



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
PUEBLA**



**INSTITUTO DE CIENCIAS (ICUAP)  
POSGRADO EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

**Complementación de la mutante  $\Delta hkhB$  de *Azospirillum  
baldaniorum* Sp245.**

**TESIS**

**Que para obtener el grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

**CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

**PRESENTA:**

**Q.C. Juan de Jesús Sánchez González**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**D.C. Alberto Ramírez Mata**

**CO-DIRECTORA DE TESIS:**

**D.C. Beatriz Eugenia Baca**

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a mi asesor el D.C. Alberto Ramírez Mata y a mi co-asesora la D.C. Beatriz Eugenia Baca por brindarme parte de sus conocimientos y por todo el apoyo ofrecido durante el transcurso del posgrado, también a los integrantes del Laboratorio de Interacción Bacteria-Planta que fueron de gran apoyo durante mi estadía y a la Maestra en Literatura Mexicana Adriana Victoria Arcos Méndez quien me apoyo en la corrección de estilo de este trabajo. Hago extenso mi agradecimiento al comité revisor conformado por la D.C. Sandra Reyes Carmona, el D.C. Miguel Castañeda Lucio, la D.C. Lucia Soto Urzua y el D.C. Candelario Vazquez Cruz, además del recurso humano que conforma el ICUAP de Microbiología. Agradecer especialmente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la realización de este proyecto.

## **Dedicatoria**

Este trabajo se lo dedico principalmente a mi madre María González Espinosa, a mi padre Nicolás Sánchez González y al resto de mi familia que siempre estuvieron al pendiente de mí en este proceso y también a mi amada hija Marian Sánchez Luna, que fue el principal motor que me impulso a llegar a la meta de este objetivo.



**BUAP**

Puebla, Pue. a 2 de junio 2023.

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

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría del alumno **Juan de Jesùs Sánchez Gonzàlez**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

**“Complementación de la mutante *ΔhkhB* de *Azospirillum baldaniorum* SP245”**

A nuestro juicio, el alumno **Juan de Jesùs Sánchez Gonzàlez** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.  
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”

**D.C. Lucía Soto Urzúa**

**D.C. Sandra R. Reyes Carmona**



**D.C. Miguel Castañeda Lucio**

**D.C. Candelario Vázquez Cruz**

Posgrado en Ciencias Microbiológicas  
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,  
Ciudad Universitaria  
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570  
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522  
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

Índice	
1	Resumen..... 7
2	Introducción..... 8
3	Marco Teórico ..... 9
3.1	La rizósfera y su microbioma ..... 9
3.2	Participación de <i>Azospirillum</i> en agricultura sustentable. .... 10
3.2.1	Características particulares de <i>Azospirillum</i> ..... 11
3.2.2	Propiedades promotoras del crecimiento vegetal ..... 11
3.2.3	Producción de biopelículas y colonización de raíces de plantas ..... 12
3.3	Sistemas de dos componentes (TCS) ..... 12
3.3.1	Vías de los sistemas de señalización ..... 14
3.3.2	Dominios de las cinasas histidinas ..... 16
3.3.3	Reguladores de respuesta..... 16
4	Antecedentes ..... 17
4.1	Generales ..... 17
4.2	Directos..... 17
5	Hipótesis ..... 22
6	Justificación..... 22
7	Objetivos ..... 23
7.1	General ..... 23
7.2	Particulares ..... 23
8	Materiales y métodos ..... 24
8.1	Análisis bioinformáticos del gen <i>hkhB</i> ..... 24
8.2	Diseño de oligonucleótidos ..... 24
8.3	Materiales biológicos ..... 25
8.4	PCR para el amplificado del gen <i>hkhB</i> ..... 26

8.5	Construcción del plásmido pJBhkhB.....	26
8.6	Secuenciación del fragmento correspondiente al gen <i>hkhB</i> .....	27
8.7	Obtención de la cepa complementada <i>A. baldaniorum</i> C5.56 pJBhkhB28	
8.8	Obtención de la cepa control <i>A. baldaniorum</i> C5.56 pJB3Tc20.....	28
8.9	Ensayos fenotípicos .....	28
8.9.1	Curvas de crecimiento .....	28
8.9.2	Formación de biopelícula.....	29
9	Resultados .....	30
9.1	Análisis bioinformáticos del gen "AZOBR_p310006" ( <i>hkhB</i> ).....	30
9.2	Diseño de oligonucleótidos .....	30
9.3	Construcción del plásmido pJBhkhB.....	33
9.4	Liberación del gen <i>hkhB</i> por ensayos de restricción enzimática.....	34
9.5	Subclonación en el plásmido pJB3Tc20 .....	35
9.6	Secuenciación del fragmento correspondiente al gen <i>hkhB</i> .....	36
9.7	Obtención de la cepa complementada <i>A. baldaniorum</i> C5.56 pJBhkhB37	
9.8	Obtención de la cepa <i>A. baldaniorum</i> C5.56-pJB3Tc20 .....	38
9.9	Ensayos fenotípicos .....	39
9.9.1	Curvas de crecimiento .....	39
9.9.2	Formación de biopelícula.....	40
10	Discusión .....	45
11	Conclusión.....	48
12	Perspectivas .....	48
13	Bibliografía.....	49
14	Anexos .....	54
14.1	Anexo 1. Medio LB (Luria Berthani) .....	54

14.2	Anexo 2. Protocolo de restricción para liberar el gen <i>hkhB</i> .....	54
14.3	Anexo 3. Medio mínimo K-lactato .....	54
14.4	Anexo 4. Medio NFB (C/N=2) .....	55
14.5	Anexo 5. Buffer fosfato (BF) 66 mM estéril .....	56
14.6	Anexo 6. Reguladores Transcripcionales.....	56
14.7	Anexo 7. Condiciones de PCR con los oligonucleótidos M13Fwd y RpJB3T.....	57
14.8	Anexo 8. Tinción con cristal violeta de la cepa C5.56. ....	57

## 1 RESUMEN

El género *Azospirillum* tiene un ciclo de vida complejo, ya que cuenta con la capacidad de adaptarse a distintos ambientes. Dentro de los mecanismos que regulan la transición entre sus ciclos de vida, se encuentran los sistemas de dos componentes (TCS) conformados por cinasas histidínicas y reguladores de respuesta. Algunos reguladores de respuesta activados por cinasas histidinas son capaces de sintetizar y degradar el di-GMPc, el cual tiene un papel importante como segundo mensajero para activar o reprimir la transcripción de genes, que se encuentran involucrados en la movilidad, formación de biopelícula y ciclo celular.

Este trabajo de investigación es la continuación de proyectos que demostraron la existencia de la cinasa histidna híbrida HkhB codificada dentro de un grupo de genes organizados en la misma dirección de transcripción y con espacios intergénicos cortos. Este grupo de cinco genes codifica para dos cinasas histidínicas híbridas no ortodoxas (HkhB y HkhC), un regulador de respuesta del tipo di-guanilato ciclasa (CdgE), un regulador de respuesta del tipo CheY y un regulador transcripcional del tipo LuxO/FIS.

Después de realizar la complementación de la cepa *A. baldaniorum* C5.56 que presentaba la eliminación del gen *hkhB*, se llevó a cabo la evaluación de los fenotipos de crecimiento y formación de biopelícula. En el análisis cuantitativo de la formación de biopelícula se observaron dos tipos de biopelícula; en la interfase solido-líquido y otra, en la interfase líquido-aire.

Los resultados de este fenotipo no mostraron cambios estadísticamente significativos, pero se evidenció que la cepa que alberga la mutación por eliminación de la cinasa histidínica HkhB forma una película más densa bajo las condiciones establecidas en este trabajo. Este resultado podría sugerir que la cinasa histidínica HkhB está involucrada en la regulación de formación de biopelícula en la interfase líquido-aire al detectar concentraciones de oxígeno y/o regular procesos de movilidad en la bacteria.

## 2 INTRODUCCIÓN

Las plantas modulan la arquitectura de su sistema radicular para absorber nutrimentos y agua del suelo, este proceso se ve influenciado por los microorganismos que junto con los cambios en el suelo desencadenan importantes ajustes funcionales en la planta, como su crecimiento y generación de frutos. Esta interacción dinámica entre raíz-suelo-microbioma crea propiedades emergentes que impactan en la nutrición y salud de las plantas, la cual se lleva a cabo en la rizósfera, entorno biofísico y biogeoquímico único formado por la evolución de las plantas que posee rasgos abióticos (acidez, osmolaridad, humedad, etcétera) que determinan la selección de los microorganismos que ayuden a potenciar el desarrollo y crecimiento de las plantas (de la Fuente Cantó et al., 2020).

Las interacciones beneficiosas entre las raíces y los microbios son variadas; por ejemplo, aquella simbiosis mutualista originada por la planta y los microorganismos fijadores de nitrógeno (diazótrofos). A este tipo de microorganismos se les conoce como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (por sus siglas en inglés, PGPB). Dentro de las especies bacterianas que desempeñan el papel de PGPB se encuentra *Azospirillum*; este microorganismo coloniza principalmente la superficie de la raíz. Estudios de inoculación demuestran que se localiza a lo largo del sistema radicular y se concentra en la zona de elongación, las puntas de las raíces y en la base y puntas de los pelos radiculares (Viruega-Góngora et al., 2020). Las especies mejor caracterizadas son *A. brasilense* Sp245 (ahora reclasificado como *A. baldaniorum* Sp245) y *A. brasilense* Sp7, portadores de varios genes involucrados en la síntesis de diversas proteínas para la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos, la producción de hormonas y/o sideróforos (Puente et al., 2009), el control de fitopatógenos (Bashan & de-Bashan, 2010) y la protección frente al estrés abiótico que incluye sequía, salinidad o compuestos tóxicos.

Muchos de los procesos antes mencionados involucran los sistemas de señalización que posee *Azospirillum*, los cuales están orquestados principalmente por sistemas de dos componentes (TCS, por sus siglas en inglés: *Two Component System*) para detectar fluctuaciones tanto en condiciones físicas como químicas del entorno, lo que frecuentemente produce cambios en la expresión génica que aumentan las posibilidades de adaptación y que pueden estar implicados en la regulación de muchos comportamientos bacterianos importantes, incluyendo el metabolismo, la movilidad, la quimiotaxis, la formación de biopelícula y la respuesta al estrés (Borland et al., 2015).

### **3 MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 La rizósfera y su microbioma**

Los microorganismos del suelo que viven en la rizósfera de la planta, junto con los cambios en las propiedades del suelo desencadenan importantes ajustes funcionales en la planta, como la modificación del desarrollo y la fisiología de la raíz. Las interacciones beneficiosas entre las raíces y los microorganismos son variadas; desde simbióticas, hasta patógenas, y son fundamentales para la nutrición de las plantas. Respecto de las asociaciones simbióticas entre las plantas y los microorganismos fijadores de nitrógeno, estas se caracterizan por transformar el nitrógeno atmosférico a una forma de nitrógeno reducido (amonio) para ponerlo a disposición de la planta, mientras que la planta proporciona dicarboxilatos (L-Malato, succinato, fumarato): compuestos que el microorganismo utiliza como fuente de energía y carbono (de la Fuente Cantó et al., 2020).

La interacción entre la planta y los microorganismos presentes en la rizósfera podría contribuir al desarrollo de variedades de cultivos más resilientes y a la optimización de las prácticas agrícolas (Pedraza et al., 2020).

Los microorganismos que colonizan la raíz inducen cambios profundos en los metabolomas y transcriptomas sistémicos de las plantas, influyendo en su desarrollo, crecimiento y producción de frutos, si fuese el caso. Algunas

actividades microbianas en la rizósfera son beneficiosas para las plantas. Sin embargo, los cambios inducidos por la planta (sobre el potencial redox del suelo, el pH, la agregación, el agua o la disponibilidad de nutrientes) en la rizósfera provocan importantes modificaciones de las condiciones abióticas del suelo. Las funciones nutrimentales más estudiadas que realizan los microorganismos de la rizósfera son la solubilización de fosfato, la mineralización de fósforo orgánico y la producción de sideróforos. Otros mecanismos microbianos modulan la nutrición de las plantas indirectamente, mediante la producción de fitohormonas y otras señales que estimulan la ramificación lateral de la raíz y el crecimiento de los pelos radiculares, maximizando la capacidad de exploración y estructuración del suelo. Los microorganismos que albergan estas funciones beneficiosas se conocen como promotores del crecimiento de las plantas (PGP), y algunas especies cultivables se utilizan como biofertilizantes (de la Fuente Cantó et al., 2020).

### **3.2 Participación de *Azospirillum* en agricultura sustentable.**

En nuestros días, es conveniente abordar la producción agrícola desde un punto de vista tecnológico y sustentable, que permita detener el uso irracional de recursos naturales. En este sentido, el abordaje de la agroecología es presentado como una alternativa para la sustentabilidad ecológica, seguridad alimentaria, viabilidad económica, conservación de recursos y aumento de la producción en equidad social. De forma general, la agroecología se sustenta por dos pilares: la mejora de la biodiversidad y el fortalecimiento de las regulaciones biológicas (Pedraza et al., 2020).

Al llevar a cabo prácticas agroecológicas, se puede observar un alto impacto en la producción y sustentabilidad de los sistemas ecológicos debido al uso de productos que contienen diferentes microorganismos viables como los biofertilizantes, entre los que destacan aquellos que contienen bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), los hongos micorrízicos arbusculares y los rizobios fijadores de nitrógeno (Malusá et al., 2012).

Dentro de las especies bacterianas que desempeñan el papel de PGPB se encuentra *Azospirillum*, que se utiliza como biofertilizante en la inducción de tolerancia al estrés abiótico, en la biorremediación, en la biofortificación y como agente de biocontrol (Pedraza et al., 2020).

### **3.2.1 Características particulares de *Azospirillum***

*Azospirillum* es una bacteria que utiliza como fuente de carbono los ácidos tricarbónicos, pero se han descrito especies que también utilizan azúcares y alditoles. Debido a su versatilidad para metabolizar dichas fuentes de carbono y por ser un excelente fijador de nitrógeno de vida libre, puede adaptarse muy bien a diferentes tipos de suelos y competir por la colonización de la rizósfera; en algunos casos, puede colonizar los tejidos internos de las plantas. Las cepas mejor caracterizadas son *A. baldaniorum* Sp245 y *A. brasilense* Sp7, portadores de varios *loci* involucrados en la producción de diferentes polisacáridos superficiales, en motilidad y síntesis flagelar (Pedraza et al., 2020).

### **3.2.2 Propiedades promotoras del crecimiento vegetal**

Los mecanismos que utiliza *Azospirillum* para el crecimiento de las plantas pueden ocurrir de manera indirecta o directa. Un ejemplo de un mecanismo directo es la fijación de nitrógeno, este proceso tiene como resultado la generación de amoníaco ( $\text{NH}_4^+$ ), que le servirá a la planta para producir diferentes biomoléculas nitrogenadas como clorofila, aminoácidos, ATP y ácidos nucleicos (Pedraza et al., 2020).

*Azospirillum* tiene un papel importante en la síntesis de hormonas y otros compuestos, como poliaminas y aminoácidos. Las citocininas, las auxinas, el ácido indol-3-acético (IAA) y las giberelinas son algunas de las hormonas sintetizadas *in vivo* por *Azospirillum*. Se ha demostrado que estas hormonas están involucradas en el aumento del desarrollo y mejoran la arquitectura de las raíces; por tanto, la planta puede obtener una mejor absorción de minerales y agua (Spaepen et al., 2014).

La síntesis del IAA por *Azospirillum* tiene efecto sobre otros compuestos sintetizados por la planta como el etileno, que en altas concentraciones puede conducir a la inhibición de su crecimiento o incluso a la muerte; para la regulación del etileno se comprobó que *Azospirillum* produce la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa (Pedraza et al., 2020), la cual hidroliza el ACC, precursor biosintético inmediato del etileno en los tejidos vegetales, a amoníaco y  $\alpha$ -cetobutirato. Como resultado de la interacción IAA y ACC-desaminasa, los niveles de etileno disminuyen para facilitar la elongación de las raíces y fomentando el crecimiento de la planta cuando la planta se encuentra bajo condiciones de estrés (Etesami et al., 2014).

### **3.2.3 Producción de biopelículas y colonización de raíces de plantas**

*Azospirillum* coloniza principalmente la superficie de la raíz. Estudios de inoculación demuestran que se localiza a lo largo del sistema radicular y se concentra en la zona de elongación, las puntas de las raíces, la base y las puntas de los pelos radiculares (Viruega-Góngora et al., 2020).

La formación de biopelículas es un rasgo importante que le permite a la bacteria aumentar su capacidad para adherirse, colonizar y tolerar el estrés ambiental, ya que las biopelículas les proporcionan protección. El monofosfato de di-guanilato cíclico (c-di-GMP) es un regulador clave en la transición entre los estilos de vida planctónico bacteriano y sésil (biopelícula). Esta molécula es biosintetizada por diguanilato ciclasas (DGC) y degradada por enzimas fosfodiesterasas (PDE); numerosos genes que codifican estas proteínas se encuentran en genomas de *Azospirillum* Spp (Mata et al., 2018).

### **3.3 Sistemas de dos componentes (TCS)**

Los sistemas de dos componentes (TCS) son uno de los principales sistemas usados por las bacterias para detectar fluctuaciones tanto en condiciones físicas como químicas del entorno bacteriano, lo que frecuentemente produce cambios en la expresión génica que aumentan las posibilidades de adaptación al nuevo entorno, implicadas en la regulación de muchos comportamientos bacterianos

importantes, incluyendo metabolismo, virulencia, esporulación, resistencia a antibióticos, formación de biopelícula y respuesta al estrés (Borland et al., 2015).

Los sistemas de dos componentes en su estructura convencional (clase I) están formados por dos proteínas:

1. Cinasa histidina, conformada por:
  - a) Módulo de entrada: Puede albergar dominios de detención de señales extracelulares e intracelulares.
  - b) Módulo transmisor: Alberga un dominio DHp que presenta un residuo conservado de histidina (H) y dominio catalítico (caja N, G, F, G2) que presenta un complejo de aminoácidos que unen ATP usando  $Mg^{+2}$  como cofactor (Gao & Stock, 2009).
2. Regulador de respuesta, conformado por:
  - a) Modulo receptor: Que alberga un residuo conservado de aspartato (D).
  - b) Modulo efector: Que alberga dominios que pueden unirse al ADN o al ARN, tener actividad enzimática o regular procesos a través de la interacción proteína-proteína (Figura 1).

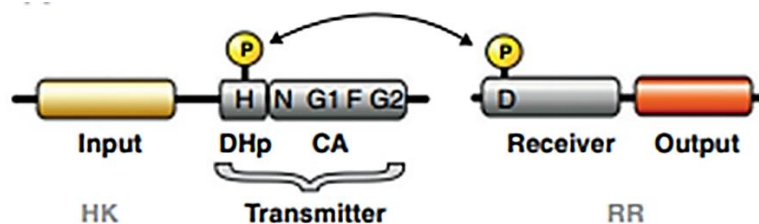


Figura 1. Estructura de un sistema de dos componentes canónico. La primera proteína que lo constituye es una cinasa histidínica (HK) conformada por un módulo de entrada y un módulo transmisor que alberga un dominio de fosfotransferencia histidínico (DHp) unido a un dominio catalítico (CA). La segunda proteína es un regulador de respuesta (RR) con un dominio receptor que alberga un residuo de aspartato conservado y un dominio efector o de salida. Figura obtenida y editada de Jung et al., 2012.

Sin embargo, dentro de las cinasas histidínicas, es posible encontrar aquellas conformadas de forma híbrida, con un dominio receptor (REC) unido al dominio catalítico y un dominio de histidina fosfotransferasa (Hpt) para llevar a cabo un proceso conocido como fosforrelevo. El dominio Hpt, cuando no se encuentra

unido a la cinasa histidínica híbrida, podría estar de forma soluble en el citoplasma (Figura 2).

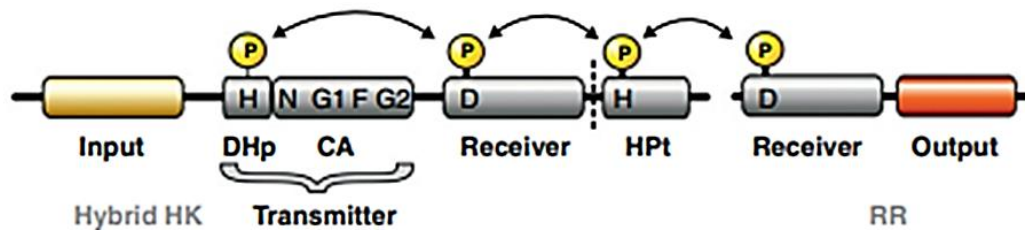


Figura 2. Cinasa histidínica híbrida. Conformada por los módulos y dominios ya descritos de una cinasa histidínica canónica (Figura 1) más un dominio REC (Receiver) y un Hpt. Figura obtenida y editada de Jung et al., 2012.

Se observa que, en estas dos conformaciones los reguladores de respuesta conservan su forma estructural con un dominio de receptor y un dominio de salida o efector. Sin embargo, la activación de la cinasa histidínica no solo está regulada por la captación de señalización del entorno, sino también por algunas “proteínas accesorias” (co-sensoras) que pudieran estar ancladas en la membrana externa, en el espacio periplásmico o bien en la membrana interna (Jung et al., 2012)

### 3.3.1 Vías de los sistemas de señalización

El reconocimiento de señales ambientales y regulación homeostática son propiedades de vital importancia para que los organismos sobrevivan. La intervención de un sistema de señalización es crucial para que las células reconozcan el ambiente en donde se encuentran, identifiquen alteraciones intracelulares y puedan dar respuesta o solución a dichas señales. El estudio de estos sistemas ha permitido diseñar nuevas vías sintéticas para aplicaciones biotecnológicas (Buschiazzo & Trajtenberg, 2019) (Figura 3).

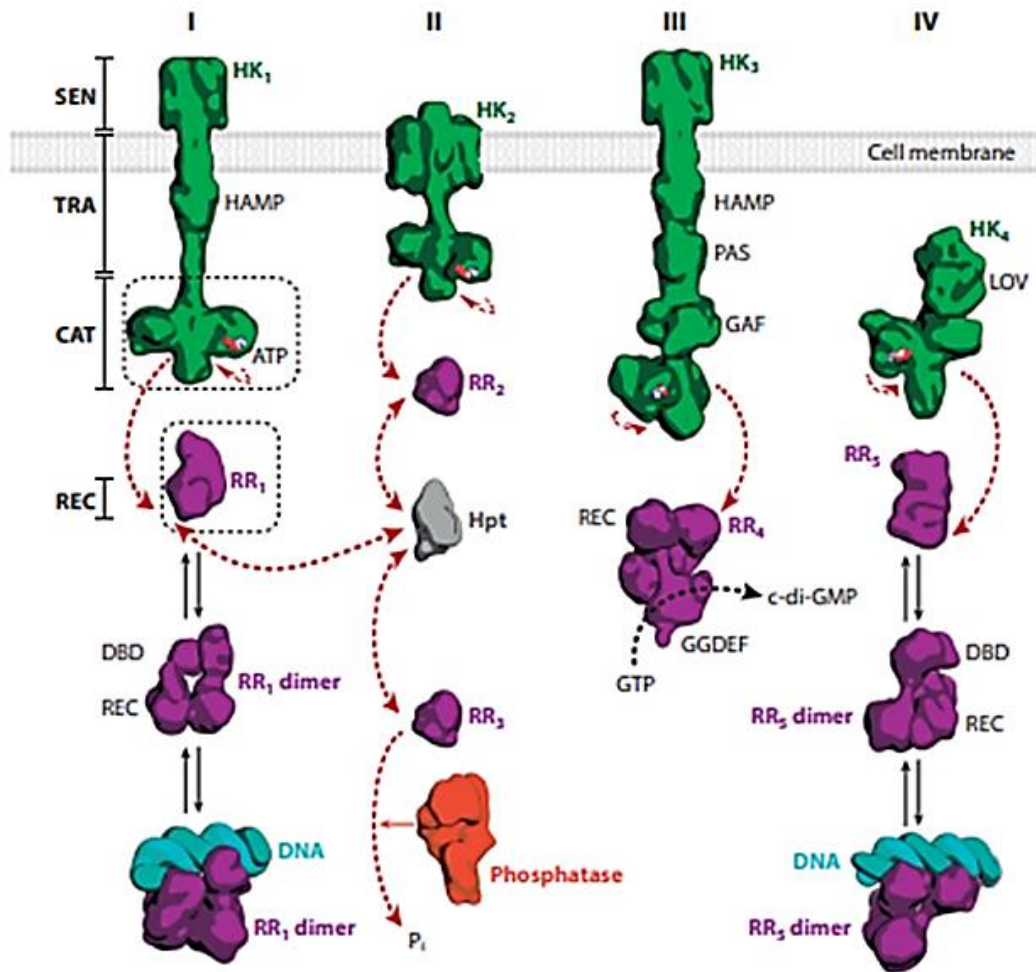


Figura 3. Arquitecturas moleculares de vías TCS comunes. Vía I: un HK prototípico: RR que activa un HK transmembrana. Vía II: una fosfotransferencia de una cinasa histidina con dominio REC y Hpt intervinientes. Vía III: una arquitectura HK más compleja con un módulo de transmisión más largo. Vía IV: implica una HK soluble. Las superficies moleculares respetan las escalas adecuadas (los modelos se construyeron a partir de coordenadas atómicas experimentales). Se indican la estructura/módulos funcionales (SEN, TRA, CAT, REC). Se distinguen diferentes tipos de cinasas histidinas (HK1-4) y reguladores de respuesta (RR1-5). Los dominios recurrentes están etiquetados (HAMP, PAS, etc.). Las fosfatasas dedicadas pueden desfosforilar RR específicos (p. Ej., Vía II); sin embargo, con mayor frecuencia, la HK análoga actúa como fosfatasa cuando la vía está apagada (no se muestra, para mayor claridad). Tomado de (Buschiazzo & Trajtenberg, 2019)

La interacción de los sistemas de señalización suele estar dirigida por componentes de naturaleza proteica que son capaces de transmitir información a sitios y destinatarios específicos mediante:

- a) Reordenamientos estructurales regulados alostéricamente.
- b) Modificaciones postraduccionales, asegurando que los reordenamientos alostéricos no sean de corta duración.
- c) Proteína-proteína y proteína-unión al ADN.

### 3.3.2 Dominios de las cinasas histidinas

La estructura de las HKs está conformada por un módulo de entrada, un módulo de transmisión o transducción (TRA) y un módulo catalítico (CAT).

El módulo de entrada suele estar conformado por uno o más dominios sensoriales; por ejemplo, los HAMP (cinasa histidínica, adenilil ciclasa, proteína aceptora de metilos de quimiotaxis y fosfatasa), PAS (de las proteínas Per-Arnt-Sim) o GAF (fosfodiesterasas específicas de cGMP, adenilil ciclasas y FhIA), entre otros.

El módulo CAT, estructuralmente, es el núcleo presente, al menos, en todos las HK de clase I y está conformado por dos dominios:

- a) Dominio de dimerización DHp: dentro de este dominio se llevará a cabo la fosforilación en la caja H que contiene la histidina conservada.
- b) Dominio de fosfotransferencia (ABD): dentro de este dominio es posible encontrar motivos conservados (cajas N-, G1-, F-, G2- y G3-), los cuales son acoplamiento de aminoácidos unidos por complejos ATP-Mg<sup>+2</sup>.
- c) En la mayoría de los casos, las HKs son bifuncionales; de tal manera que, cuando no se estimulan para autofosforilarse, pueden actuar como fosfatasas para su RR afín (Capra & Laub, 2012).

Se han descrito otras HKs, llamadas HKs híbridas, que tienen una organización más elaborada: contienen dominios adicionales; estos pueden ser un dominio REC (D1) o Hpt también llamado H2. Estas cinasas utilizan un esquema de fosforilación de varios pasos, denominado fosforrelevo. En este tipo de HKs, la fosforilación ocurre del dominio H1 al dominio D1 y finalmente al dominio H2 (Buschiazzo & Trajtenberg, 2019). Sin embargo, algunas cinasas histidínicas también pueden albergar múltiples dominios sensores como PAS, HAMP, GAF, etc. Los cuales van a modificar las respuestas tanto de la cinasa y en consecuencia del RR. (Figura 3).

### 3.3.3 Reguladores de respuesta

Los reguladores de respuesta contienen un dominio REC que alberga el residuo conservado de aspartato susceptible de fosforilación. Se han descrito diversos

tipos de dominios de unión al ADN, de unión a ligandos, de unión a proteínas, con funciones enzimáticas, entre otros. La activación del RR está asociada con su fosforilación, misma que desencadenará una respuesta efectora de salida (Buschiazzo & Trajtenberg, 2019) (Figura 3).

## **4 ANTECEDENTES**

### **4.1 Generales**

En el género *Azospirillum* se encuentra un gran número de genes que codifican para TCS y, de igual forma, un número mayor de cinasas histidínicas híbridas (HyHKs), en comparación con otros géneros bacterianos con tamaño de genoma similar (Borland et al., 2015). El 33% de las cinasas histidínicas (HK) en *A. baldaniorum* presentan múltiples dominios de transmisión y de recepción, lo cual indica un fosforrelevo complejo para cada vía en la que se encuentran involucradas dichas HK. La mayoría de las HyHKs acumulan múltiples dominios para la percepción de señales, lo cual permitiría a una sola HK estar involucrada en más de una vía de señalización (Borland et al., 2015).

### **4.2 Directos**

Existen TCS que integran reguladores de respuesta del tipo di-guanilato ciclasa o fosfodiesterasas. En un análisis para determinar la participación de una di-guanilato ciclasa con dominios GGDEF de *A. baldaniorum* Sp245 codificada en el gen *cdgE* (AWJ93128.1), se realizó una mutación por inserción (*A. baldaniorum* 5A *cdgE::uidA-KmR*, isogénica de la cepa Sp245), la cual presentó un retraso en el crecimiento y, por lo tanto, un incremento en el tiempo de generación de la mutante de 147 min, en comparación con la cepa silvestre (*A. baldaniorum* Sp245), que fue de 51 min (Figura 4). También, al realizar pruebas de estrés osmótico, la cepa mutada fue más sensible que la cepa silvestre (Figura 5) (Gamboa-Peréz, 2014).

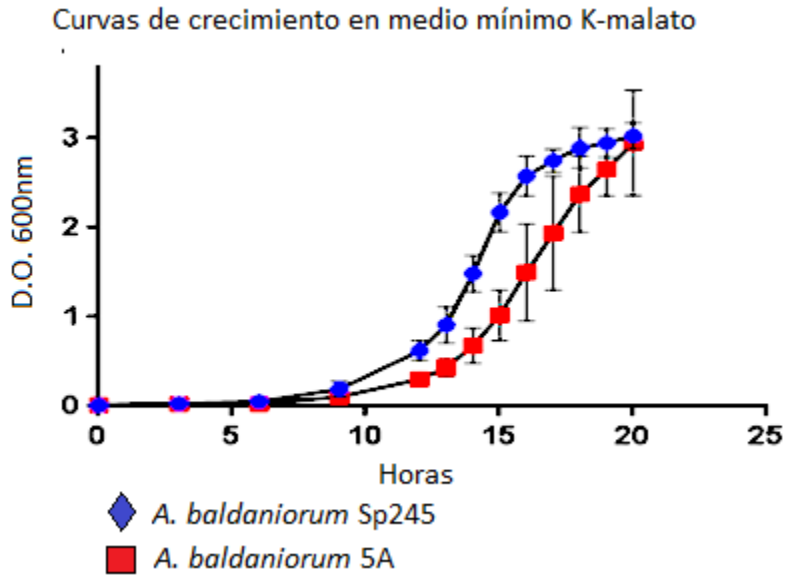


Figura 4. Curva de crecimiento de las cepas: *A. baldaniorum* 5A (*dgcE::uidA-kmR*) y *A. baldaniorum* Sp245. Los datos presentados son resultado de tres experimentos independientes y se muestra la desviación estándar. Grafico obtenido y editado de (Gamboa-Peréz, 2014).

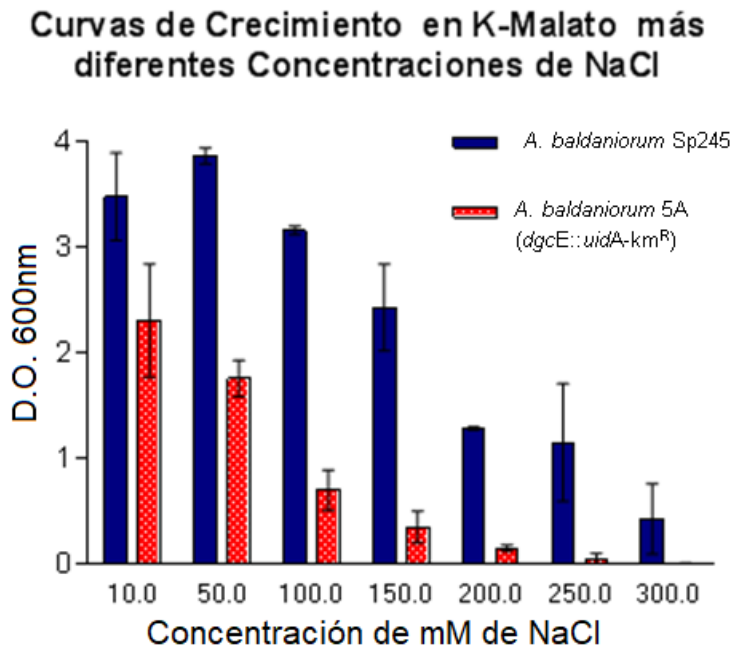


Figura 5. Crecimiento de la mutante *A. baldaniorum* 5A (*dgcE::uidA-kmR*) en comparación con la cepa silvestre en medio K-Malato con diferentes concentración de NaCl. Los datos presentados son resultado de mediciones de densidad óptica a 600 nm de dos experimentos independientes y se muestra la desviación estándar. Grafico obtenido y editado de (Gamboa-Peréz, 2014).

Se exploró la ubicación del gen *cdgE* en el genoma de la cepa *A. baldaniorum* Sp245, y se observó que había cuatro genes río abajo, en la misma dirección de

transcripción; de los cuales uno codifica para una proteína de señalización tipo cinasa histidínica híbrida (HyHKB) (AWJ93129.1), seguido de un gen que codifica para un regulador de respuesta tipo CheY (RR CheY-Like) (AWJ93130.1), continuando con un segundo regulador de respuesta con función de factor transcripcional, que probablemente es dependiente de  $\sigma$ -54 (LuxO-like) (AWJ93131.1), y finalizando con un gen para una cinasa histidínica híbrida (HyHKB) (AWJ93132.1) (Figura 6).

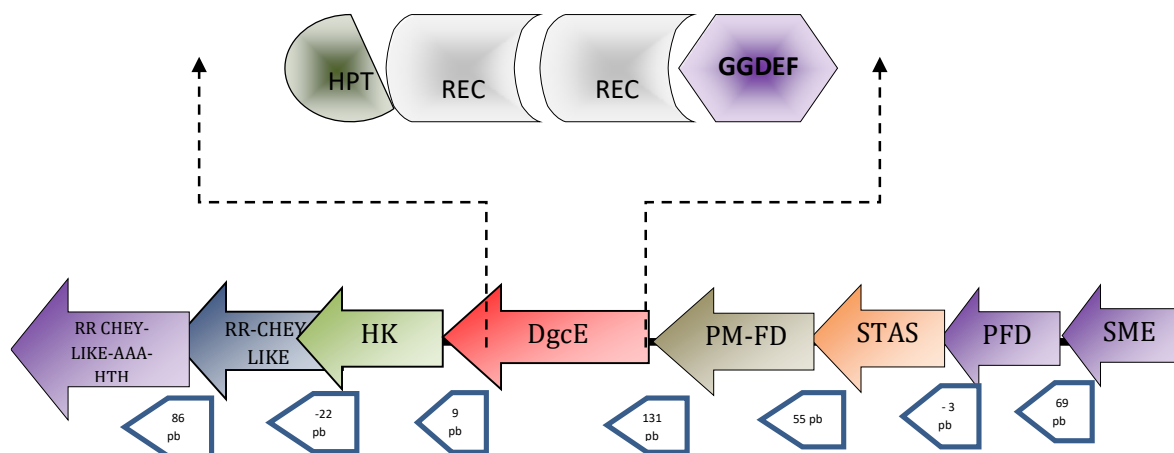


Figura 6. Mapa físico de *dgcE*, Proteína de 557 a.a. de longitud. Contiene 4 dominios proteicos, incluyendo GGDEF implicado en la síntesis del di-GMP cíclico. Se ubica en el plásmido 3 en AZOBR\_p310007. Se indica el contexto genético río arriba, Regulador de respuesta tipo CHEY LIKE (RR CHEY-LIKE-AAA-HTH) Regulador de respuesta tipo CHEY LIKE (RR-CHEY-LIKE), Quinasa histidínica y río abajo proteína de membrana con función desconocida, STAS: anti-sigma\_factor, proteína de función desconocida, Proteína de síntesis de membrana externa. Figura obtenida de (Gamboa-Peréz, 2014).

Para continuar con el estudio, se realizó una mutación en donde se eliminó el gen *cdgE* (*A. baldaniorum* Sp245  $\Delta$ *cdgE* [7U-3]), realizando ensayos de curvas de crecimiento en medio mínimo K-malato se observó que no existía diferencia significativa de la mutante 7U-3, respecto a la cepa silvestre (*A. baldaniorum* Sp245), con ello se concluyó que la cepa generada por Gamboa-Peréz presentaba un efecto polar impidiendo la expresión de genes que se encuentran río abajo (Ávalos Rangel, 2015).

Considerando la disposición de los genes, se atribuyó el fenotipo a un posible efecto polar por la inserción de un gen de resistencia para la obtención de la mutante 5A afectando el marco de lectura del gen río abajo *hkhB*, el cual codifica

para una cinasa histidina hibrida (HhkB). Realizando la eliminación del gen *hkhB* (*A. baldaniorum* C5.56 ( $\Delta hkhB$ )), Cordero-Rivera observó que la mutante no presenta afectación del crecimiento en medio mínimo K-malato y tampoco bajo estrés osmótico, pero sí presenta una reducción en la movilidad al igual que las mutantes antes reportadas por Gamboa-Pérez y Avalo-Rangel (Cordero Rivera, 2017) (Figura 7).

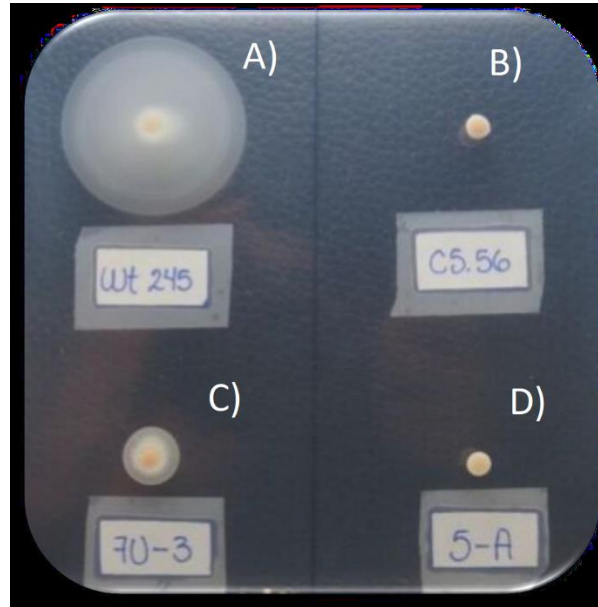


Figura 7. Halos de crecimiento presentados en ensayos de movilidad. Se observan las cepas utilizadas *A. brasilense* Sp245 (WT), *A. brasilense* C5.56 ( $\Delta hskB$ ), *A. brasilense* 7U-3 ( $\Delta dgcE$ ) y *A. brasilense* 5-A (*dgcE:gusA:Km*). Figura obtenida de (Cordero Rivera, 2017)

Posterior a los resultados obtenidos, Cosme-Herrera (2020) realizó la mutación por eliminación del gen *luxO*, de la que obtuvo la cepa *A. baldaniorum* YH57 ( $\Delta luxO$ ).

Realizando ensayos de formación de biopelícula utilizando como medio de cultivo NFB+KNO<sub>3</sub> con las mutantes obtenidas *A. baldaniorum* 5A (*cdgE::gusA-KmR*) (Gamboa-Peréz, 2014), *A. baldaniorum* YH57 ( $\Delta luxO$ ), *A. baldaniorum* 7U-3 ( $\Delta cdgE$ ) (Ávalos Rangel, 2015), *A. baldaniorum* C5.56 ( $\Delta hkhB$ ) (Cordero Rivera, 2017) y la cepa silvestre *A. baldaniorum* Sp245, Cosme-Herrera observó que las cepas 5A y YH57 presentaban un aumento del 127.5% y 53.2%, respectivamente, en comparación con la cepa silvestre *A. baldaniorum* Sp245, mientras que las

mutantes 7U-3 y C5.56 mostraban una disminución del 65.6% y 51.8%, respectivamente, en la formación de biopelícula (Figura 8).

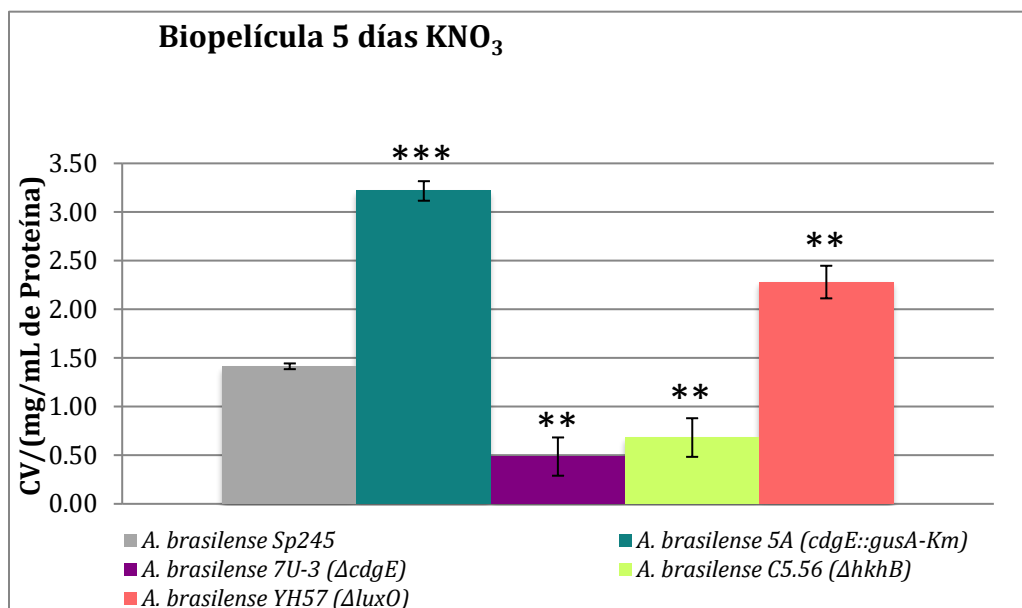


Figura 8. Comparación de la producción de biopelícula por cepas de *Azospirillum* en medio NFB adicionado de  $KNO_3$ . Grafica de los promedios obtenidos de tres experimentos independientes con 3 réplicas cada uno. \*significancia  $p > .05$ , \*\* $p > 0.01$  y \*\*\* $p > 0.001$  analizada por t-Student (Cosme-Herrera, 2020).

## 5 HIPÓTESIS

La complementación de la mutante *A. baldaniorum* C5.56 ( $\Delta hkhB$ ) debe restaurar el fenotipo de formación de biopelícula de *A. baldaniorum* Sp245.

## 6 JUSTIFICACIÓN

Los sistemas de dos componentes (TCS) están directamente relacionados a los sistemas de señalización que utiliza *Azospirillum baldaniorum* Sp245 para llevar a cabo diversos procesos en la rizósfera, como la identificación de regiones ricas en nutrientes (quimiotaxis), la colonización, la formación de biopelícula; entre otros.

La complementación del gen *hkhB* confirmará la participación de una cinasa histidínica híbrida como parte de un probable sistema multicomponente en *A. baldaniorum* Sp245 que desencadena la fosfotransferencia hacia reguladores de respuesta que pudieran estar interviniendo en los procesos de formación de biopelícula.

## **7 OBJETIVOS**

### **7.1 General**

Complementar la mutante de *Azospirillum baldaniorum* C5.56, que presenta la eliminación del gen *hkhB*.

### **7.2 Particulares**

- Analizar con herramientas bioinformáticas al gen *hkhB*.
- Diseñar y generar la complementación de la mutante *hkhB* minus.
- Realizar análisis fenotípicos (crecimiento y formación de biopelícula).

## 8 MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Análisis bioinformáticos del gen *hkhB*.

Se hizo un análisis bioinformático para conocer los dominios que contiene la proteína HkhB codificada en el gen con número de acceso AZOBR\_p310006, para esto se obtuvo la secuencia proteica en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Esta secuencia se introdujo en las plataformas bioinformáticas SMART ([http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set\\_mode.cgi?NORMAL=1](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1)), Pfam (<http://pfam-legacy.xfam.org/>), y NCBI Conserved Domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi?cmd=rps>).

### 8.2 Diseño de oligonucleótidos

Antes del diseño de los oligonucleótidos, se realizó la búsqueda de probables regiones promotoras, utilizando los programas SOFTBERRY Prediction of Bacterial Promoters, iPro70-PseZNC: A Tool for Identifying  $\sigma$ 70 Promoters With novel Pseudo Nucleotide Composition, iPro54-PseKNC: A Sequence-Based predictor for Identifying  $\sigma$ 54 Promoters with Pseudo K-tuple Nucleotide Composition y FIMO: Find Individual Motif Occurrences. Seguido de este análisis, se realizó la búsqueda de secuencias consenso reconocidas por factores transcripcionales con la plataforma PRODORIC: Virtual Footprint.

Con los datos obtenidos de estos dos análisis se realizó el diseño de oligonucleótidos, tomando en cuentas lo siguiente:

- 1) Tomar 400 pb río arriba del codón de inicio del ORF *hkhB* para el diseño del oligonucleótido delantero nombrado FwhkhB.
- 2) El oligonucleótido reverso nombrado RvhkhB se diseñó después del codón de paro para amplificar en su totalidad el gen.
- 3) Se colocaron secuencias para los sitios de restricción *KpnI* para nuestro oligonucleótido delantero y *BamHI* para nuestro oligonucleótido reverso.
- 4) Se consideraron todas las condiciones establecidas para un correcto diseño de oligonucleótidos.

Para el diseño de oligonucleótidos se utilizaron las herramientas bioinformáticas disponibles en la red NCBI: Primer-BLAST y OligoAnalyzer™ Tool, así como el software SnapGene.

### 8.3 Materiales biológicos

Oligonucleótidos	Secuencia	Tamaño	% G-C	TM
FwhkhB- <i>KpnI</i>	GGTACCCGCACTGGTGGATCTTGATCATT	24 pb	45.8	65.1 °C
RvhkhB- <i>BamHI</i>	GGATCCACTGAGGCCGACCAACATCTGAAG	24 pb	54.2	67.7 °C
M13Fwd	GTAAAACGACGGCCAGT	17 pb	52.9	52.6 °C
M13Rev	CAGGAAACAGCTATGAC	17 pb	47.1	47 °C
RpJB3T	ACAATCAGCTACTTCACTGTTG	22 pb	40.9	52.9 °C

Cepas	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>hds17 endA1 thi-1 gyrA96 relA1 recA1 supE44 Δ-lacU169 (φ80dlacZ ΔM15)</i>	Gibco-BRL
<i>E. coli</i> S17.1	<i>E. coli</i> Res- Mod+ <i>recA proA thi</i> integrado al plásmido RP4 Tc::Mu Km::Tn7 Tra+ SmR, SpR, TpR	(Simon et al., 1983)
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	Cepa silvestre	Baldani et al. 1986
<i>A. baldaniorum</i> C5.56	Cepa $\Delta$ <i>hskB</i> derivada de Sp245	(Cordero Rivera, 2017)
<i>A. baldaniorum</i> pJBhkhB	Cepa derivada de C5.56 que alberga el plásmido pJB3Tc20:: <i>hkhB</i>	Este trabajo
<i>A. baldaniorum</i> pJB3Tc20	Cepa derivada de C5.56 que alberga el plásmido pJB3Tc20	Este trabajo

Plásmidos	Descripción	Tamaño
pGEM-T Easy (linearized)	Vector linealizado para la clonación de productos PCR. El sitio de inserción está flanqueado por sitios <i>BstZI</i> , <i>EcoRI</i> y <i>NotI</i> .	3017 pb
pJB3Tc20	Derivado de pJB3 en el que el gen Tcr de pUC7Tc se insertó como un fragmento <i>BamHI</i> de 2,3 kb en el sitio <i>BgIII</i> ; Apr Tcr; 7,1 kb. (Blatny et al., 1997)	7069 pb
pGEMhkhB	Derivado de pGEM-T Easy (linearized) con fragmento <i>hkhB-KpnI-BamHI</i> (Este trabajo).	6183 pb
pJBhkhB	Derivado de pJB3Tc20 con fragmento <i>hkhB</i> clonado en los sitios <i>KpnI</i> y <i>BamHI</i> (Este trabajo).	10220 pb

#### 8.4 PCR para el amplificado del gen *hkhB*

Se realizó la extracción del ADN genómico por la técnica de CTAB (Sambrook, 2001); posteriormente, se realizaron los ensayos de PCR de acuerdo con las especificaciones del proveedor, partiendo de un ensayo de comprobación utilizando la *Taq DNA Polimerase Recombinante* (Invitrogen®) y, como paso siguiente, un ensayo con fines de clonación, utilizando la polimerasa de alta fidelidad *Taq DNA Polimerase Platinum* (Invitrogen®). Las condiciones del

PCR Comprobación		PCR Alta fidelidad	
Master Mix (2X)	5 µL	Buffer 10x	2 µL
FwhkhB- <i>KpnI</i>	0.5 µL	MgSO <sub>4</sub>	0.5 µL
RvhkhB- <i>Bam</i> HI	0.5 µL	dNTP's	1.5 µL
DNA	1 µL	FwhkhB- <i>KpnI</i>	0.5 µL
H <sub>2</sub> O-PCR	3 µL	RvhkhB- <i>Bam</i> HI	0.5 µL
Vol. final	10 µL	<i>Taq Platinum® Pfx</i>	0.3 µL
		DNA	1 µL
		H <sub>2</sub> O-PCR	13.7 µL

amplificado para el gen *hkhB* se muestran en la siguiente tabla.

En la siguiente tabla se muestran las condiciones de PCR para realizar el amplificado del gen *hkhB*.

Condiciones de PCR		
95 °C	5 min.	30 ciclos
95 °C	30 seg.	
61 °C	30 seg.	
72 °C	3:30 min.	
72 °C	7 min.	
4 °C	∞	

#### 8.5 Construcción del plásmido pJBhkhB

El producto de PCR se clonó en el plásmido de clonación pGEM-T *Easy Linearized* (Promega Corporation, 2021) para obtener el plásmido pGEMhkhB que se transformó en células quimiocompetentes *E. coli* DH5α (Sambrook, 2001) y se sembraron en placas de LB (Anexo 1) que contenían ampicilina (100 µg/mL) y 40µL de X-Gal (20 mg/mL). Se seleccionaron aquellas colonias que presentaban

coloración blanca, ya que la presencia del inserto interrumpe el gen *lacZ* interrumpiendo la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa. Las clonas seleccionadas se cultivaron en medio LB suplementado con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y después de 12 h de incubación a 37 °C, para recuperar el paquete celular y realizar la extracción de ADN plasmídico por el método previamente establecido (Sambrook, 2001). Para confirmar la construcción del plásmido pGEMhkhB, se realizó una PCR con los oligonucleótidos diseñados (FwhkhB y RvhkhB). Al ADN plasmídico de la clona seleccionada se le realizaron ensayos de restricción enzimática con las enzimas *PvuII*, *KpnI* y *BamHI* para liberar el fragmento del gen *hkhB* y subclonarlo en el plásmido pJB3Tc20 (Blatny et al., 1997), de acuerdo al protocolo de restricción para liberar el gen *hkhB* (Anexo 2) se obtuvo el plásmido de expresión pJBhkhB que se transformó en células quimiocompetentes *E. coli* DH5 $\alpha$  que fueron sembradas en placas de LB que contenían tetraciclina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incubándolas a 37 °C por 12 h. Se seleccionaron las colonias que presentaban resistencia a tetraciclina, se aislaron y, para confirmar la presencia del inserto, se realizó un grupo de PCR con los oligonucleótidos diseñados (FwhkhB y RvhkhB). La clona seleccionada se sembró en medio LB suplementado con tetraciclina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 12 h a 37 °C; el cultivo bacteriano fue utilizado para obtener el paquete celular y, posteriormente, realizar la extracción del ADN plasmídico (Sambrook, 2001). El ADN plasmídico se transformó en células quimiocompetentes *E. coli* S17.1 y fueron sembradas en placas de LB suplementado con Tetraciclina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A la clona seleccionada se le realizó extracción de ADN genómico y ADN plasmídico con el que se realizó una serie de PCR con los oligonucleótidos (Tabla de oligonucleótidos).

### **8.6 Secuenciación del fragmento correspondiente al gen *hkhB***

El fragmento *hkhB* fue amplificado con la polimerasa de alta fidelidad *Taq DNA Polimerase Platinum* (Invitrogen®), y clonado en el plásmido pJB3Tc20, a partir del cual se realizó la secuenciación nucleotídica utilizando los iniciadores FwhkhB y RvhkhB.

Se envió a secuenciar parcialmente a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

### **8.7 Obtención de la cepa complementada *A. baldaniorum* C5.56 pJBhkhB**

La transferencia del plásmido pJBhkhB fue realizada por conjugación biparental entre la cepa donadora *E. coli* S17.1 (pJBhkhB) y la receptora *A. baldaniorum* C5.56. Las transconjugantes fueron seleccionadas en placas de medio mínimo K-lactato (Anexo 3) suplementado con tetraciclina (30 µg/mL) por 72 h, a 32 °C. Posteriormente, las clonas seleccionadas fueron cultivadas en medio mínimo K-lactato suplementado con tetraciclina (30 mg/mL) por 20 h, a 32 °C. A la clona seleccionada se le realizaron extracciones de ADN genómico y plasmídico para realizar ensayos de PCR que confirmaron la presencia del plásmido con el inserto.

### **8.8 Obtención de la cepa control *A. baldaniorum* C5.56 pJB3Tc20**

Se obtuvo por conjugación biparental entre la cepa donadora *E. coli* S17.1 (pJB3Tc20) y la receptora *A. baldaniorum* C5.56. Siguiendo los protocolos ya mencionados de cultivo se seleccionó la cepa *A. baldaniorum* C5.56 (pJB3Tc20), que servirá como cepa control para los ensayos fenotípicos.

## **8.9 Ensayos fenotípicos**

### **8.9.1 Curvas de crecimiento**

Para este ensayo se utilizaron las cepas *A. baldaniorum* Sp245, *A. baldaniorum* C5.56, *A. baldaniorum* C5.56 pJBhkhB y *A. baldaniorum* C5.56 pJB3Tc20 que fueron sembradas previamente en placas de Rojo Congo durante 72 h a 32 °C. De cada placa se tomaron 5 colonias para realizar un pre-cultivo en matraces con 20 mL de medio mínimo K-malato llevándolos a 32 °C con agitación hasta alcanzar una DO 600 nm de 0,6–0,8. Por cada cepa se inocularon 20 µL del pre-cultivo en matraces que contenían 20 mL de medio libre de nitrógeno suplementado con nitrato de potasio (NFB+KNO<sub>3</sub>) e incubándolos en agitación a 32 °C y realizando las lecturas de la DO 600 nm de cada cepa por lapsos de 2 h, hasta completar un total de 24 h. Se realizaron tres ensayos independientes en días diferentes partiendo del mismo cultivo en placa de cada cepa.

### 8.9.2 Formación de biopelícula

La evaluación de este fenotipo se realizó por el método de cristal violeta (CV) y la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (Grintzalis et al., 2015). Para ambos métodos se utilizaron tubos de 15 mL que contenían 7.5 mL de una suspensión 1:100 de NFB (Anexo 4), con el inóculo bacteriano que se obtuvo partiendo de un pre-cultivo en medio mínimo K-malato que alcanzó una DO 590 nm de 1,1-1,4 para concentrarlo a una DO de 2 por centrifugación y re-suspensión en buffer de fosfatos (Anexo 5), aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de Buffer de fosfatos para resuspender (mL)} = \frac{\text{DO cultivo puro}}{\text{DO deseada}}$$

Cada suspensión 1:100 se sembró por triplicado en los tubos de 15 mL para cada método.

Se completaron 3 ensayos independientes en días diferentes partiendo del mismo cultivo en placa de cada cepa.

Para la cuantificación de la biopelícula, fueron agregados 1.875 mL de CV al 0.05% por cada tubo; transcurridos 30 min, se eliminó el CV y se puso a secar durante 2 h al aire libre. Finalmente, cada tubo se enjuagó con ácido acético glacial al 33% que disolvió el CV, el cual se cuantificó a 595 nm.

Para cuantificar la proteína, se rasparon las paredes de los tubos y se centrifugaron hasta desprender por completo todo lo que se encontraba adherido. Se obtuvo una pastilla amarillenta que se resuspendió en 1 mL de buffer de fosfatos para llevarlo a sonicar y cuantificar las proteínas por el método de Bradford (Grintzalis et al., 2015).

Para normalizar la biopelícula, se dividió la DO 595 nm cuantificada del CV entre la DO 610 nm cuantificada de la proteína total (mg/mL).

## 9 RESULTADOS

### 9.1 Análisis bioinformáticos del gen "AZOBR\_p310006" (*hkhB*)

El análisis bioinformático realizado con la secuencia proteica del gen *hkhB* en la plataforma SMART, reveló que esta proteína posee diferentes dominios (Figura 9):

1. 5TM-TMR\_LYT. Dominio transmembranal que cruza por lo menos 5 veces la membrana plasmática y podría actuar como dominio de detección de señales.
2. PAS (Per-Arnt-Sim). Intervienen en muchas proteínas de señalización donde se utilizan como dominio sensor de señales.
3. HisK. Representa el dominio de dimerización y fosfoceptor que se encuentra en las cinasas histidínicas.
4. HATPase\_c. Este dominio es fundamental en proteínas que unen ATP.
5. REC. Este dominio contiene un sitio fosfoceptor.
6. Hpt. Contiene un residuo activo de histidina que media en las reacciones de fosfotransferencia.

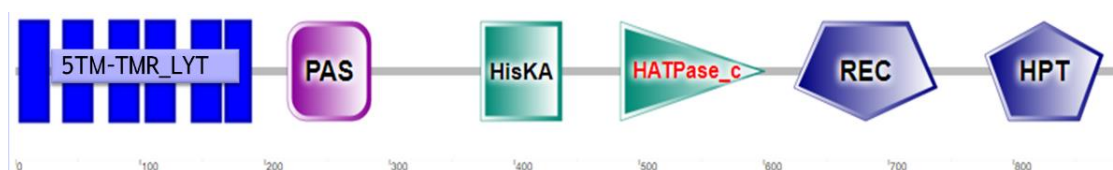


Figura 9. Predicción de dominios contenidos en la cinasa histidínica B (HkhB) de *Azospirillum baldaniorum* Sp245. Imagen obtenida de la herramienta SMART (Letunic et al., 2021).

Con la predicción de esta herramienta bioinformática podemos señalar que el gen de interés codifica presumiblemente para una Cinasa Histidina del tipo No ortodoxa, que probablemente pueda ser parte de un sistema de señalización multicomponente.

### 9.2 Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de los oligonucleótidos se evaluó el contexto genético del gen *hkhB*, y se realizó la búsqueda de una región promotora (Figura 10), encontrando cajas -12 y -24 que corresponden a secuencias consenso reconocidas por  $\sigma_{54}$ ; este análisis se realizó con las plataformas bioinformáticas iPro54-PseKNC (Lin et al., 2014) y FIMO (Grant et al., 2011). Con la predicción de una probable

participación de  $\sigma$ -54 en la transcripción del gen *hkhB*, se buscó la actividad de factores transcripcionales con la plataforma PRODORIC: Virtual Footprint (Dudek & Jahn, 2022) (Figura 10).

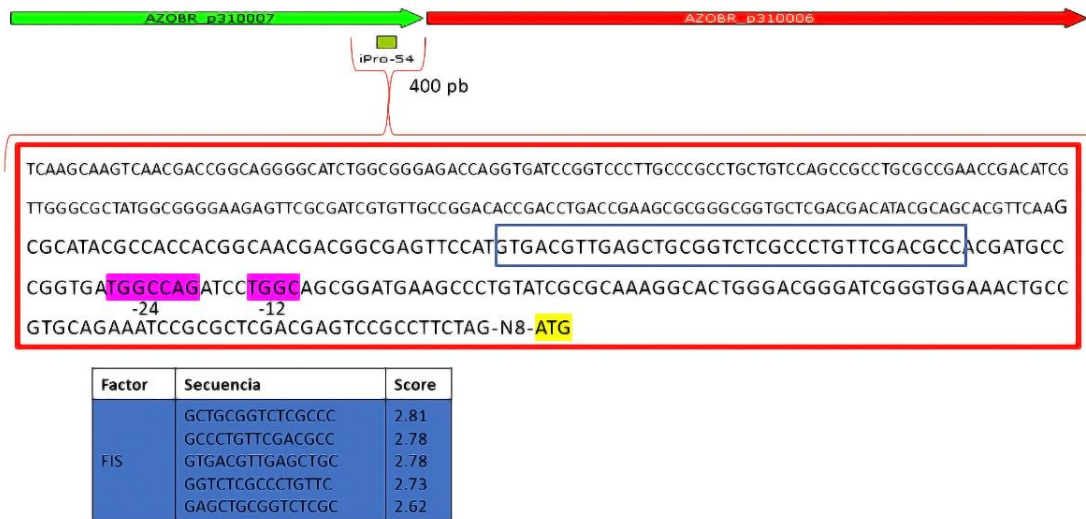


Figura 10. Análisis bioinformático de la probable región reguladora *cis* proximal del gen *hkhB* de *A. baldaniorum* Sp245. Cajas -12 y -24 reconocidas por  $\sigma$ -54 en color fiusha. Secuencias consenso reconocidas por el factor FIS y su ubicación en la probable región promotora (recuadro color azul). Para efectos de este análisis, se utilizaron 400 pb río arriba del inicio del codón de inicio (marcado con amarillo).

Los análisis *in silico* realizados con estas plataformas infieren una probable región promotora regulada por  $\sigma$ -54 y el factor transcripcional FIS (por sus siglas en inglés, *Factor for Inversion Stimulation*) como probable proteína de unión potenciadora (EBP: *Enhancer Binding Proteins*) necesaria para formar el complejo abierto que activa la transcripción. Sin embargo, también se encontraron secuencias consenso para los factores transcripcionales NarL (regulador de la respuesta al nitrato/nitrito NarL), CRP (proteína represora de catabolitos) y ArgR (implicado en la biosíntesis y el metabolismo de la arginina) (Anexo 6).

Al conocer esta información, se diseñaron el par de oligonucleótidos que amplifican el ORF y su probable región promotora. El diseño se llevó a cabo con las herramientas bioinformáticas NCBI: Primer-BLAST (Ye et al., 2012) y OligoAnalyzer™ Tool (Integrated DNA Technologies, 2023) (Figura 11).

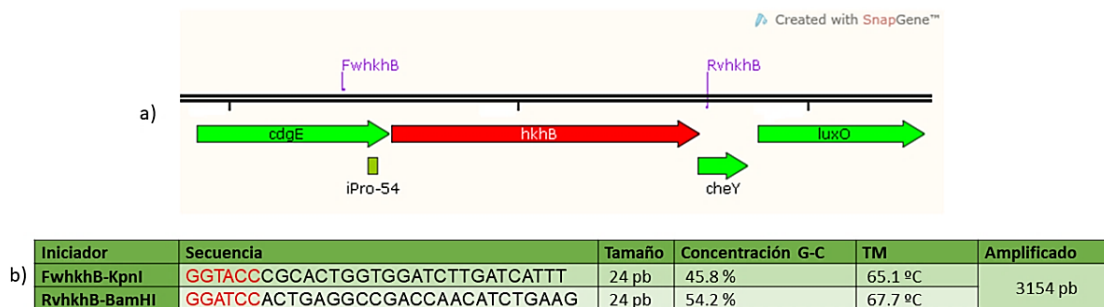


Figura 11. Localización de los oligonucleótidos FwhkhB-KpnI y RvhkhB-BamHI en el contexto genético del gen *hkhB* de *A. baldaniorum* Sp245. a) Contexto genético y ubicación de los oligonucleótidos diseñados para amplificar en su totalidad el gen *hkhB*. b) Información de los oligonucleótidos diseñados.

Los oligonucleótidos se evaluaron con ensayos de PCR en la cepa *A. baldaniorum* Sp254 para amplificar el gen *hkhB* y en la cepa *A. baldaniorum* C5.56 para confirmar la mutación (Figura 12).

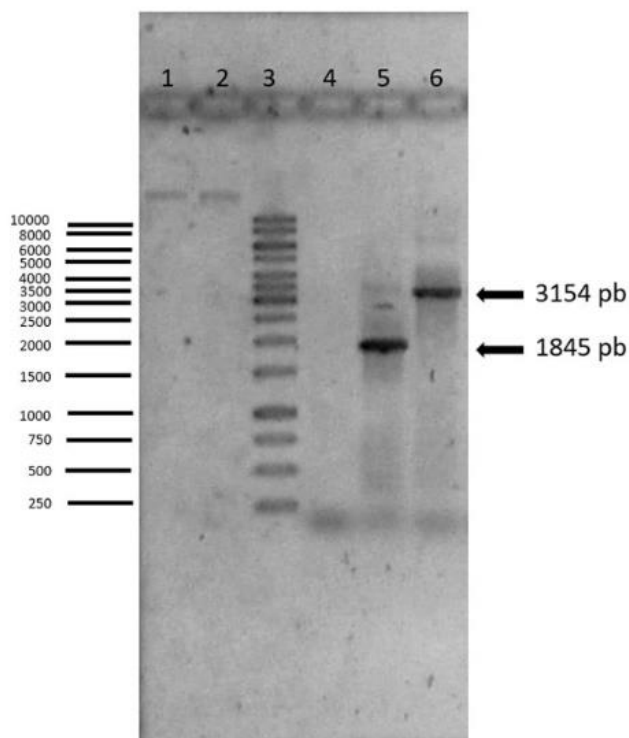


Figura 12. Fotografía de la separación de ADN por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1. ADN genómico de *Azospirillum baldaniorum* Sp245; Carril 2. ADN genómico de la cepa *Azospirillum baldaniorum* C5.56; Carril 3. Marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder - Thermo Fisher Scientific); Carril 4. H<sub>2</sub>O para PCR; Carril 5. Producto de amplificación por PCR de la cepa *Azospirillum baldaniorum* C5.56 (1845 pb); Carril 6. Producto de amplificación por PCR de la cepa *Azospirillum baldaniorum* Sp245 (3154 pb).

### 9.3 Construcción del plásmido pJBhkhB

La amplificación por PCR del gen *hkhB* de *A. baldaniorum* Sp245 se realizó usando la enzima de alta fidelidad *Taq DNA Polimerase Platinum* (Invitrogen®), lo que permitió clonar el fragmento en el plásmido de clonación pGEM-T Easy linealizado (Promega Corporation., 2021) para obtener la construcción pGEMhkhB. El ADN plasmídico extraído de las células *E. coli* DH5α transformadas con el plásmido pGEMhkhB fue sometido a evaluación con un ensayo de PCR usando las condiciones ya establecidas (Materiales y métodos) para confirmar la presencia del inserto (Figura 13).

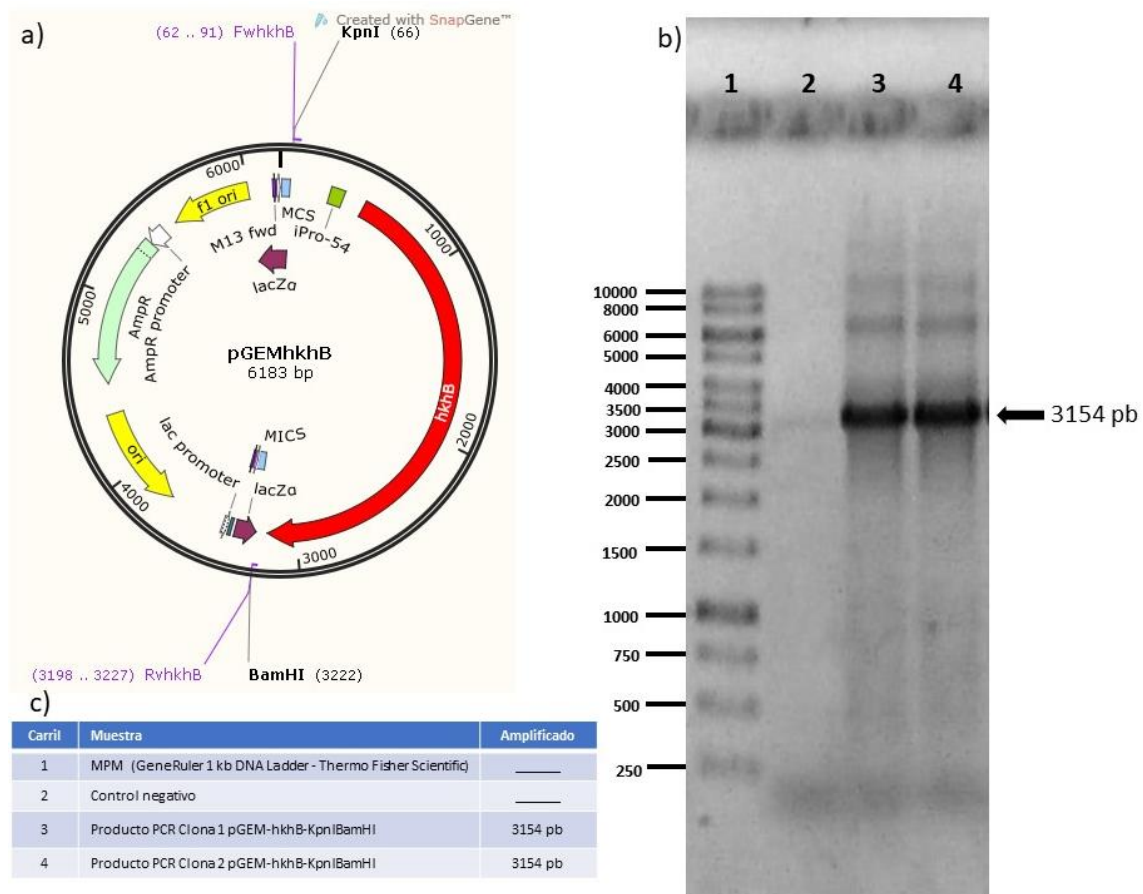


Figura 13. Análisis de la construcción pGEMhkhB. a) Esquema de la construcción obtenida con el software SnapGene que muestra la clonación del gen *hkhB* en el plásmido de clonación pGEM-T Easy linealizado. b) Fotografía de un gel de agarosa al 1% que muestra el producto de amplificación del gen *hkhB* a partir de DNA plasmídico obtenido de *E. coli* DHα transformada con la ligación de pGEM-T-easy y el producto de la PCR de *hkhB*. c) Orden en el que se cargaron las muestras analizadas.

## 9.4 Liberación del gen *hkhB* por ensayos de restricción enzimática

Los oligonucleótidos se diseñaron con sitios de restricción para las enzimas *KpnI* y *BamHI* con la finalidad de poder liberar el gen *hkhB* por medio de ensayos de restricción y subclonarlo en el plásmido pJB3Tc20. Debido a que el fragmento y el tamaño del inserto eran semejantes, en cuanto al número de pares de bases, primero se realizó un ensayo independiente con la enzima *PvuII* para obtener fragmentos de 3619 pb y 2564 pb; aplicando el método de precipitación con acetato de sodio e isopropanol se eliminaron las sales y buffers que podrían interferir en el segundo ensayo de restricción que se realizó con las enzimas *KpnI* y *BamHI* para obtener el producto final que corresponde a 3156 pb. Cada ensayo de restricción enzimática se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 14).

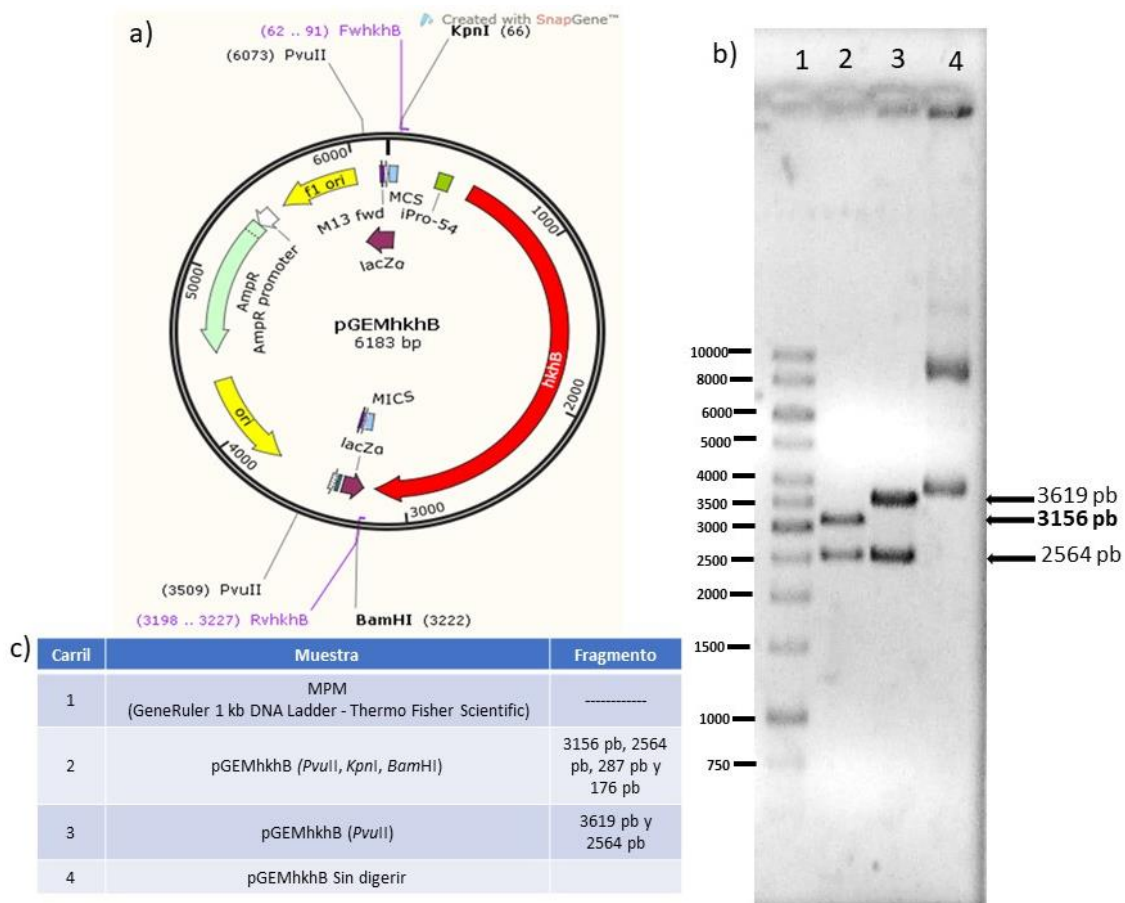


Figura 14. Liberación del gen *hkhB* por ensayos de restricción. a) Esquema del plásmido pGEMhkhB y la ubicación de los sitios de restricción *PvuII*, *KpnI* y *BamHI* b) Fotografía de un gel de agarosa al 1% que

muestra el ADN plasmídico digerido con las enzimas de restricción *PvuII*, *KpnI* y *BamHI* para liberar el inserto *hkhB*. c) Simplificación del orden y fragmentos esperados de las muestras analizadas.

### 9.5 Subclonación en el plásmido pJB3Tc20

El plásmido pJB3Tc20 se linealizó por restricción enzimática *KpnI*-*BamHI*, la cual se confirmó por electroforesis (Figura 15) para permitir la ligación del gen *hkhB*, obtenido de la restricción previamente mencionada del plásmido pGEMhkhB (Figura 14). Para la replicación del plásmido, se transformaron en *E. coli* DH5 $\alpha$ , las cuales fueron cultivadas y seleccionadas de acuerdo con lo establecido en los materiales y métodos. A las células transformantes se le extrajo el ADN plasmídico que fue sometido a análisis de PCR y restricción enzimática para confirmar la presencia del plásmido con el inserto (plásmido pJBhkhB) (Figura 16).

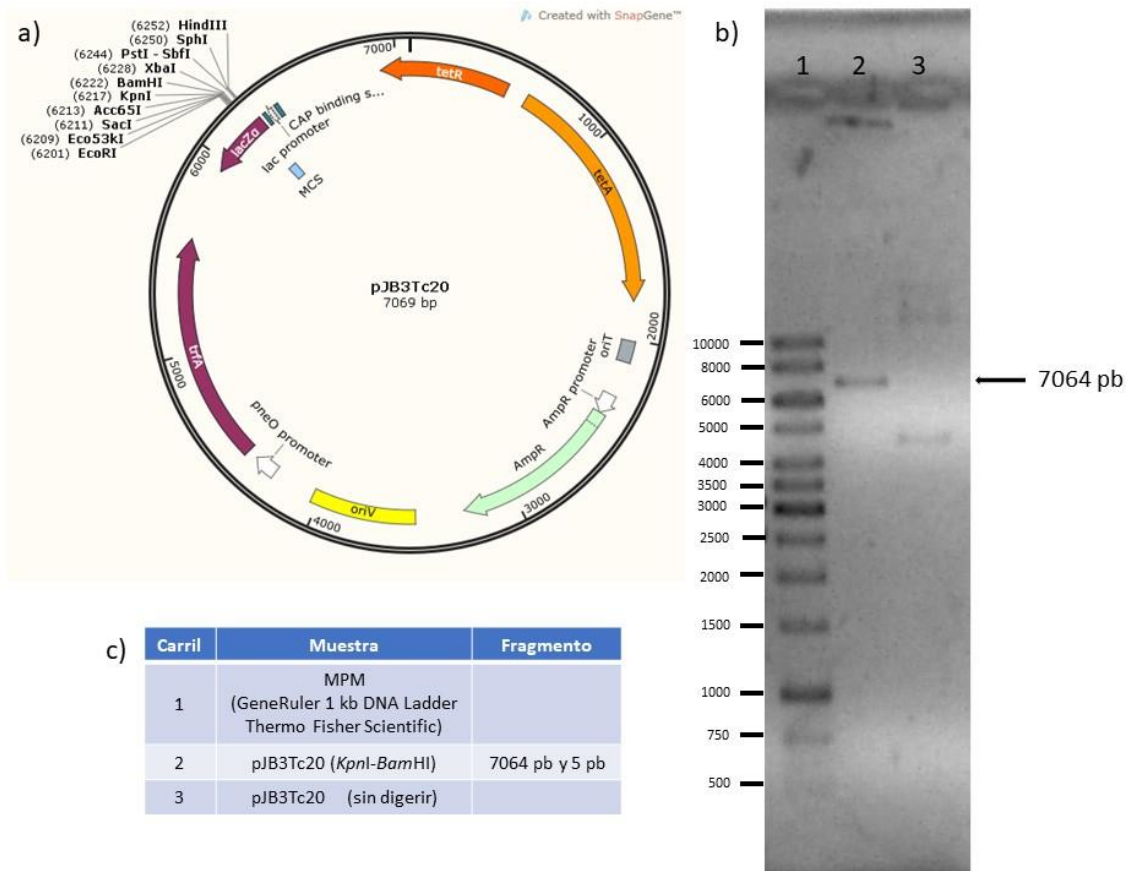


Figura 15. Análisis del plásmido pJB3Tc20. a) Visualización gráfica del plásmido pJB3Tc20 y el sitio múltiple de clonación (imagen obtenida con el software SnapGene). b) Fotografía de un gel de agarosa al 1% que muestra el plásmido pJB3Tc20 linealizado con las enzimas de restricción *KpnI* y *BamHI*. c) Orden de las muestras analizadas en el gel de agarosa al 1% por electroforesis.

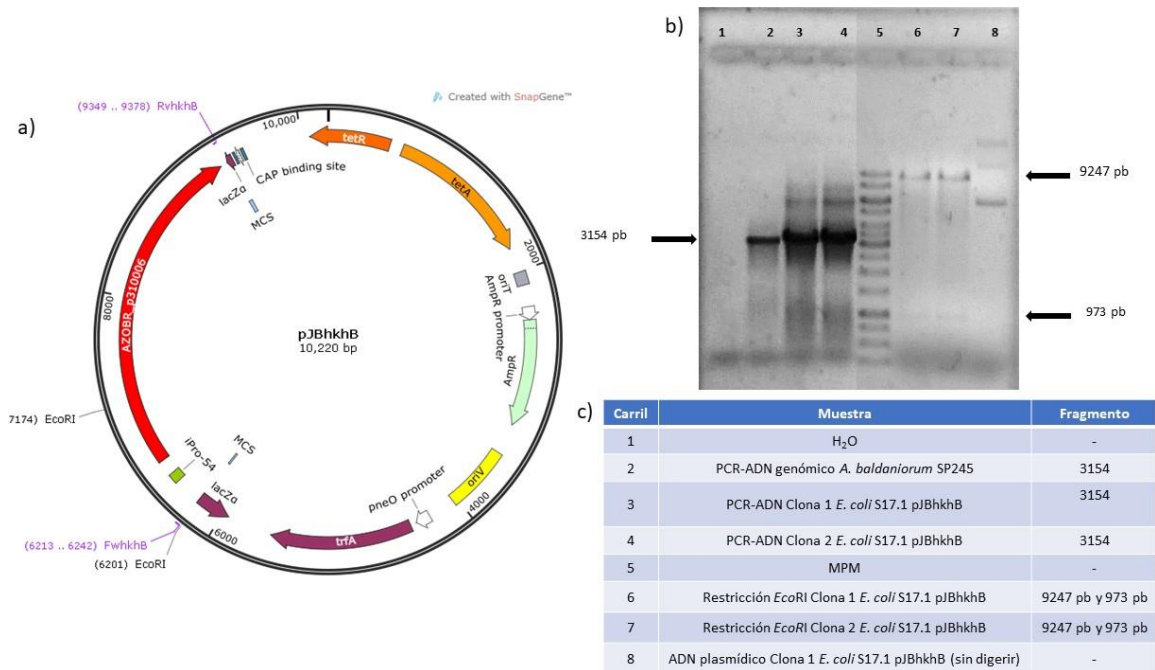


Figura 16. Análisis de la construcción pJBhkhB. a) Visualización gráfica del plásmido pJBhkhB (imagen obtenida con el software SnapGene). b) Fotografía de una separación de ADN por electroforesis en gel de agarosa al % que contiene DNA genómico y productos de amplificación por PCR, así como ADN plasmídico y los fragmentos obtenidos por restricción enzimática con *EcoRI*. c) Orden de las muestras analizadas en el gel de agarosa al 1% por electroforesis.

## 9.6 Secuenciación del fragmento correspondiente al gen *hkhB*

Al ADN plasmídico de la cepa *E. coli* S17.1 pJBhkhB se le realizó una PCR con la enzima de alta fidelidad *Taq DNA Polimerase Platinum* (Invitrogen®) y los oligonucleótidos diseñados en este trabajo (FwhkhB y RvhkhB). El producto de PCR se secuenció. Los resultados de la secuenciación fueron analizados por BLASTN([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)), los cuales mostraron porcentajes de cobertura e identidad del 98% y 97.87% respectivamente y un E-value de 0 para 1168 pb secuenciadas utilizando el oligonucleótido FwhkhB, mientras tanto, el BLASTN de las 1179 pb secuenciadas utilizando el oligonucleótido RvhkhB mostraron porcentajes de cobertura e identidad del 98% y 98.3% respectivamente y un E value de 0. De esta forma se confirma la secuencia inicial y final del gen *hkhB* insertado en el plásmido pJB3Tc20. (Figura 17 y 18).

Sequences producing significant alignments									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Azospirillum baldaniorum strain Sp245 plasmid Sp245_p03</a>	<a href="#">Azospirillum baldaniorum</a>	2026	2026	98%	0.0	97.87%	810374	<a href="#">CP022255.1</a>	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Azospirillum brasilense Sp245 plasmid AZOBR_p3 complete genome</a>	<a href="#">Azospirillum baldaniorum</a>	2026	2026	98%	0.0	97.87%	778798	<a href="#">HE577330.1</a>	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Azospirillum argentinense strain MTCC4035 plasmid p1 complete sequence</a>	<a href="#">Azospirillum argentinense</a>	691	691	91%	0.0	78.45%	1930550	<a href="#">CP032322.1</a>	

Figura 17. Resultado del BLASTN utilizando las 1168 pb secuenciadas utilizando el oligonucleótido FwHKHB.

Sequences producing significant alignments									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Azospirillum baldaniorum strain Sp245 plasmid Sp245_p03</a>	<a href="#">Azospirillum baldaniorum</a>	2050	2050	98%	0.0	98.30%	810374	<a href="#">CP022255.1</a>	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Azospirillum brasilense Sp245 plasmid AZOBR_p3 complete genome</a>	<a href="#">Azospirillum baldaniorum</a>	2050	2050	98%	0.0	98.30%	778798	<a href="#">HE577330.1</a>	

Figura 18. Resultado del BLASTN utilizando las 1179 pb secuenciadas utilizando el oligonucleótido RVHKHB.

### 9.7 Obtención de la cepa complementada *A. baldaniorum* C5.56 pJBhkhB

Tras los ensayos de conjugación, se introdujo el plásmido pJBhkhB en la cepa mutante *A. baldaniorum* C5.56. Después de la selección y cultivo de las cepas transconjugantes se realizaron extracciones de ADN genómico que fueron analizadas por ensayos de PCR para confirmar la presencia del inserto y del plásmido. Los resultados con los oligonucleótidos FwhkhB y RvhkhB revelaron la presencia del gen *hkhB* con un amplicón de 3154 pb y, a su vez, el amplicón mutante con un tamaño de 1845 pb. Lo que comprueba la complementación en *trans* y la obtención de la cepa *A. baldaniorum* C5.56pJBhkhB (Figura 19).

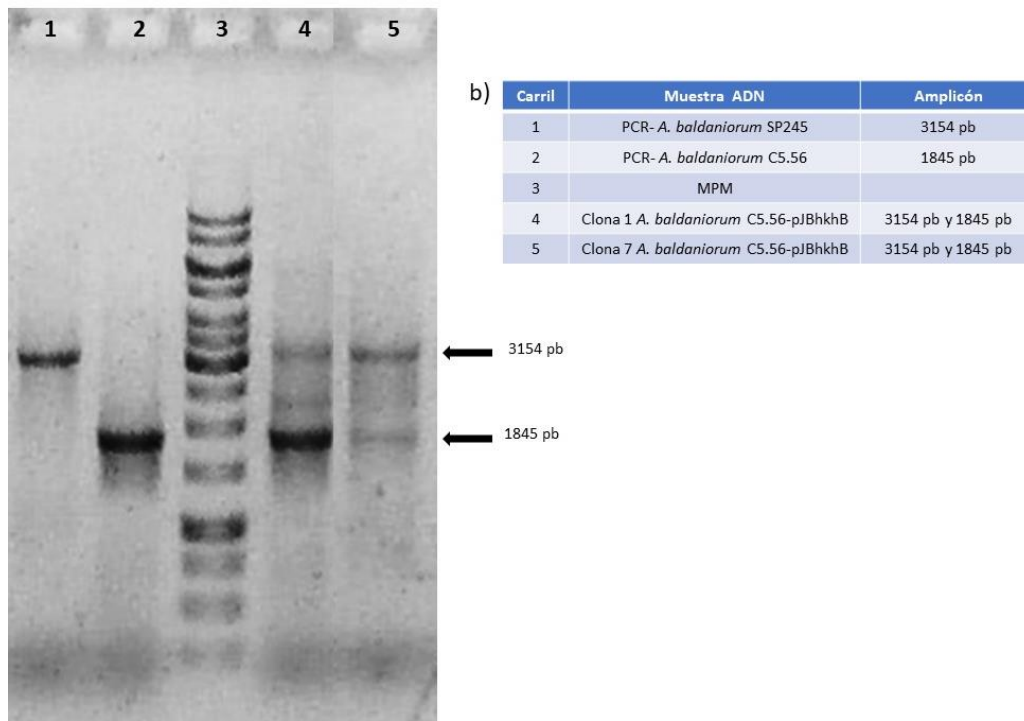


Figura 19. Confirmación de la secuencia *hkhB* en la cepa *A. baldaniorum* C5.56-pJBhkhB. a) Fotografía de una separación de DNA por electroforesis en gel de agarosa al 1% que contiene productos de amplificación por PCR de las cepas WT, C5.56 y C5.56-pJBhkhB. Para la cepa C5.56 se observan dos bandas debido a poseer el amplicón mutante (1845 pb) y el amplicón silvestre insertado (3154 pb). b) Orden de las muestras analizadas en el gel de agarosa al 1% por electroforesis.

Los resultados obtenidos con los ensayos de PCR permitieron seleccionar la clona 7 que fue utilizada para los ensayos fenotípicos.

### 9.8 Obtención de la cepa *A. baldaniorum* C5.56-pJB3Tc20

Siguiendo el mismo protocolo de conjugación, se obtuvo la cepa *A. baldaniorum* C5.56-pJB3Tc20, esta cepa se obtuvo con la finalidad de tener el plásmido de expresión en el fondo genético de la cepa mutante para demostrar que el efecto de complementación generado no sea dependiente del mismo.

Tras la selección y cultivo de la cepa obtenida *A. baldaniorum* C5.56-pJB3Tc20, se realizó una extracción de ADN genómico, que se utilizó como templado para la amplificación por PCR bajo las condiciones establecidas (Anexo 7) con los oligonucleótidos M13Fwd y RpJB3T, para demostrar la presencia del plásmido en las transconjugantes seleccionadas. El amplicón resultante debería corresponder



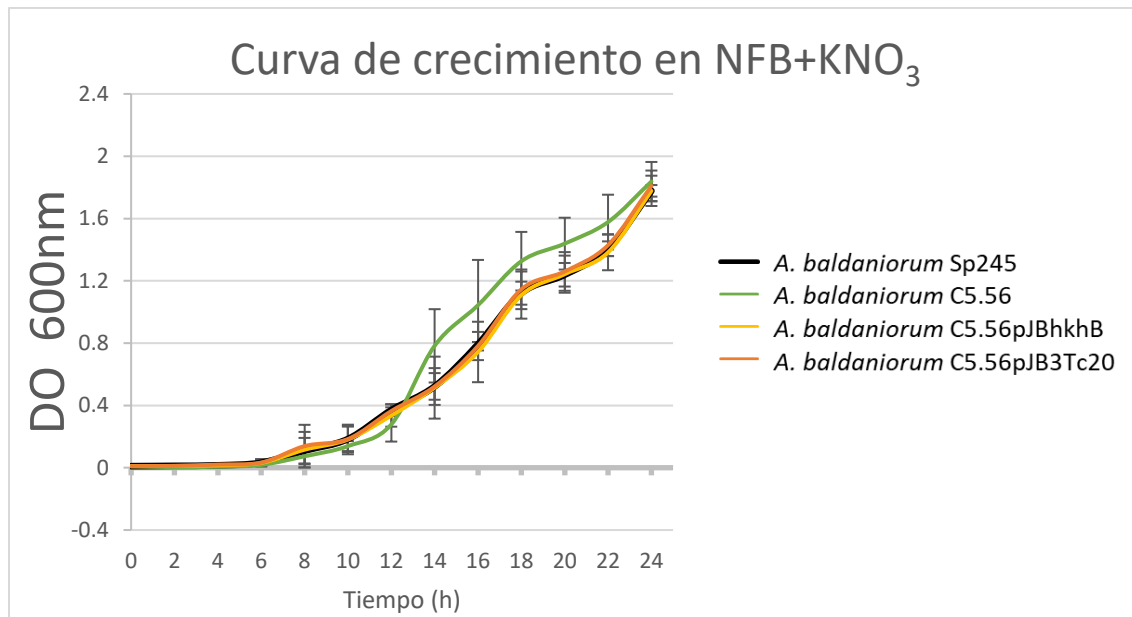


Figura 21. Curvas de crecimiento de *A. baldaniorum* Sp245 y cepas manipuladas en el gen *hkhB*. Determinación del crecimiento en medio NFB suplementado con  $\text{KNO}_3$  realizando lecturas a una DO 600 nm durante 24 h de las cepas *A. baldaniorum* Sp245, *A. baldaniorum* C5.56, *A. baldaniorum* C5.56-pJBhkhB y *A. baldaniorum* C5.56-pJB3Tc20. Los datos graficados representan el promedio de tres ensayos realizados de forma independiente en días diferentes.

### 9.9.2 Formación de biopelícula

Se realizaron tres ensayos independientes de formación de biopelícula para evaluar la participación de gen *hkhB* que codifica presumiblemente para una cinasa histidínica transmembranal en *Azospirillum baldaniorum* Sp245, utilizando como medio de cultivo NFB+ $\text{KNO}_3$ , cristal violeta para su cuantificación y el método de Bradford para normalizarla.

Los promedios de tres ensayos independientes fueron cuantificados y normalizados a los 3 días de incubación, y con la construcción del gráfico y un análisis de t-de Student se observa que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las cepas analizadas (Figura 22).

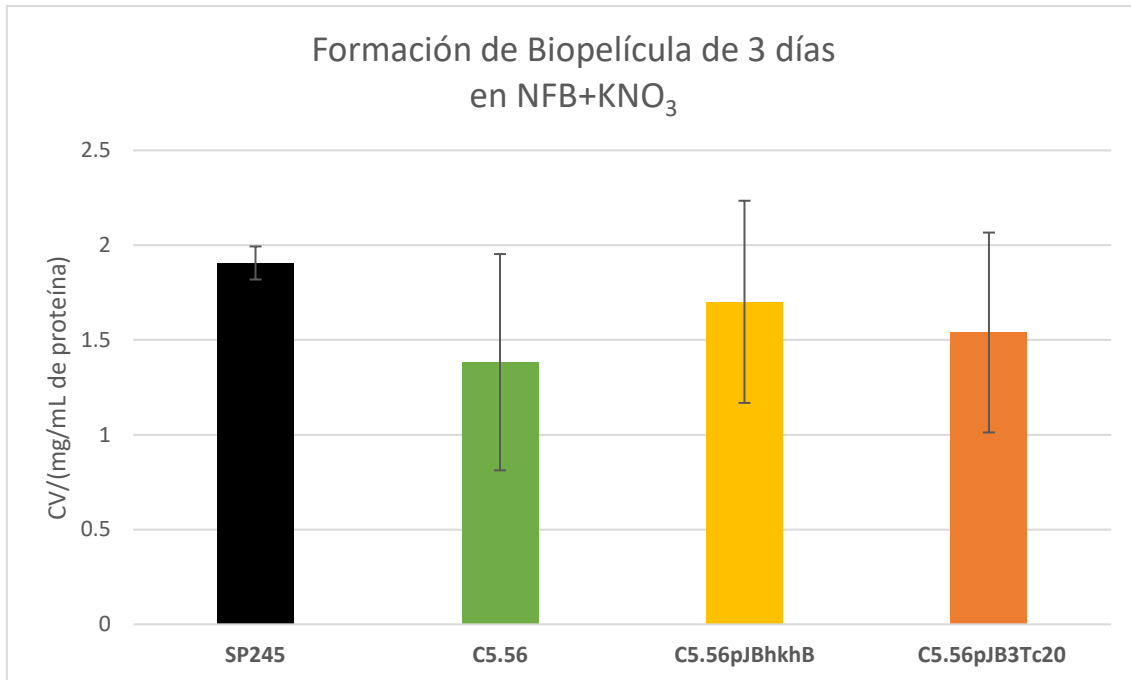


Figura 22. Comparación de la producción de biopelícula a los 3 días de incubación por *A. baldaniorum* Sp245 *A. baldaniorum* C5.56, *A. baldaniorum* C5.56-pJBhkhB y *A. baldaniorum* C5.56-pJB3Tc20. No existe diferencia estadísticamente. Los resultados representan las medias obtenidas de tres ensayos independientes realizados en diferentes días.

También con los datos obtenidos de los promedios de tres ensayos realizados de formación de biopelícula a 5 días de incubación se realizó un gráfico y un análisis de t-de Student. Los resultados no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas para las cepas estudiadas (Figura 23).

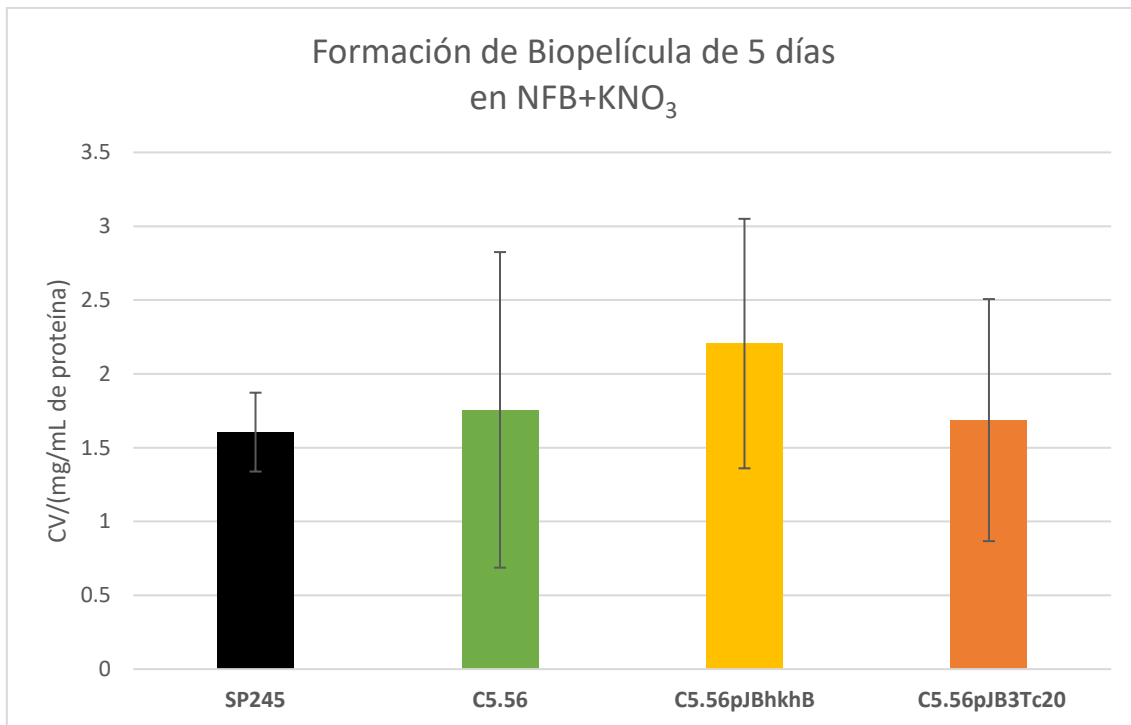


Figura 23. Comparación de la producción de biopelícula a los 5 días de incubación por *A. baldaniorum* Sp245 *A. baldaniorum* C5.56, *A. baldaniorum* C5.56-pJBhkhB y *A. baldaniorum* C5.56-pJB3Tc20. No hay diferencia estadísticamente significativa entre las cepas estudiadas. Los resultados representan las medias obtenidas de tres ensayos independientes realizados en diferentes días.

Pero, lo que se pudo observar de forma cualitativa en las tinciones con cristal violeta fue la formación de una biopelícula en la interfase líquido-aire (llamada también película). Para los 3 días de incubación la cepa C5.56 ya forma una película más densa con respecto a la cepa WT, a la cepa complementada C5.56pJBhkhB y la cepa control C5.56pJB3Tc20 (Figura 24).

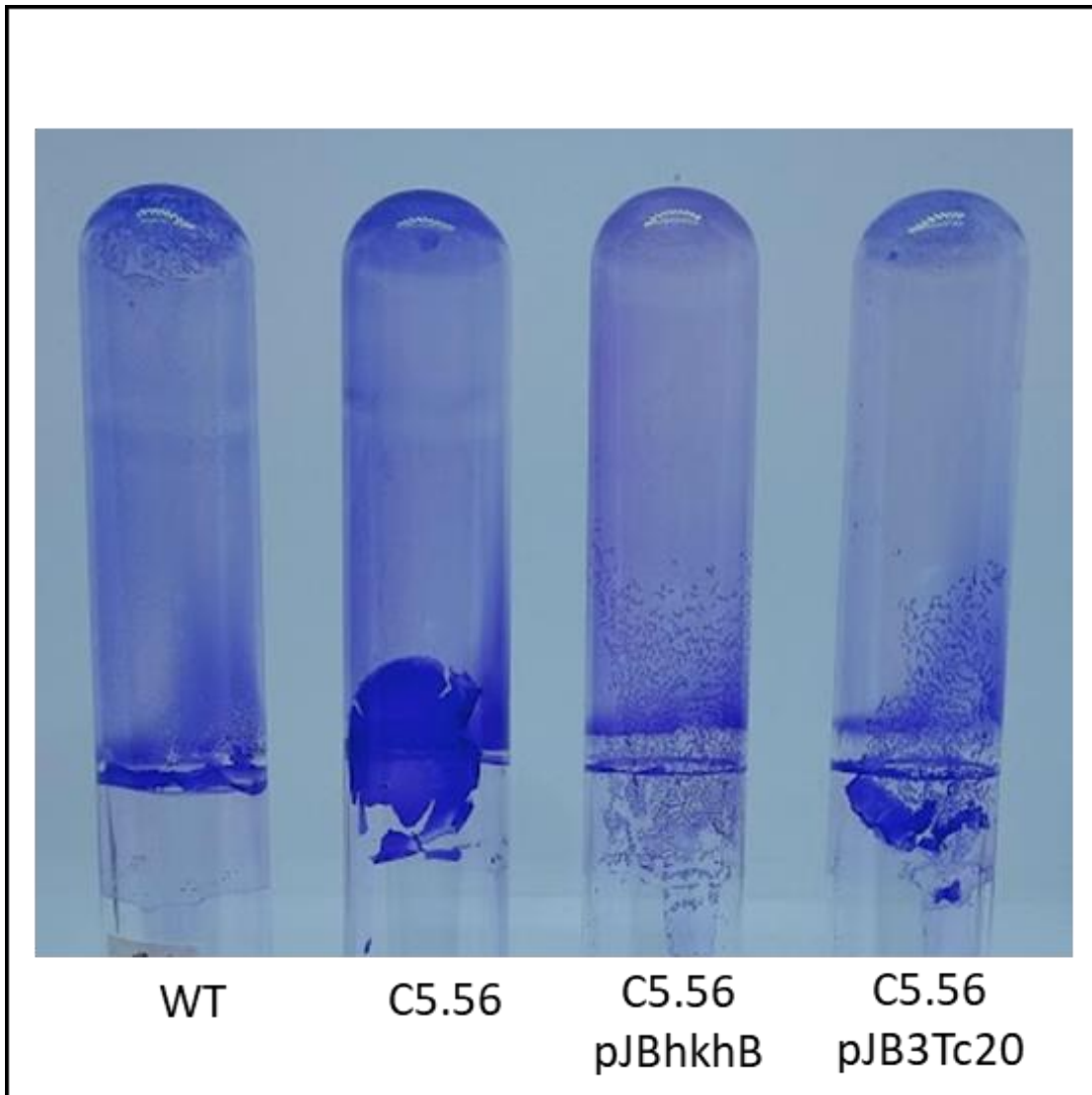


Figura 24. Biopelícula de 3 días teñida con Cristal Violeta 0.05%.

A los 5 días de incubación, también se observa la película adherida al tubo con mayor densidad en la cepa C5.56 y en la cepa control C5.56pJB3Tc20, mientras que en la cepa C5.56pJBhkhB podemos observar una película más lábil y menos densa. Por el contrario, la recuperación de la película en la cepa WT es difícil ya que se trata de una película delgada y lábil que al decantar la solución de tinción se pierde con facilidad (Figura 25). Para demostrar la densidad de la película formada de la cepa C5.56 se recopilaron fotos del proceso de tinción para informar de este fenotipo reportado por primera vez (Anexo 8).

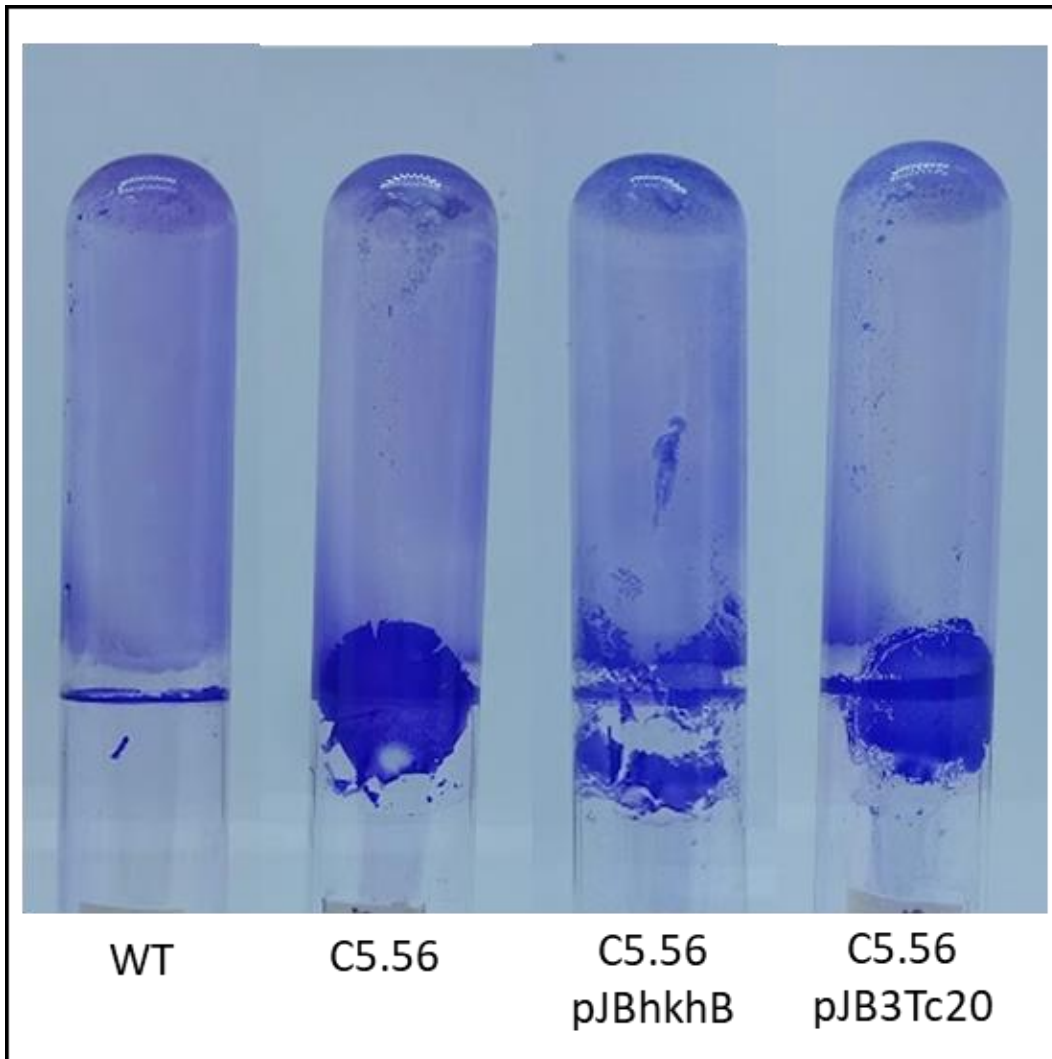


Figura 25. Biopelícula de 5 días teñida con Cristal Violeta 0.05%.

Con estos últimos resultados podríamos señalar que la HkhB podría participar como un regulador negativo de la formación de película utilizando como fuente de carbono K-malato, como fuente de nitrógeno  $\text{KNO}_3$  y una atmosfera microaerofílica húmeda a  $31^\circ\text{C}$ .

## 10 DISCUSIÓN

La predicción de una probable región regulada por el factor  $\sigma$ -54 podría sugerir un sistema regulador especializado que se dedica principalmente a la transcripción de genes implicados en la asimilación o fijación del nitrógeno. Sin embargo, en *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* modula la transcripción de genes implicados en el metabolismo de aminoácidos, la respuesta a especies reactivas de nitrógeno y la respuesta de choque fágico, respectivamente. En *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* y *Vibrio cholerae* el sistema  $\sigma$ 54 regula genes importantes para la biosíntesis flagelar y la movilidad, y en *Pseudomonas aeruginosa* el sistema  $\sigma$ 54 está implicado en la transcripción de genes implicados en la detección del quórum, la formación de biopelículas y la virulencia (Ma et al., 2021). Mientras que la predicción de probables secuencias consenso para el factor FIS podría sugerir su participación como factor transcripcional que puede actuar como activador o represor del gen *hkhB*, ya que que en *V. cholerae*, se propuso que Fis actúa junto con el regulador de la respuesta LuxO, un activador del factor sigma-54, para transcribir los cuatro sRNAs *qrr1* a *qrr4*, genes implicados en Quorum sensing (QS) (Tague et al., 2021), demostrando de esta manera una interacción de FIS con el factor transcripcional  $\sigma$ -54.

Con los análisis bioinformáticos realizados, se indica que la cinasa histidínica B (HkhB) presenta un dominio transmembranal del tipo 5TM-TMR\_LYT. En las proteínas de tipo LytS, los dominios 5TM se combinan con dominios intracelulares C-terminales GAF o de cinasas histidínicas. El dominio 5TMR-LYT está ampliamente distribuido en bacterias Gram-positivas, varias proteobacterias, fusobacterias y deinococcus (Anantharaman & Aravind, 2003). Un análisis realizado en *E. coli* demostró que las cinasas histidínicas con dominios transmembranales del tipo LytS codificada por los genes *ypdA* y *btsS* son responsables de detectar altas y bajas concentraciones de piruvato respectivamente, mismo que es utilizado por la bacteria en los procesos metabólicos, la división celular, procesos de patogenicidad y respuesta al estrés oxidativo (Behr et al., 2017). Otros estudios realizados en *Staphylococcus aureus*

revelan que una cinasa histidínica del tipo LytS participa en la respuesta sensorial a las alteraciones del potencial de la membrana celular, debido a las perturbaciones que podría presentar y, de esta forma, regular la expresión de genes que se encuentran involucrados en la apoptosis celular, la actividad de la mureína hidrolasa y la formación de biopelícula (Groicher et al., 2000; Patel & Golemi-Kotra, 2015). Hasta el momento, no hay estudios que demuestren la participación de cinasas histidínicas del tipo LytS en especies de *Azospirillum* o alguna *Alpha*-proteobacteria; sin embargo, la caracterización de este tipo de proteína en Gram-positivos revela la participación de un sistema de dos componentes LytSR que actúa sobre los operones *cid* y *Irg*, los cuales afectan a la actividad de la mureína hidrolasa, la supervivencia en fase estacionaria, la tolerancia a los antibióticos y la formación de biopelículas. Se ha demostrado que estos operones desempeñan un papel importante en el desarrollo de biopelículas al controlar la liberación de ADN genómico, que se convierte en un componente estructural importante de la matriz de la biopelícula (Sharma-Kuinkel et al., 2009).

La predicción de la estructura proteica demostró una cinasa histidina de tipo no ortodoxa, por poseer dominios REC y Hpt adicionales. A la fecha no hay estudios que sugieran el papel que desempeñan este tipo cinasas en el género *Azospirillum*, sin embargo, se encontró un homólogo en la cepa *Azospirillum argentinense* que tiene un dominio PAC adicional.

Al analizar los resultados obtenidos en este trabajo, no se observan datos estadísticamente significativos en la cuantificación de biopelícula; sin embargo, cualitativamente fue posible observar la formación de una biopelícula en la interfase líquido-aire en la cepa mutante C5.56, en la cepa control C5.56-pJB3Tc20 y, un poco menos, en la cepa complementada C5.6 pJBhkhB (Figura 20.b y Figura 21.b), lo cual podría revelar un dato interesante de la participación de esta cinasa histidínica como un regulador negativo para la formación de película. Mientras tanto, en un estudio realizado con *Burkholderia cenocepacia* J2315 –un patógeno de plantas– se describe la participación de una cinasa histidínica del tipo WspH que participa como un activador de la formación de

biopelícula y película codificada en un operón *wsp*, similar al de *Pseudomonas spp*, pero con un gen *wspR* (DGC) codificado en un segundo operón distal al antes mencionado. En este estudio se mutaron y sobreexpresaron los genes *wspH* y *wspR*, lo que confirma la participación de estas dos proteínas en la formación de biopelícula y película en *Burkholderia cenocepacia* J2315 (Sass et al., 2022).

Finalmente, la evidencia de un probable promotor dependiente de  $\sigma$ -54 podría hacer referencia a la regulación de genes encargados de la fijación de nitrógeno. La reducción del nitrógeno molecular en amoníaco es catalizada por un complejo enzimático denominado nitrogenasa, que el oxígeno inactiva de forma irreversible. Un estudio realizado con *Pseudomonas stutzeri* A1501 y *Azospirillum brasilense* Sp7 reveló que la fijación de nitrógeno puede influir en la formación de película al formar quistes (Wang et al., 2017). La formación de células en forma de quiste puede ser una estrategia general de las bacterias del suelo para sobrevivir en condiciones de limitación de nitrógeno y aerobias, y puede ser también una estrategia común de las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre para proteger su nitrogenasa del oxígeno del aire. Además, la formación de quistes envueltos en EPS no sólo puede garantizar la fijación de nitrógeno en el medio natural, sino que también contribuye a la captura de carbono, mediante la conversión de fuentes de este elemento fáciles de utilizar en EPS, que normalmente no se degradan con facilidad (Wang et al., 2017).

## 11 CONCLUSIÓN

Los análisis bioinformáticos revelaron la probable regulación de gen *hkhB* por  $\sigma$ -54 y una probable interacción del factor transcripcional FIS.

La estructura proteica de esta cinasa histidina es compleja y no hay estudios que demuestren su participación en algún proceso metabólico y fisiológico de *Azospirillum*.

Con la complementación en *trans* se logró identificar la formación de película, un fenotipo que no se había reportado anteriormente. Es posible que este proceso este regulado por la HkhB, ya que al interrumpir el gen que la codifica, se promueve la formación de la misma.

## 12 PERSPECTIVAS

Conocer el reconocimiento de señales por parte de las cinasas histidínicas que están codificadas en su genoma y, de esta forma, determinar en qué condiciones ambientales pudieran estarse expresando.

Modificar las condiciones de cultivo –en particular sin fuente de nitrógeno.

Establecer una técnica de complementación en *cis* para no afectar la dosis génica en la bacteria.

Implementar una técnica para evidenciar y comparar el fenotipo encontrado en esta investigación.

Realizar ensayos de aerotaxis para conocer la participación de esta cinasa histidínica como una proteína de detección de oxígeno.

Establecer la interacción que pudiera tener con los reguladores de respuesta aledaños a esta (CdgE, CheY y LuxO/FIS) o de la misma forma con la HkhC codificada río abajo.

### 13 BIBLIOGRAFÍA

- Anantharaman, V., & Aravind, L. (2003). Application of comparative genomics in the identification and analysis of novel families of membrane-associated receptors in bacteria. *BMC Genomics*, 4(1), 34. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-4-34>
- Ávalos Rangel, M. Á. (2015). Participación de la diguanilato ciclasa de *A. brasilense* en crecimiento y estrés [TESIS]. Instituto de Investigación en Ciencias Microbiológicas - BUAP.
- Bashan, Y., & de-Bashan, L. E. (2010). Chapter two - how the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—A Critical Assessment. In D. L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy* (Vol. 108, pp. 77–136). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8)
- Behr, S., Brameyer, S., Witting, M., Schmitt-Kopplin, P., & Jung, K. (2017). Comparative analysis of LytS/LytTR-type histidine kinase/response regulator systems in  $\gamma$ -proteobacteria. *PLOS ONE*, 12(8), e0182993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182993>
- Blatny, J. M., Brautaset, T., Winther-Larsen, H. C., Haugan, K., & Valla, S. (1997). Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 370–379. <https://doi.org/10.1128/aem.63.2.370-379.1997>
- Borland, S., Oudart, A., Prigent-Combaret, C., Brochier-Armanet, C., & Wisniewski-Dyé, F. (2015). Genome-wide survey of two-component signal transduction systems in the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum*. *BMC Genomics*, 16(1), 833. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1962-x>
- Buschiazzo, A., & Trajtenberg, F. (2019). Two-Component Sensing and Regulation: How do histidine kinases talk with response regulators at the

- molecular level? *Annual Review of Microbiology*, 73(1), 507–528.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091018-054627>
- Capra, E. J., & Laub, M. T. (2012). Evolution of two-component signal transduction systems. *Annual Review of Microbiology*, 66, 325–347.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150039>
- Cordero Rivera, C. D. (2017). Obtención de la mutación del gen *hkhB* de *Azospirillum brasilense* y análisis de su fenotipo. Instituto de Investigación en Ciencias Microbiológicas - BUAP.
- de la Fuente Cantó, C., Simonin, M., King, E., Moulin, L., Bennett, M. J., Castrillo, G., & Laplaze, L. (2020). An extended root phenotype: the rhizosphere, its formation and impacts on plant fitness. *The Plant Journal*, 103(3), 951–964. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tpj.14781>
- Dudek, C.-A., & Jahn, D. (2022). PRODORIC: state-of-the-art database of prokaryotic gene regulation. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D295-D302-undefined.
- Etesami, H., Mirseyed Hosseini, H., & Alikhani, H. A. (2014). Bacterial biosynthesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase, a useful trait to elongation and endophytic colonization of the roots of rice under constant flooded conditions. *Physiology and Molecular Biology of Plants: An International Journal of Functional Plant Biology*, 20(4), 425–434. <https://doi.org/10.1007/s12298-014-0251-5>
- Gamboa-Pérez, A. (2014). Participación de proteínas con dominios GGDEF en crecimiento de *Azospirillum brasilense* [TESIS]. Instituto de Investigación en Ciencias Microbiológicas - BUAP.
- 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>

- Grant, C. E., Bailey, T. L., & Noble, W. S. (2011). FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics*, 27(7), 1017–1018. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr064>
- Grintzalis, K., Georgiou, C. D., & Schneider, Y.-J. (2015). An accurate and sensitive coomassie brilliant blue G-250-based assay for protein determination. *Analytical Biochemistry*, 480, 28–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.03.024>
- Groicher, K. H., Firek, B. A., Fujimoto, D. F., & Bayles, K. W. (2000). The *Staphylococcus aureus* *IrgAB* operon modulates murein hydrolase activity and penicillin tolerance. *Journal of Bacteriology*, 182(7), 1794–1801. <https://doi.org/10.1128/JB.182.7.1794-1801.2000>
- Integrated DNA Technologies, Inc. (2023). OligoAnalyzer.
- Jung, K., Fried, L., Behr, S., & Heermann, R. (2012). Histidine kinases and response regulators in networks. *Current Opinion in Microbiology*, 15(2), 118–124. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.11.009>
- Lin, H., Deng, E.-Z., Ding, H., Chen, W., & Chou, K.-C. (2014). iPro54-PseKNC: a sequence-based predictor for identifying sigma-54 promoters in prokaryote with pseudo k-tuple nucleotide composition. *Nucleic Acids Research*, 42(21), 12961–12972. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1019>
- Ma, M., Welch, R. D., & Garza, A. G. (2021). The  $\sigma_{54}$  system directly regulates bacterial natural product genes. *Scientific Reports*, 11(1), 4771. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84057-4>
- Malusá, E., Sas-Paszt, L., & Ciesielska, J. (2012). Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *TheScientificWorldJournal*, 2012, 491206. <https://doi.org/10.1100/2012/491206>
- Mata, A. R., Pacheco, C. M., Cruz Pérez, J. F., Sáenz, M. M., & Baca, B. E. (2018). In silico comparative analysis of GGDEF and EAL domain

- signaling proteins from the *Azospirillum* genomes. *BMC Microbiology*, 18(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1157-0>
- Patel, K., & Golemi-Kotra, D. (2015). Signaling mechanism by the *Staphylococcus aureus* two-component system LytSR: role of acetyl phosphate in bypassing the cell membrane electrical potential sensor LytS. *F1000Research*, 4, 79. <https://doi.org/10.12688/f1000research.6213.2>
- Pedraza, R. O., Filippone, M. P., Fontana, C., Salazar, S. M., Ramírez-Mata, A., Sierra-Cacho, D., & Baca, B. E. (2020). Chapter 6 - *Azospirillum*. In N. Amaresan, M. Senthil Kumar, K. Annapurna, K. Kumar, & A. Sankaranarayanan (Eds.), *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 73–105). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00006-X>
- Promega Corporation. (2021, October). pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems.
- Puente, M. E., Li, C. Y., & Bashan, Y. (2009). Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. *Environmental and Experimental Botany*, 66(3), 389–401. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.04.010>
- Sambrook, J. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Third edition. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, [2001] ©2001. <https://search.library.wisc.edu/catalog/999897924602121>
- Sass, A., Vandenbussche, I., Bellich, B., Cescutti, P., & Coenye, T. (2022). Pellicle biofilm formation in *Burkholderia cenocepacia* J2315 is epigenetically regulated through WspH, a hybrid two-component system kinase-response regulator. *Journal of Bacteriology*, 204(5), e0001722–e0001722. <https://doi.org/10.1128/jb.00017-22>
- Sharma-Kuinkel, B. K., Mann, E. E., Ahn, J.-S., Kuechenmeister, L. J., Dunman, P. M., & Bayles, K. W. (2009). The *Staphylococcus aureus*

- LytSR two-component regulatory system affects biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 191(15), 4767–4775. <https://doi.org/10.1128/JB.00348-09>
- Spaepen, S., Bossuyt, S., Engelen, K., Marchal, K., & Vanderleyden, J. (2014). Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. *New Phytologist*, 201(3), 850–861. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.12590>
- Tague, J. G., Regmi, A., Gregory, G. J., & Boyd, E. F. (2021). Fis connects two sensory pathways, quorum sensing and surface sensing, to control motility in *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 669447. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.669447>
- Viruega-Góngora, V. I., Acatitla-Jácome, I. S., Reyes-Carmona, S. R., Baca, B. E., & Ramírez-Mata, A. (2020). Spatio-temporal formation of biofilms and extracellular matrix analysis in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*, 367(4), fnaa037. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa037>
- Wang, D., Xu, A., Elmerich, C., & Ma, L. Z. (2017). Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions. *The ISME Journal*, 11(7), 1602–1613. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.30>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>

## 14 ANEXOS

### 14.1 Anexo 1. Medio LB (Luria Berthani)

Es el medio rico en nutrientes más utilizado para el crecimiento de cepas recombinantes de *E. coli*. El medio contiene peptona, que es el producto de la digestión de la caseína de la leche y extracto de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El medio puede ser complementado con un antibiótico que permita la selección de clonas de *E. coli* que han sido transformadas con el plásmido que confiere la resistencia a tal antibiótico. La presencia de pequeñas cantidades de lactosa en el medio, junto con la adición de IPTG promueve la expresión de genes clonados en plásmidos que contienen tanto el promotor Lac como el pGEM-T-easy de Promega. El LB permite el crecimiento continuo y uniforme de *E. coli*, cuya fase de crecimiento exponencial termina cuando el medio contiene una DO 600 de 0.6-1.0 para entrar a la fase de crecimiento estacionaria.

Volumen en mL										
Componente	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Peptona de caseína	1.0 g	2.0 g	3.0 g	4.0 g	5.0 g	6.0 g	7.0 g	8.0 g	9.0 g	10.0 g
Extracto de levadura	0.5 g	1.0 g	1.5 g	2.0 g	2.5 g	3.0 g	3.5 g	4.0 g	4.5 g	5.0 g
NaCl	1.0 g	2.0 g	3.0 g	4.0 g	5.0 g	6.0 g	7.0 g	8.0 g	9.0 g	10.0 g
Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 1 N										
Agar bacteriológico	1.5 g	3.0 g	4.5 g	6.0 g	7.5 g	9.0 g	10.5 g	12.0 g	13.5 g	15.0 g
Esterilizar a 15 lb (121 °C) durante 20 min										

### 14.2 Anexo 2. Protocolo de restricción para liberar el gen *hkhB*

Para liberar el fragmento *hkhB* del plásmido pGEMhkhB-JB se realizó una digestión independiente con PvuII y una doble digestión rápida KpnI/BamHI.

Protocolo 1		Protocolo 2	
10x Nbuffer 3.1	4 µL	10x FastDigest	2 µL
PvuII	1 µL	KpnI	1 µL
DNA	12 µL	BamHI	1 µL
H <sub>2</sub> O-PCR	23 µL	DNA	10 µL
		H <sub>2</sub> O-PCR	7 µL

### 14.3 Anexo 3. Medio mínimo K-lactato

El medio mínimo con lactato se utiliza para el crecimiento de cepas de *Azospirillum baldaniorum* como una fuente de carbono alternativa.

**Preparación de la solución de oligoelementos:** disolver 0.21 g de  $MnSO_4$ , 0.28 g de  $H_3BO_3$ , 0.004 g de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0.024 g de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  y 0.004 g de  $CoSO_4 \cdot 7H_2O$  en 95 mL de agua bidestilada, aforar a 100 mL y esterilizar a 5 lb de presión por 30 min o con filtro de tamaño de poro de 0.22  $\mu m$ . Almacenar a temperatura ambiente (abrir en condiciones de esterilidad).

Componentes	Volumen en mL		
	100	500	1000
$KH_2PO_4$	0.087 g	0.435 g	0.87 g
$K_2HPO_4$	0.167 g	0.835 g	1.67 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.02 g	0.1 g	0.2 g
NaCl	0.01 g	0.05 g	0.1 g
Lactato de sodio 60%	0.63 mL	3.15 mL	6.3 mL
Ajustar pH a 6.8 con KOH al 10% y esterilizar a 5 lb durante media hora			
Una vez que se ha esterilizado la base, dejar enfriar y agregar las siguientes soluciones en condiciones de esterilidad:			
$CaCl_2$ 2%	0.1 mL	0.5 mL	1.0 mL
$FeCl_3$ 1%	0.1 mL	0.5 mL	1.0 mL
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.2%	0.1 mL	0.5 mL	1.0 mL
$NH_4Cl$ 20%	0.5 mL	2.5 mL	5.0 mL
Sol. de oligoelementos	0.1 mL	0.5 mL	1.0 mL
Finalmente, dejar a prueba de esterilidad a 30 °C toda la noche			

#### 14.4 Anexo 4. Medio NFB (C/N=2)

Es similar al NFB de rutina, con la variación de que tiene menos nitrógeno y carbono, de tal manera que se obtiene una relación C/N=2.

Para preparar 1 L de medio se tiene:

Acido málico	3.7 g
$K_2HPO_4$ 10%	5 mL
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10%	2 mL
NaCl 10%	1 mL
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1%	2 mL
Solución de micronutrientes <sup>1</sup>	2 mL
Fe-EDTA 1.64%	4 mL
Fuente de nitrógeno	
$KNO_3$	1.39 g
Ajustar a pH de 6.5 con KOH	
Esterilizar a 15 libras por 20 min	
1Solución de micronutrientes	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.200 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.235 g

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.280 g
CuSO <sub>4</sub> ·7H <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
Esterilizar a 15 libras por 20 min	

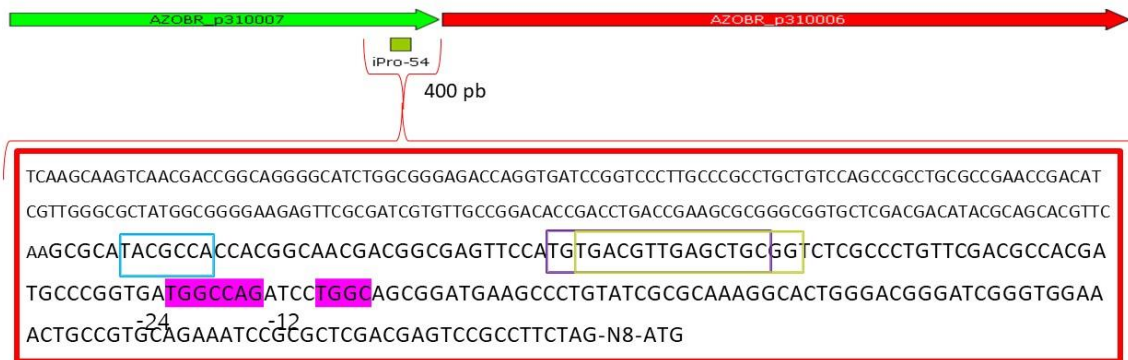
### 14.5 Anexo 5. Buffer fosfato (BF) 66 mM estéril

La preparación de esta solución se puede preparar de la siguiente manera:

Para 1L de agua destilada		Observaciones
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	9.08 g	Solo se utiliza un reactivo de PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> . El que se encuentre disponible.
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> (Anhidro)	9.372 g	
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	11.8 g	
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O	17.88 g	

Para 1 L de BF		Observaciones
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	392 mL	Una vez ya preparadas las soluciones de cada buffer se toman las cantidades indicadas.
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub>	608 mL	
Esterilizar a 15 libras por 20 min		

### 14.6 Anexo 6. Reguladores Transcripcionales

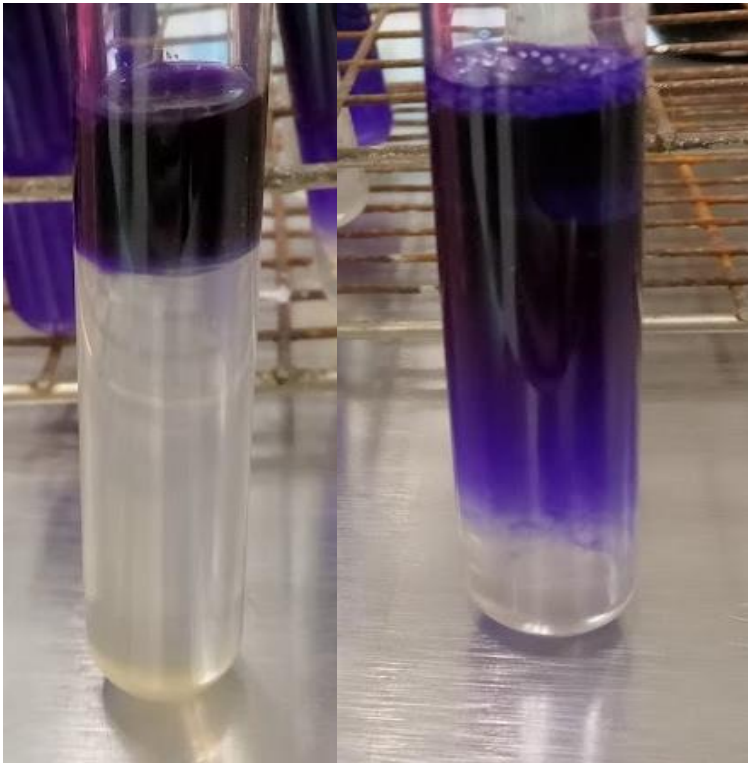


Factor	Secuencia	Score
NarL	TACGCCA	3.78
CRP	TGTGACGTTGAGCTGC	5.25
ArgR	TGACGTTGAGCTGCGG	5.6

#### 14.7 Anexo 7. Condiciones de PCR con los oligonucleótidos M13Fwd y RpJB3T

Condiciones de PCR		
95 °C	5 min	
95 °C	30 seg	30 ciclos
61 °C	30 seg	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

#### 14.8 Anexo 8. Tinción con cristal violeta de la cepa C5.56.



La densidad de la película formada por la cepa C5.56 en ocasiones no permitía el desplazamiento del cristal violeta hasta el fondo del tubo, por lo que se tenía que mover y dejar reposar más tiempo para alcanzar a teñir toda biopelícula formada.