAs and Inter-kingdom Communication*, 67–82. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39496-1_4

Heeb, S., & Haas, D. (2001). Regulatory Roles of the GacS/GacA Two-Component System in Plant-Associated and Other Gram-Negative Bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(12), 1351–1363. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2001.14.12.1351>

Miranda, A., Peralta, L., Valdés, A., García, M., Sánchez, M., (2008). Diseño de una planta productora de ácido algínico y alginatos a partir de *Azotobacter vinelandii*. *Tecnología, Ciencia, Educación*, 2(23):91-98.

Aquilanti, L., Favilli, F., & Clementi, F. (2004). Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(9), 1475–1483. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.04.024>

Becking, J. H. (2006). The Family Azotobacteraceae. *The Prokaryotes*, 759–783. https://doi.org/10.1007/0-387-30746-x_26

Bodilis, J. (2006). Molecular evolution of the major outer-membrane protein gene (*oprF*) of *Pseudomonas*. *Microbiology*, 152(4), 1075–1088. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28656-0>

Bodilis, J., Hedde, M., Orange, N., & Barray, S. (2006). *OprF* polymorphism as a marker of ecological niche in *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology*, 8(9), 1544–1551. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01045.x>

Campos, M., Martínez-Salazar, J. M., Lloret, L., Moreno, S., Núñez, C., Espín, G., & Soberón-Chávez, G. (1996). Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 178(7), 1793–1799. <https://doi.org/10.1128/jb.178.7.1793-1799.1996>

Cocotl-Yanez, M., Sampieri, A., Moreno, S., Nunez, C., Castaneda, M., Segura, D., & Espin, G. (2011). Roles of RpoS and PsrA in cyst formation and alkylresorcinol synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*, 157(6), 1685–1693. <https://doi.org/10.1099/mic.0.046268-0>

Díaz-Barrera, A., Maturana, N., Pacheco-Leyva, I., Martínez, I., & Altamirano, C. (2017). Different responses in the expression of alginases, alginate polymerase and acetylation genes during alginate production by *Azotobacter vinelandii* under oxygen-controlled

conditions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 44(7), 1041–1051. <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1929-9>

Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D., & Espín, G. (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polydihydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories*, 6(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-7>

Gaviria-Giraldo, J., Restrepo-Franco, G. M., Galeano-Vanegas, N. F., & Hernández-Rodríguez, A. (2018). Bacterias diazotróficas con actividad promotora del crecimiento vegetal en *Daucus carota* L.. *Ciencia y Agricultura*, 15(1), 19–27. <https://doi.org/10.19053/01228420.v15.n1.2018.7753>

Gimmestad, M., Ertesvag, H., Heggeset, T. M. B., Aarstad, O., Svanem, B. I. G., & Valla, S. (2009). Characterization of Three New *Azotobacter vinelandii* Alginate Lyases, One of Which Is Involved in Cyst Germination. *Journal of Bacteriology*, 191(15), 4845–4853. <https://doi.org/10.1128/jb.00455-09>

López-Pliego, L., García-Ramírez, L., Cruz-Gómez, E. A., Domínguez-Ojeda, P., López-Pastrana, A., Fuentes-Ramírez, L. E., . . . Castañeda, M. (2018). Transcriptional Study of the RsmZ-sRNAs and Their Relationship to the Biosynthesis of Alginate and Alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *Molecular Biotechnology*, 60(9), 670–680. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0102-7>

Rediers, H. (2004). *Azotobacter vinelandii*: a *Pseudomonas* in disguise? *Microbiology*, 150(5), 1117–1119. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27096-0>

Romero, Y., Guzmán, J., Moreno, S., Cocotl-Yañez, M., Vences-Guzmán, M. Á., Castañeda, M., . . . Segura, D. (2016). The GacS/A-RsmA Signal Transduction Pathway Controls the Synthesis of Alkylresorcinol Lipids that Replace Membrane Phospholipids during Encystment of *Azotobacter vinelandii* SW136. *PLOS ONE*, 11(4), 153266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153266>

Özen, A. I., & Ussery, D. W. (2011). Defining the *Pseudomonas* Genus: Where Do We Draw the Line with *Azotobacter*? *Microbial Ecology*, 63(2), 239–248. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9914-8>

Gao, R., & Stock, A. M. (2009). Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), 133–154. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073214>

Adaya, L., Millán, M., Peña, C., Jendrossek, D., Espín, G., Tinoco-Valencia, R., . . . Segura, D. (2018). Inactivation of an intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase of *Azotobacter vinelandii* allows to obtain a polymer of uniform high molecular mass.

Applied Microbiology and Biotechnology, 102(6), 2693–2707.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-8806-y>

Hernandez-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castaneda, M., Nunez, C., Muriel-Millan, L. F., & Espin, G. (2012). RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*, 158(Pt_8), 1953–1963. <https://doi.org/10.1099/mic.0.059329-0>

Torres-Rubio, M. G., Valencia-Plata, S. A., Bernal-Castillo, J., & Martínez-Nieto, P. (2000). Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., Producers of Indole-3-Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42, 171–176.

Espín, G. (2008). *Biología de Azotobacter vinelandii*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Rediers, H. (2004). *Azotobacter vinelandii*: a *Pseudomonas* in disguise? *Microbiology*, 150(5), 1117–1119. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27096-0>

Khanafari, A., & Sepahei, A. (2007). Alginate biopolymer production by *Azotobacter chroococcum* from whey degradation. *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 4, 427–432.

XII ANEXOS

Genes que se encuentran en genoma de *A. vinelandii* DJ

***arsB* (Policétido sintasa tipo III)**

GTCCCCGACGCCGTTCTTGATGCAGTAGGCCGCGGGCGAAGGCATAGGCCGGACAGCTCCAGGGTCAG
CGCCTGGGGAACGGGTTTGGCCAGTTGCACGGGTGTGAAGCCGGTGAGAACTGCGTTGTGGGGAC
TGCTCATGATGTTTCCTCCTTGATGAGCGGTTGCCTCTACAGCGATCCCGCGCGCACCGGCCGCGGG
AAAAACCTCAACCGTGGGCCGT

***AlyA1* (Familia 7 de Polisacárido liasa)**

CATCGGCGTTGCGAACAAACCACTTCGACTCATATGTTTGAAGTTGTCTGGTCTGAATGATCATGGC
CCCAACGGGTATAGTGAGATTCCAAGTGTGAAAGATCGATCACTTCACGACTCCTGAGTACGACAGGT
TTTCATGATGGCATTATTTATACTAAAAAGCCATCAATTAGCCACTATCCATCCATGAAGTAATGAAGCC
GATCAGCAGTTCACACAGCCGTGCACCGAGC

***RpoS* (Factor sigma de RNA polimera)**

CGATCGTCGGTCAGCACGTCGAGCAGGGTCTTGTCGGAATCCGGACCCAGCGAGACATCGACCGA
GGTGACCCGCTCGTTGAGTCCGAGCATGCGCTTGACCTCGGCGACCCGGTTTTTCCAGCAGGTTGGC
GATCTCTTCCGCCGAAGGCTCGTGATCGAGCTTCTGGGTGAGTTCACGCGCCGCCGTTAGATAGAC
ATTGAGCTCCTTGACCACATGGATCGGCAGACGAATGGTGCGGGTCTGGTTCATGATGGCCCGCTC
GATGGTCTGGCGAATCCACCAGGTGGCGTAGGTGAGAAACGGAAGCCGCGTTCCGGATCGAACTT
CTCCAAGTCCCGGATCAGGCCTAGATTCCCCTCCTCGATCAGATCGAGCAGCGACAGGCCCGGTT
GACATAGCGGCGGGCGATCTTGACCACCAGTTCGAGGTTGCTTTCGATCATCCGCTTGCGGCCAGC
CGGGTCTCCCCGCTGCGCCAGCCGCGCGAAATGCACTTCCCTCCGCTGGTGTGAGCAGCGGCGAGA
AGCCGATTTGTTGAGGTAGAGCTGGGTGCGATCCAGCGCCCTAGTGTAGTCGATGTACTTGTGCT
GCTTCAGGTTGCGCTGCCTGGACTTCGCGACGGGGAGGTCCGGCTCATCGTCCAGGACATCCTCCA
GCACGATGTCGGCGTCCATCAGGAGCACATCATCGTCTACATCAAACCTCCGGCGCTTCTTTTGTCTT
TATATTGAGAGCCAT

***Oprf* (Familia de proteínas principal membrana externa OmpA)**

CAAGCACTGGTTCAGCGATGAGAGTTCGCGCGACTTCGAAAACGATGAAGCCGAACTCTATGGTGC
ATCGATCGGTTATTTTTGACCGATGATGTGGAGCTGGTCTTGTCGCATGGCGTTTACAGGGACGTC
ACTACCGATGAGCCGATTGGCGACGGCGGGCACAAGGACATCAAGGGTGAAGTACCTCCATCGAT
GCCCTCTACTTCCGGCAGCCCGGCGCAGGCCTTCGTCCCTACGTTTCCGGCGGCTTCGCCAC
CAGAGCATCGGCCAGGCCCGTGGCGGCCGTAACAACAGCACCCCTGGCCAACGTCGGCGCCGGTCT
GAAGTACTACTTCACCGACATGCTTTACGCCCGGGCCGGTCTCGAAGGCATGTACAACCTTCGACGAT
GATCAGACCGACTGGCAGGCTGGCGTGGGTATCGGTCTGAACTTCGGTGGCAGCGGCGGGAAGCA
GCAACCCGTTGCGGAGCCGGTTGCCGAGGTCTGTGCCGACGTCGACAACGATGGCGTCTGCGACA
ATGTCGACCCGCTGCCCGGATACTCCC