



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Licenciatura en Biomedicina

Título:

Estudio bioinformático y fenotípico del gen “*luxO*” de *Azospirillum baldaniorum* Sp245

Tesis presentada para obtener el grado de:

Licenciado en Biomedicina

Presenta:

Oscar Mateo Ojeda Jr.

Director de tesis:

Dra. Beatriz Eugenia Baca

Codirector de tesis:

Dr. Alberto Ramírez Mata

Mayo 2025

## Índice de contenido

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>7</b>
<b>1. RESUMEN</b>	<b>9</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>10</b>
<b>2.1 <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp245</b>	<b>10</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Antecedentes generales</b>	<b>12</b>
3.1.1 Sistemas de doble componente.	12
3.1.2 Papel de los sistemas de doble componente en la interacción bacteria-planta.	14
3.1.3 Reguladores de Respuesta	15
3.1.4 Transcripción	17
3.1.5 Bacterial Enhancing Binding Proteins	18
<b>3.2 Antecedentes específicos</b>	<b>21</b>
3.2.1 LuxO	21
3.2.2 NtrC	22
3.2.3 Estudio de región adyacente a LuxO-L	23
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>26</b>
<b>5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>27</b>
<b>6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>27</b>
<b>7. HIPOTESIS</b>	<b>27</b>
<b>8. OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
<b>8.1 Objetivo general</b>	<b>28</b>
<b>8.2 Objetivos específicos</b>	<b>28</b>
<b>9. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
<b>9.1 Estrategia de trabajo</b>	<b>29</b>
<b>9.2 Análisis Bioinformático</b>	<b>29</b>

<b>9.3 Ensayo de conjugación bacteriana</b>	<b>30</b>
<b>9.4 Ensayo de curvas de crecimiento</b>	<b>30</b>
9.4.1 Determinación del tiempo de generación	31
<b>9.5 Ensayo de biopelícula</b>	<b>32</b>
9.5.1 Determinación de proteínas totales	32
<b>9.6 Ensayo de sensibilidad al sodio</b>	<b>33</b>
<b>9.8 Ensayo de floculación</b>	<b>33</b>
9.8.1 Cuantificación de floculación bacteriana	34
<b>10.RESULTADOS</b>	<b>35</b>
<b>10.1 Bioinformática</b>	<b>35</b>
10.1.1 Recuperación de la secuencia de nucleótidos	35
10.1.2 Búsqueda realizada en BlastX de eubacterias con proteínas similares a LuxO-L.	37
10.1.2 Creación de árbol filogenético de LuxO-L con software MEGA X	38
10.1.3 Árbol filogenético de homólogos de LuxO-L pertenecientes al género <i>Azospirillum</i> .	41
10.1.4 Árbol filogenético LuxO-L, LuxO y NtrC.	43
10.1.6 Análisis estructural de la proteína LuxO-L de <i>A. baldaniorum</i> Sp245	45
10.1.7 Análisis estructural del dominio REC de LuxO-L.	48
10.1.8 Análisis estructural del dominio AAA+ de LuxO-L.	51
10.1.9 Análisis estructural del dominio HTH de LuxO-L.	58
10.1.10 Búsqueda de homólogos de proteínas involucradas en Quorum sensing en <i>A. baldaniorum</i> Sp245.	59
<b>10.2 Obtención de la cepa control <i>A. baldaniorum</i> <math>\Delta</math>luxO (pBBR1MCS-5)</b>	<b>60</b>
<b>10.3 Curva de crecimiento en medio D</b>	<b>62</b>
<b>10.3.1 Tiempo de generación en medio D</b>	<b>63</b>
<b>10.4 Curva de crecimiento en K-malato</b>	<b>64</b>
<b>10.4.1 Tiempo de generación en K-malato</b>	<b>65</b>
<b>10.5 Biopelícula KNO<sub>3</sub></b>	<b>66</b>
<b>10.8 Susceptibilidad al NaCl en medio k-malato</b>	<b>67</b>
<b>10.8 Floculación bacteriana con KNO<sub>3</sub> en 24 y 48 hrs.</b>	<b>69</b>
<b>10.9 Floculación bacteriana con NH<sub>4</sub>Cl en 24 y 48 hrs.</b>	<b>71</b>
<b>11. DISCUSIÓN</b>	<b>73</b>

<b>12. CONCLUSIONES</b>	<b>82</b>
<b>13. PERSPECTIVAS</b>	<b>83</b>
<b>14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>84</b>
<b>15. ANEXOS</b>	<b>95</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Componentes de los sistemas de doble componente.	12
Figura 2. Sistemas de doble componente híbridos.	13
Figura 3. Fases de la transcripción de ADN.	17
Figura 4. Esquema de función de BEBP's.	19
Figura 5. Clasificación de los grupos con respecto a los dominios proteicos presentes en cada una de las BEBP's.	20
Figura 6. Modelo del mecanismo de <i>Vibrio spp.</i> , sus sistemas de dos componentes y sus receptores de QS (Quorum sensing).	22
Figura 7. Crecimiento alterado de <i>A. baldaniorum</i> Sp245 en Medio K-malato.	23
Figura 8. Resistencia Osmolar de <i>A. baldaniorum</i> Sp245 en Medio K-malato.	24
Figura 9. Predicción de dominios por SMART PROTEIN.	35
Figura 10. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de LuxO-L ( <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp245), NtrC1 ( <i>Aquifex aeolicus</i> ), LuxO ( <i>Photobacterium augustum</i> ), NtrC4 ( <i>Aquifex aeolicus</i> ), LuxO ( <i>Vibrio cholerae</i> ).	37
Figura 11. Árbol de homólogos LuxO-L (100 secuencias recuperadas del NCBI usando BLASTX).	40
Figura 12. Árbol filogenético de homólogos entre el género <i>Azospirillum</i> .	41
Figura 13. Árbol filogenético de LuxO-L, LuxO y NtrC I.	44
Figura 14. Modelado de LuxO-L con Alphafold-3.	45
Figura 15. Alineamiento y selección de la predicción más adecuada usando la base de datos del PDB (Protein Data Bank).	47
Figura 16. Estructura del dominio REC de LuxO-L ( <i>A. baldaniorum</i> Sp245).	49
Figura 17. Alineamiento del dominio REC de LuxO-L de <i>A. baldaniorum</i> Sp245.	50
Figura 18. Supuesta cavidad de interacción de LuxO-L, LuxO (5EP2) y NtrC I (4L4U).	53
Figura 19. Generación de alineamiento y análisis estructural entre homólogos del dominio AAA+ de LuxO-L.	54
Figura 20. Modelado del motivo GAFTGA.	56
Figura 21. Representación esquemática de la conservación del motivo GAFTGA.	56
Figura 22. Modelado del linker probable y posición de la glicina 141.	57
Figura 23. Dominio HTH presente en LuxO-L.	58
Figura 24. Alineamiento de la secuencia aminoacídica del dominio HTH.	59
Figura 25. Comprobación de la conjugación de <i>A. baldaniorum</i> $\Delta$ luxO ( <i>pBBR1MCS-5</i> ).	61
Figura 26. Curva de crecimiento de cepas de <i>A. baldaniorum</i> Sp245 en medio Difco (D).	62
Figura 27. Curva de crecimiento de <i>A. baldaniorum</i> Sp245 en medio k-malato.	64
Figura 28. Generación de biopelícula KNO <sub>3</sub> .	66
Figura 29. Sensibilidad al NaCl a 15 hrs.	67
Figura 30. Sensibilidad al NaCl a 22 hrs.	68
Figura 31. Floculación bacteriana en KNO <sub>3</sub> a 24 hrs.	69
Figura 32. Floculación bacteriana en KNO <sub>3</sub> a 48 hrs.	70
Figura 33. Floculación bacteriana en NH <sub>4</sub> Cl a 24 hrs.	71
Figura 34. Floculación bacteriana en NH <sub>4</sub> Cl a 48 hrs.	72

## Índice de tablas

Tabla 1. Proteínas pertenecientes a sistemas de QS en <i>Vibrio</i> .	59
Tabla 2. Tiempo de generación a las 16 y 18 hrs de <i>A. baldaniorum</i> Sp245 en medio Difco.	63
Tabla 3. Tiempo de generación a las 16 y 18 hrs de <i>A. baldaniorum</i> Sp245 en medio k-malato.	65

## Índice de Anexos

Anexo 1. Tabla de alineamientos usando BLAST de eubacterias.	95
Anexo 2. Tabla de alineamientos homólogos internos en <i>A. baldaniorum</i> Sp245.	96
Anexo 3. Alineamiento y selección de predicción más adecuada entre las 5 que genera el programa AlphaFold-3 usando la base de datos del Swiss-model.	96
Anexo 4. Alineamiento del dominio AAA+ de NtrX ( <i>Aquifex aeolicus</i> ), NtrC1 ( <i>Aquifex aeolicus</i> ), FleQ ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ), LuxO ( <i>Vibrio spp.</i> ), LuxO-L ( <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp245).	97
Anexo 5. Alineamientos entre dominio HTH de LuxO y LuxO-L.	98
Anexo 6. Alineamientos entre dominio HTH de NtrC1 y LuxO-L.	98
Anexo 7. Predicción de monómero de LuxO-L.	98
Anexo 8. Predicción del dominio REC	99
Anexo 9. Predicción del dominio AAA+	99
Anexo 10. Predicción del dominio HTH.	100

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dedicar esta tesis principalmente a mis padres por siempre darme todo el apoyo que necesite tanto monetario como en espíritu, muchas gracias Oscar y Ruth, a mis hermanos por ser un gran apoyo y siempre preguntar al respecto de mi trabajo, gracias por interesarse por lo que me apasiona, muchas gracias Oliver, Orlando y Osvaldo, a mis abuelos por siempre estar para mí y creer en mí, yo sé que a veces fue demasiado por manejar pero me enseñaron a ver la vida de manera diferente, muchas gracias María Luisa y Mariano, a mis amigos que nunca dejaron de apoyarme y alentarme, muchas gracias Isaac, Ángel, Diego, Erika, Aline, Derek y Gama, a mi novia Dafne por todo el apoyo y ayuda que me brindo en los días interminables de experimentos, a mis profesores de la carrera por siempre hacerme soñar con algo más allá de lo convencional, muchas gracias por sus consejos y apoyo, así como a mi familia por ser parte fundamental de mi vida y mostrar siempre su apoyo incondicional, este logro es de todos.

Muchas gracias, Dra. Beatriz Eugenia Baca, por ser mi mentora y convertirse en una persona vital en mi formación profesional, así como por ser siempre una fuente de apoyo e inspiración.

Muchas gracias, Dr. Alberto Ramírez Mata, por las tardes de discusión y el apoyo mostrado a las ideas que le presentaba.

Muchas gracias, Dra. Sandra Raquel Reyes por ser siempre una persona que mostro su apoyo incondicional y ser una persona que me permitía discutir al respecto de mi trabajo.

Muchas gracias, Mtra. María Luisa Xiqui por guiarme, entrenarme y recibirme con los brazos abiertos, así como exigirme a siempre mejorar e interesarse por mi trabajo.

A todos ustedes siempre los llevaré conmigo a donde sea que me lleve la vida. Siento una profunda felicidad por completar esta parte de mi formación y también una emoción incontenible por comenzar un nuevo capítulo en mi camino científico. Agradezco a todos de corazón el apoyo que se me brindó, agradezco al laboratorio de la Interacción Bacteria-Planta por apoyarme y dejarme formar parte, pero sobre todo agradezco a mi alma mater, la

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por darme las herramientas para continuar mi camino profesional. Este no es el final del camino, es un hasta pronto...

**“Un científico es un niño que nunca creció”**

-Neil deGrasse Tyson

## 1. RESUMEN

*Azospirillum baldaniorum* Sp245 es una bacteria promotora de crecimiento vegetal capaz de generar un efecto benéfico a las plantas que se encuentran colonizadas, su biopelícula, movilidad, crecimiento y comunicación celular, así como su amplia gama de fenotipos juegan un papel vital para su correcta interacción con la planta, funcionamiento y desarrollo. Durante el estudio del genoma bacteriano de *A. baldaniorum* Sp245 se encontró un set de 5 genes que se localizan en tándem, con regiones intergenicas cortas, rasgos que sugieren formar parte de un operón, ubicados en el plásmido 3, cuya importancia e implicaciones en la correcta colonización bacteriana está en estudio. Hasta el momento se predice y se ha iniciado el estudio filogenético de este grupo de genes cuyos productos de traducción indican que está compuesto por 2 histidinas cinasas y 3 reguladores de respuesta, entre estos genes que dan lugar a sus reguladores de respuesta se encuentra el gen “*luxO*” que transcribe para la proteína LuxO-like. La proteína LuxO-like se presume tiene similitud con la superfamilia de proteínas NtrC una familia de proteínas que pertenece a las *Bacterial Enhancing Binding Proteins* (BEBP’s, acrónimo del inglés) y que mantiene estrecha relación con el metabolismo de nitrógeno, sin embargo, se encuentra otra familia con la que comparte mucha similitud por tener el mismo nombre, presentes en *Vibrio cholerae* y otras eubacterias. La proteína LuxO de *V. cholerae* está relacionada con el control de los comportamientos individuales o grupales de la bacteria (Quorum Sensing) lo que le permite ser altamente patogénica y tener una exitosa colonización así como controlar el cambio de vida sésil a móvil.

En trabajos previos se generó una mutante en el gen “*luxO*”, una sobreexpresión y una complementación, sobre las cuales se centró este trabajo al analizar distintos fenotipos modificando diversas condiciones en relación con la fuente de nitrógeno y bioinformáticamente comparando ambas proteínas (NtrC y LuxO) para tratar de clasificar a la proteína LuxO-like de *A. baldaniorum* Sp245. Los datos obtenidos indican que el gen *luxO* interviene en el crecimiento celular, tiempo de generación, floculación y sensibilidad al sodio.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 *Azospirillum baldaniorum* Sp245

La bacteria *Azospirillum baldaniorum*, es Gram negativa, perteneciente a las alfa-proteobacterias y considerada una Plant Growth Promoting Bacteria, (PGPB, acrónimo del inglés), la cual produce y secreta fitohormonas como el ácido indol-3-acético (AIA), giberelinas y citocininas; así como el óxido nítrico (NO), generando un efecto benéfico a las plantas con las que se asocia. Responde a estímulos emitidos por la planta y del entorno en que se localiza, para una colonización eficiente con la planta hospedera. La bacteria cuenta con un flagelo polar de una longitud grande y varios flagelos laterales de menor longitud; su forma es parecida a un bastón retorcido bacilar, produce gránulos del polímero poli-hidroxi-butilato (PHB) y fija nitrógeno. Se considera que *A. baldaniorum* pudo haber evolucionado para adaptarse a vivir en tierra incluso antes que el cambio se presentara en otras bacterias <sup>(1)</sup>.

La bacteria se encuentra distribuida ampliamente alrededor del mundo en diversos ecosistemas incluidos ambientes de importancia agrícola como en cultivos de caña de azúcar, maíz, arroz, etc <sup>(2)</sup>. De aquí la importancia de estudiarla, ya que puede contribuir a mejorar la calidad del suelo y propiciar la interacción con la planta, que le permitan a ésta obtener los nutrientes necesarios para crecer de manera más eficiente <sup>(3)</sup>.

El género *Azospirillum* es uno de los grupos más estudiados y del que más se utiliza en la agricultura, se conocen más de 27 especies de este género, y se ha descrito que este microorganismo puede colonizar hasta 100 especies de plantas. Su rol en el crecimiento de la planta, desarrollo y producción en condiciones ambientales normales ha sido ampliamente estudiado. Varios mecanismos se han detallado por los cuales esta bacteria puede llevar a cabo su papel como PGPB, entre ellos están la producción de sideróforos, solubilización de los fosfatos, fijación de nitrógeno y producción de hormonas, además de la protección contra patógenos y estrés abiótico <sup>(4)</sup>.

La colonización de *Azospirillum* en las raíces es el primer requisito para que se pueda llevar a cabo la simbiosis entre ambos organismos, se conoce que los mecanismos por los que promueve el crecimiento de la planta pueden ser de manera directa e indirecta, ya que coloniza generalmente el exterior de las raíces; sin embargo, se ha indicado que algunas cepas de *Azospirillum* como *A. baldaniorum* Sp245 pueden colonizar de manera endofítica la planta <sup>(5)</sup>.

Se ha descrito que, para que la bacteria ejerza su efecto benéfico en la planta hospedera es necesaria una colonización eficiente. Para lo cual la bacteria se dirige hacia la planta por la quimiotaxis debido a los componentes presentes de los exudados radiculares; posteriormente se presenta una asociación débil reversible, seguida de una interacción fuerte para formar biopelículas estructura que le permite una colonización exitosa. El segundo mensajero de importancia en el proceso de colonización y desarrollo de biopelícula en *Azospirillum* es el di-GMP-cíclico quien tiene un papel regulatorio fundamental en el proceso de adaptación al nuevo ambiente y formación de biopelícula. El di-GMPc participa en diferentes vías de señalización, relacionadas con los sistemas de doble componente cuyos genes están presentes en las secuencias genómicas descritas de este género bacteriano, distribuidos en el cromosoma y los 6 plásmidos presentes <sup>(6)</sup>. Hasta el momento, de la mayoría de los TCS son de función desconocida por lo que aún no queda claro si tienen algún impacto en la vida y desarrollo de esta bacteria <sup>(7)</sup>.

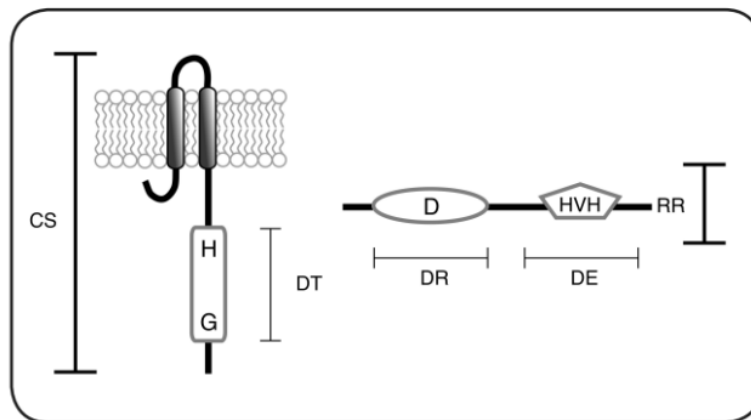
Lo poco que se conoce de esta bacteria hace que su estudio sea un parteaguas en la investigación para el mejoramiento agrícola y también el uso de este microorganismo como un biofertilizante. En el futuro se espera que se conozcan muchos más mecanismos de acción que trabajen sobre su actividad regulatoria de crecimiento en plantas, se considera que no hay un mecanismo por el cual *Azospirillum* regule de manera única el ambiente y genere las condiciones necesarias para el crecimiento de la planta, por lo que se tiene la hipótesis aditiva en la que se trata de explicar que es la suma de todas sus propiedades lo que propicia que la bacteria pueda tener un impacto significativo en la planta y su ambiente <sup>(8)</sup>.

## 2. ANTECEDENTES

### 3.1 Antecedentes generales

#### 3.1.1 Sistemas de doble componente.

En bacterias, los sistemas de doble componente (TCS acrónimo del inglés) son de vital importancia para que los microorganismos regulen procesos críticos para su supervivencia como la señalización celular, adaptación y respuesta al ambiente. Estos sistemas constan de una histidina cinasa (HK, acrónimo del inglés) y un regulador de Respuesta (RR) en el caso de las Histidinas Cinasas clásicas (**Fig. 1**)<sup>(9)</sup>.

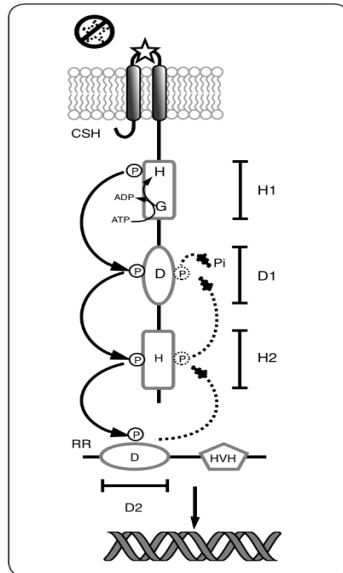


**Figura 1. Componentes de los sistemas de doble componente.**

Los TCS están constituidos por un dominio de entrada (CS) que tiene a su vez, un subdominio transmisor (DT con un residuo Has (H) y un dominio de unión a nucleótidos importante para la unión de ATP conocido como caja G (G). Los RR tienen un dominio receptor (DR) que contiene el Asp fosforilable (D) y además posee un dominio efector (DE). Extraído de “Los sistemas de dos componentes: circuitos moleculares versátiles.”<sup>(9)</sup>.

Además, se han descrito otro tipo de sistemas de señalización más complejos que involucran a las cinasas de tipo híbrido denominadas como Histidina Cinasas híbridas (HyHK's, acrónimo del inglés) importantes para la célula bacteriana y que muestran una respuesta más compleja a algún estímulo externo, así como una mejor adaptación al entorno.- Estos sistemas funcionan con base en reacciones de transferencia del grupo fosfato entre la proteína que detecta la señal (HK, acrónimo del inglés), y el Regulador de Respuesta (RR). Los

monómeros de HK se auto fosforilan en un residuo conservado de Histidina localizado en la región transmisora para posteriormente pasar ese fosfato a un residuo de aspartato localizado en el dominio del receptor (REC), finalmente, el regulador de respuesta comienza su función modulando a factores de transcripción o modificando la conformación de proteínas específicas <sup>(6)</sup> **(Fig.2)**.



**Figura 2. Sistemas de doble componente híbridos.**

Cuenta con un dominio sensor de la cinasa sensor híbrida (CSH), lo que hace que se tenga una autofosforilación dependiente de ATP, en el residuo conservado de Histidina (H), incluido el dominio transmisor primario (H1). Después sucede una transferencia del grupo fosfato al residuo de aspartato (D) en el dominio transmisor receptor (D1) y al dominio transmisor secundario (H2). Para concluir este relevo, el grupo fosforilo se transfiere al residuo Asp conservado en el dominio receptor (D2) del Regulador de Respuesta activándolo para que lleve a cabo su función. En la falta de señal, la CSH actúa como una fosfatasa, por lo que el grupo fosforilo se elimina del residuo Asp y se libera al medio como fosfato inorgánico (Pi). Extraído de “Los sistemas de dos componentes: circuitos moleculares versátiles.” <sup>(9)</sup>.

Los sistemas de doble componente son de gran importancia debido a su compleja regulación y las diversas funciones que cumplen como la regulación del metabolismo, Quorum Sensing (QS, acrónimo del inglés), virulencia, respuesta a estrés, entre otras. Los sistemas en los que participan las histidinas cinasas híbridas (HyKH) varían con respecto a las clásicas u ortodoxas (HK), debido a la presencia de un motivo de fosforelevo que es capaz de donar su fosfato, así como aceptarlo de regreso, este dominio proteico también es conocido como domino de fosfotransferencia (Hpt acrónimo del inglés) y se ve implicado en una amplia gama de procesos de respuesta debido a su complejidad <sup>(9)</sup>.

### 3.1.2 Papel de los sistemas de doble componente en la interacción bacteria-planta.

Las histidinas cinasas híbridas son sistemas más complejos con relación a las histidinas cinasas clásicas u ortodoxas, esto debido a la especificidad de señal que transmiten, ya que pueden contar hasta con 4 relevos de fosfato dentro de la proteína propiciando así una red mucho más compleja de interacciones <sup>(6)</sup>. Un tipo de histidina cinasa clásica participa en la regulación de la quimiotaxis, debido a la respuesta que se genera al percibir exudados de la planta, de tal manera que la bacteria responde a ese estímulo colonizando las raíces. En *Azospirillum* la vía de CheA (HK) y su fosforilación a los RR CheY y CheB en los residuos de aspartato, conducen a cambios de dirección en el motor flagelar logrando así una respuesta a exudados de raíces e incluso puede responder a concentraciones de O<sub>2</sub>. Las vías de señalización son dependientes del ambiente e incluso pueden serlo de la energía del sistema y del estado celular para desarrollar o no quistes en condiciones de estrés nutricional <sup>(10)</sup>.

Los nódulos bacterianos formados por algunas bacterias fijadoras de nitrógeno representan un ejemplo de interacciones simbióticas que requieren de expresión específica de genes tanto de las plantas como de las bacterias. La regulación del oxígeno en estos nódulos es de vital importancia para evitar el daño a la actividad de la nitrogenasa. En *Sinorhizobium meliloti* se describió un sistema de HK clásico (Doble componente) que percibe O<sub>2</sub>, lo que lleva a cambios conformacionales en la histidina cinasa (FixL), que se auto fosforila en ausencia de O<sub>2</sub> y transfiere el grupo fosfato al RR (FixJ), el cual es un regulador transcripcional activado por fosforilación del residuo de aminoácido aspartato (D), éste a su vez activa al regulador transcripcional NifA, activador de la transcripción de los genes Nif <sup>(11)</sup>.

El género de *Pseudomonas* contiene diversos TCS que actúan de distinta manera a la respuesta a estrés oxidativo, metabolismo de carbono, homeostasis de hierro y motilidad <sup>(12)</sup>. En el sistema Gac-Rms intervienen tres histidinas cinasas para regular la capacidad de biocontrol de *Pseudomonas protegens* CHA0, denominadas RetS, LadS y GacS. De manera interesante se describió que la cinasa RetS se modula por temperatura, específicamente por arriba de los 35°C se inhibió la producción de los metabolitos 2,4-diacetylphloroglucinol y cianuro de hidrógeno, que son los responsables de los efectos de biocontrol. Tanto RetS como

LadS modulan a la cinasa GacS de forma negativa y positiva, respectivamente, quien es activada por quorum sensing <sup>(13)</sup>.

Este sistema en *P. protegens* CHA0 es muy complejo y se ha denominado sistema multicomponente <sup>(14)</sup> en donde intervienen al menos tres histidinas cinasas híbridas para regular varios fenotipos en la interacción con las plantas. Este sistema también está presente en el patógeno *Pseudomonas aeruginosa* en donde además de modular la formación de biopelículas, virulencia, el sistema de secreción tipo III y movilidad, regula la transición de la infección de aguda a crónica <sup>(15)</sup>.

### 3.1.3 Reguladores de Respuesta

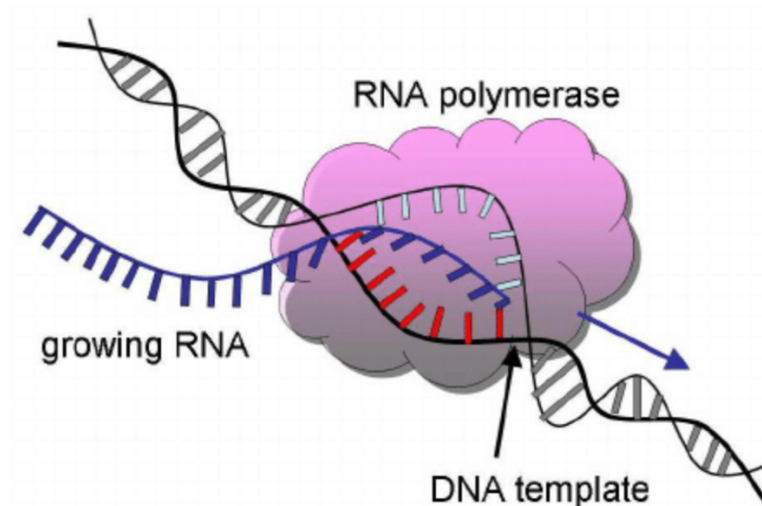
Los reguladores de respuesta cuentan con un dominio REC que es el sitio donde se lleva a cabo la fosforilación en el residuo conservado de aspartato (D). Debido a su función como switch y sus estados activo o inactivo, el dominio REC puede mediar las funciones efectoras de la proteína gracias a interacciones intramoleculares o intermoleculares presentes. Generalmente las secuencias de dominios REC comparten el 20%-30% en identidad de su secuencia de aminoácidos, de igual manera estos RR tienen la capacidad de unirse covalentemente o no a diversos efectores, es por esto que tienen una enorme capacidad de llevar a cabo respuestas variadas. Es importante destacar que dependiendo del tipo de dominio con el que cuente el RR, será la acción que podrá realizar, la mayoría de los RR's cuentan con dominios de unión a ADN como es el caso de "LuxO", "OmpR", etc., sin embargo, existen diversos dominios que intervienen en el proceso de fosforrelevo, unión a ARN e incluso algunos tienen actividad enzimática. Dentro de esta variedad se encuentran muchos más RR con dominio de unión a ADN, esta irregularidad puede deberse a la necesidad de controlar los procesos que demanda una alta regulación transcripcional ocasionada por los cambios en el ambiente de la bacteria. Se ha observado que la frecuencia con la que se lleva a cabo la autofosforilación y desfosforilación de los RR es variable <sup>(16)</sup> independientemente de la geometría estructural conservada entre proteínas, se ha propuesto que la actividad enzimática de algunos dominios REC ha evolucionado de manera conjunta con su dominio efector de regulación, estos residuos conservados modulan la estabilidad de la fosforilación en los RR debido a la respuesta de los sistemas de doble componente <sup>(17)</sup>.

La regulación que se da en estos RR esta inevitablemente ligada a su capacidad de fosforilación en su residuo de aspartato conservado estableciendo una conformación activa que a su vez desactiva la conformación efectora del dominio, esta regulación puede no ser la única usada pues es posible que haya modificaciones postraduccionales en algunos otros sitios de la proteína, ya sea alterando el equilibrio del dominio REC o directamente alterando el dominio efector, por ejemplo la regulación por la unión de grupos funcionales como el acetilo a la proteína de manera reversible que confiere la capacidad de regular enzimas del metabolismo y transcripción bacteriana <sup>(18)</sup>.

Aún hoy en día se sigue teorizando como es que este dominio puede regular tantas actividades de los RR, se cree que es debido a su complejidad, así como la diversidad que genera el poder responder y variar la cantidad que existen en una bacteria.

### 3.1.4 Transcripción

La transcripción ocurre en todos los seres vivos, constituye el proceso de expresión génica, la cual permite a partir de una molécula de ADN, sintetizar proteínas usando como intermediario al ARN. En este proceso se lleva cabo la lectura de secuencias de nucleótidos en el ADN que serán transcritos en una molécula de ARN, la única diferencia con respecto al ADN es el uso de una base de uracilo en lugar de una timina (**Figura 3**).



**Figura 3. Fases de la transcripción de ADN.**

Extraído de “Parametric Resonance in a Mesoscopic Discrete DNA Model”<sup>(19)</sup>

Este proceso debe llevarse a cabo de manera eficiente, de tal manera que las células tienen diversos mecanismos por los cuales son capaces de realizar esta acción minimizando los errores que se presentan, esto gracias al uso de reguladores de la transcripción (proteínas que marcan sitios de transcripción para controlar la expresión génica). En organismos eucariotas o procariotas se presentan ciertas diferencias que están ligadas a la naturaleza del organismo y su complejidad.

Este proceso está dividido en tres etapas:

- La **iniciación** comienza cuando la ARN Pol se une a un sitio en la cadena de ADN llamado región promotora que se encuentra al inicio de los genes, en este sitio actúan

diversas enzimas que van a separar la hebra de ADN para que la RNA Pol usando la cadena sencilla de ADN como molde comience la síntesis en dirección 5' a 3'.

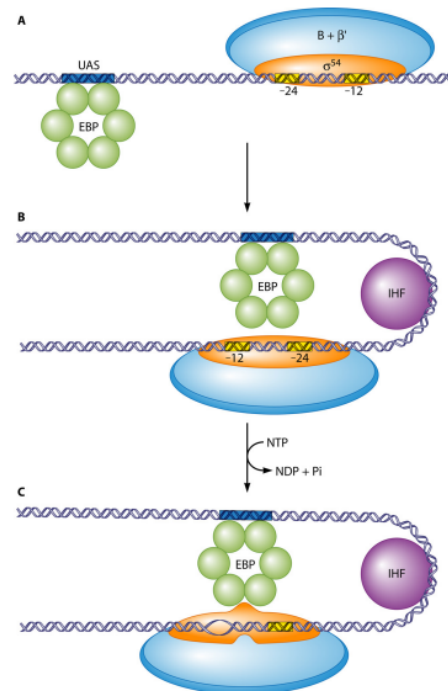
- La **elongación** continua cuando la cadena molde de ADN actúa como una plantilla para que la ARN Pol actúe leyendo el código de nucleótidos formando así una cadena complementaria a lo que se transcribe también en dirección 5' a 3', este transcrito tiene la misma información que la cadena complementaria al molde en donde vienen las instrucciones de la síntesis del gen.
- La **terminación** está determinada por secuencias de nucleótidos llamadas “secuencias terminadoras de la transcripción” que indican que se ha completado el transcrito y provocan que la ARN Pol libere el transcrito de ARN.

Durante el proceso de transcripción es importante recalcar que puede haber varios procesos por los cuales se esté llevando a cabo una regulación de la iniciación o terminación por diferentes modelos gracias a proteínas que se encuentran circulando todo el tiempo inactivando o activando la transcripción como son los “factores sigma” (E, 70, 54, etc.). En el caso de procariontes e igualmente como en el caso de eucariontes, el superempaquetamiento también juega un papel como regulador del proceso, permitiendo o no llevar a cabo la transcripción, en el caso de terminación de igual manera las proteínas “Rho” colabora a que este proceso se lleve a cabo en el sitio de terminación transcripcional <sup>(20)(21)</sup>.

### 3.1.5 Bacterial Enhancing Binding Proteins

Las *Bacterial Enhancing Binding Proteins* (BEBPs, acrónimo del inglés) son proteínas que ayudan a llevar a cabo la transcripción del ADN en algunas bacterias, estas proteínas trabajan en unión con la subunidad sigma 54, que funciona de manera distinta a la sigma 70, está establecido que en el caso de sigma 54 se necesita de un promotor específico para que se pueda llevar a cabo el proceso de transcripción, mientras que en sigma 70 basta con solo formar la holoenzima de la RNAPol. Las BEBPs se unen a regiones específicas del ADN a una distancia río arriba de donde se une la RNA Pol que varía entre los -80 a -150 nucleótidos. Para el correcto funcionamiento de los BEBPs es necesaria la participación de la proteína de factor de integración del huésped contribuyendo al plegamiento para que puedan llevar a cabo su función de manera correcta, principalmente estabilizando el complejo sigma 54-RNA Pol,

que por sí solo en forma cerrada es favorable energicamente por lo que sigma 54 es considerada dependiente de los BEBPs pues solo con su ayuda y la fosforilación de los mismos es capaz de entrar en acción al cambiar las condiciones cuando entra en contacto con estas proteínas<sup>(22)</sup> solo así es como se lleva a cabo la transición de estado cerrado a estado abierto del complejo proteico, sigma 54 se une a regiones del ADN -12 y -24 generalmente en una región ultra conservada siendo distinto el sitio de unión con respecto a sigma 70 que se une en los sitios -10 y -35<sup>(22)</sup>.



**Figura 4. Esquema de función de BEBP's.**

A) La BEBP se une a la región UAS río arriba de la región promotora sigma-54 B) Con la llegada de IHF se genera el doblés en el ADN lo que acerca los dominios AAA+ y Sigma-54 para llevar a cabo la hidrólisis de ATP C) El complejo cerrado de sigma-54-RNAPol se abre gracias a la desestabilización generada por la BEBP's y se lleva a cabo la traducción del ORF. Extraído de "The Role of Bacterial Enhancer Binding Proteins as Specialized Activators of  $\sigma$ 54-Dependent Transcription"<sup>(22)</sup>.

Sigma 54 está conformado por III regiones que ayudan a que pueda llevar sus funciones de manera natural- La región uno previene que se pueda abrir el complejo Holo-enzimático evitando así que se lleve a cabo una transcripción espontanea, la región II juega un papel importante en la unión de estas proteínas con el ADN y la región III contiene determinantes para la unión de la RNA Pol a la subunidad<sup>(22)</sup>.

Los BEBPs generalmente están conformados por 3 dominios, el dominio regulatorio N-terminal que tiene un papel importante en la percepción de la señal y modula su actividad, el dominio AAA+ que es el responsable de la hidrólisis del ATP y por último el dominio C-Terminal que está relacionado con la unión del RR a su sección específica en el ADN, por consecuencia los BEBPs se han dividido en 5 grupos dependiendo del dominio con los que cuentan, que pueden variar dependiendo de la estructura y la función (**Figura 5**).

	R domain(s)	C domain	D domain
<b>Group I</b>	NtrC	RR	
	NtrC1	RR	
	NtrC4	RR	
	DctD	RR	
	ZraR	RR	
<b>Group II</b>	XylR	XylR_N V4R	
	DmpR	XylR_N V4R	
	TyrR	ACT PAS	
<b>Group III</b>	FhlA	GAF GAF	
	NorR	GAF	
	NifA	GAF	
<b>Group IV</b>	PspF	PspA	
	HrpR	HrpV	
	HrpS		
<b>Group V</b>	FlgR	RR	

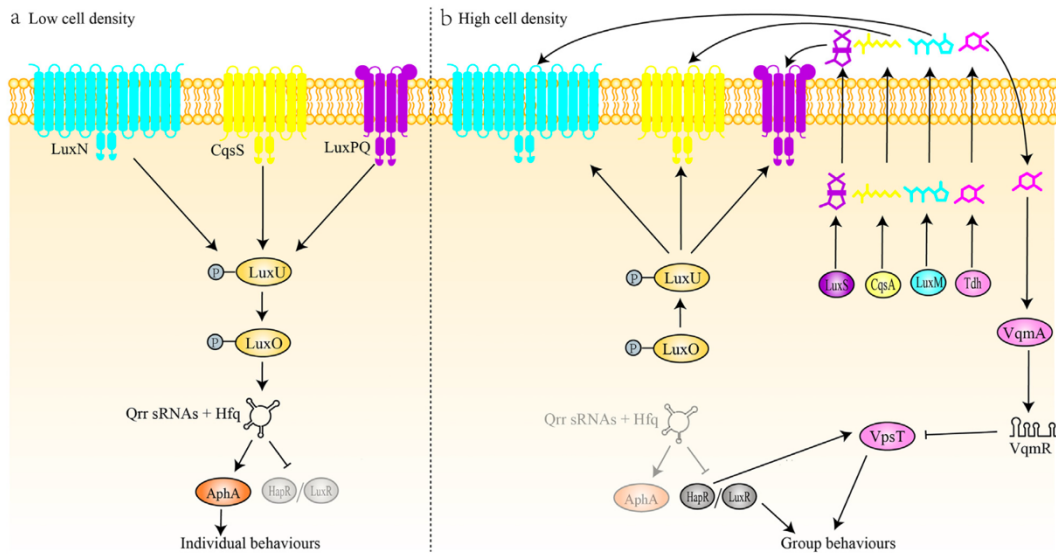
**Figura 5. Clasificación de los grupos con respecto a los dominios proteicos presentes en cada una de las BEBP's.**

Se pueden observar los grupos de proteínas distribuidos en 5 categorías y los 3 principales dominios pertenecientes a las BEBP's junto con sus combinaciones y ejemplos de las proteínas de esta familia: El dominio (R) que es el sensor de la proteína, el dominio (C) que pertenece generalmente al dominio AAA+ (ATPasa) y el dominio (D) dominio efector principalmente es un dominio de unión al ADN (HTH). Extraído de "The Role of Bacterial Enhancer Binding Proteins as Specialized Activators of  $\sigma$ 54-Dependent Transcription" <sup>(21)</sup>.

## 3.2 Antecedentes específicos

### 3.2.1 LuxO

La proteína LuxO es clasificada como una BEBP's del grupo 1, esta proteína funciona como un factor transcripcional que activa la transcripción de sRNA (RNAs pequeños) <sup>(23)</sup>, que a su vez llevan a cabo una nueva regulación transcripcional en el organismo *V. cholerae* considerado como un patógeno importante al rededor del mundo gracias a su adaptabilidad y facilidad para el aumento de su virulencia a parte de su capacidad de formar epidemias <sup>(24)</sup>. LuxO es una proteína que contiene tres dominios principales: Un dominio REC que recibe el fosfato gracias a la conservación de un D (Aspartato) fosforilable, un domino de ATPasa AAA+ que ayuda a generar la energía y desestabilizar el complejo cerrado de la polimerasa cuando se regula a través de sigma 54 y un domino HTH específico para su secuencia consenso <sup>(25)</sup>, la forma activa de LuxO se da cuando la proteína adopta la estructura de hexámero con forma de dona no cerrada capaz de interaccionar con el ADN <sup>(26)</sup>. La principal función de LuxO es la comunicación celular a través de la respuesta a la densidad celular, para ello esta BEBP's en casos de una densidad celular baja se fosforila y genera una cascada de señalización a través de otras proteínas que permite responder al cambio como son LuxU (Htp) y LuxQ (HK), el mecanismo indirecto de regulación es uno de los muchos con los que cuenta *Vibrio* pues puede responder a más de una señal de las Homoserinolactonas. Cuando *V. cholerae* pasa de vida sésil a móvil o incluso cuando aumenta su virulencia al entrar en contacto con el ser humano, esta respuesta y adaptabilidad se debe a la comunicación intercelular a través del Quorum Sensing que es el principal campo de estudio de donde se ha obtenido información acerca LuxO.



**Figura 6. Modelo del mecanismo de *Vibrio* spp., sus sistemas de dos componentes y sus receptores de QS (Quorum sensing).**

A) En condiciones de baja densidad Lux N, Lux PQ y CqsS actúan como sintasas de LuxU que a su vez va a fosforilar a LuxO (23), una vez que este fosforilado LuxO funciona como una BEBP que se une a las regiones UAS antes del promotor de los RNAs pequeños denominados (Qrrs 1-4) (26) que se encuentran en ambos cromosomas y regulan actividades de comportamientos individuales. B) En condiciones de alta densidad celular por detección de la concentración de auto inductores las sintasas previas se convierten en fosfatasas Lux N, Lux PQ y CqsS, defosforilando LuxU (Proteína soluble de tipo Hpt) y deteniendo a su vez la fosforilación de LuxO y la consecuente creación de los Qrrs generando una regulación en los comportamientos de grupo. Extraído de "Research progress of bacterial quorum sensing receptors: Classification, structure, function and characteristics" (27).

### 3.2.2 NtrC

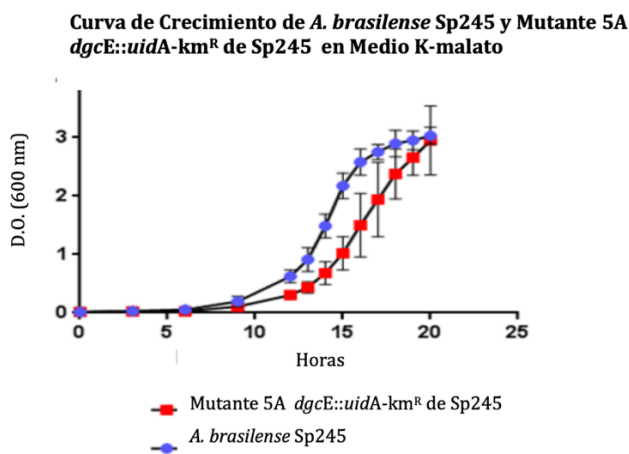
La proteína NtrC se encuentra altamente conservada entre varias especies de bacterias, esta proteína tiene como función principal estar relacionada con el metabolismo del nitrógeno (28), es una proteína reguladora que generalmente necesita formar un oligómero para llevar a cabo su función de regulación, esta proteína cuenta con un dominio REC, un dominio AAA+ y un dominio HTH (22).

Su interacción ha sido ampliamente estudiada, con un avance importante en el contexto de funciones o vías en las que se implica (29). Generalmente la función de la proteína NtrC va acoplada con la histidina cinasa NtrB cuya función principal es detectar los niveles de

nitrógeno controlando la asimilación del mismo en *C. crescentus* así como el desarrollo celular y la generación de polisacáridos <sup>(30)</sup>, sin embargo en *E. coli* puede ayudar a responder a la limitación del nitrógeno <sup>(28)</sup>. Mientras que en *Azospirillum* se le da una función de respuesta en condiciones de estrés por nitrógeno al generar una amplia gama de respuestas variadas de manera directa e indirecta como el control en la producción de polisacáridos, respuesta a estrés oxidativo y regulación del gen *flcA* (principal encargado de la floculación en este organismo) <sup>(31)(32)</sup>.

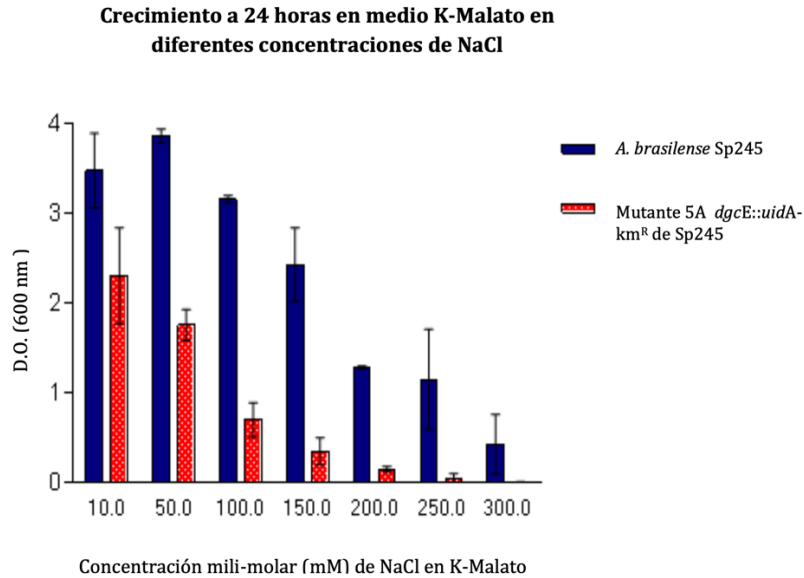
### 3.2.3 Estudio de región adyacente a LuxO-L

Gamboa A. (2014) estudió el gen anotado como *cdgE* que presuntamente codificaba para una Diguanilato ciclasa y, al analizar el contexto genómico se localizaron cinco genes en tándem, cuyos productos de traducción sugieren la presencia de dos histidinas cinasas híbridas y tres reguladores de respuesta <sup>(33)(34)</sup>. Se realizó la mutación del gen *cdgE::kmR-gusA* que generó una susceptibilidad osmótica alterada y el crecimiento deficiente <sup>(35)</sup>. (Figuras 7 y 8).



**Figura 7. Crecimiento alterado de *A. brasilense* Sp245 en Medio K-malato.**

Extraído de “A. PARTICIPACIÓN DE PROTEÍNAS CON DOMINIOS GGDEF EN CRECIMIENTO DE *Azospirillum brasilense*” <sup>(35)</sup>.



**Figura 8. Resistencia Osmolar de *A. baldaniorum* Sp245 en Medio K-malato.**

Extraído de “A. PARTICIPACIÓN DE PROTEÍNAS CON DOMINIOS GGDEF EN CRECIMIENTO DE *Azospirillum brasilense*”<sup>(35)</sup>.

Con base a los resultados obtenidos por Gamboa se concluyó que probablemente debido al tipo de mutación generada se alterarían los ORFs (por sus siglas en inglés Open Reading Frames) adyacentes. Con el objetivo de continuar con el estudio de estos genes se procedió a generar mutantes por eliminación de cada uno de los genes.

Para el estudio del gen “*luxO*” el laboratorio de la interacción bacteria planta se dio a la tarea de realizar las mutantes necesarias para generar la eliminación del gen “*luxO*”, complementación, sobreexpresión y cepas control (datos no publicados) cuya localización se encuentra en el plásmido 3 del organismo *A. baldaniorum* Sp245.

Se generaron diversas cepas para la evaluación fenotípica: la mutación por eliminación del gen *luxO* ( $\Delta luxO$ ) usando como fondo genético la cepa silvestre (*A. baldaniorum* Sp245), la inserción del plásmido vector junto con una copia del gen a la cual se le denominó *A. baldaniorum* Sp245 (*pBluxO*) (Sobreexpresión), la complementación génica usando el vector con una copia del gen y sobre el contexto de la cepa mutante a la cual se le denominó *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  (*pBluxO*) (Complementación), las cepas control se generaron de igual

manera denominadas *A. baldaniorum luxO* (*pBBRMISC-5*) (Control *luxO*) generada sobre el fondo genético *A. baldaniorum ΔluxO* y *A. baldaniorum Sp245* (*pBBRMISC-5*) (Control Sp245) generada sobre el fondo genético silvestre.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

La comunidad científica al avanzar en el conocimiento de las bases de la interacción del microbioma con las plantas; tiene la responsabilidad moral de continuar las investigaciones en favor de tecnologías emergentes las cuales, darían soluciones a problemas humanos y generar conocimiento, aunque por el momento no sean útiles en este punto de la historia. Entender el mecanismo de los sistemas de doble componente nos acerca más a tener un conocimiento completo de cómo es que estas bacterias han evolucionado para responder a señales externas, generando una interacción cooperativa con las plantas e incluso con los cultivos de interés agronómico.

Lo que podría develar a futuro el mecanismo por el cual se beneficiaría en la generación de cultivos agronómicos sanos y sin contaminación por fertilizantes químicos e incluso con un mayor rendimiento en la producción, así como el mantenimiento de las condiciones óptimas para el crecimiento de los plantíos.

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La bacteria *Azospirillum baldaniorum* Sp245 se ha aislado de cultivos de diferentes plantas alrededor del mundo, entre ellas algunas plantas de interés agronómico esto gracias a que es una bacteria promotora del crecimiento vegetal que otorga un mejor rendimiento en el crecimiento de las plantas. Sin embargo, los procesos moleculares por los cuales esta bacteria genera su efecto benéfico son muy poco conocidos y entendidos, razones por las cuales deben de continuar con su estudio. Dentro de estos mecanismos se han propuesto vías a través de las cuales la bacteria responde de manera específica, rápida y versátil. En este trabajo nos enfocamos al estudio del gen *luxO* para tratar de entender cómo es que este gen que presuntivamente codifica para un regulador transcripcional afectaría de una manera negativa o positiva, algunos fenotipos que son de vital importancia para la colonización bacteriana. El estudio del efecto del gen *luxO* en la formación de biopelícula, tiempo de generación, sensibilidad al sodio y floculación bacteriana, permitirá explorar el probable rol que “*luxO*” tenga en función de la participación de los sistemas de doble componente.

## 6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la función del Regulador de Respuesta “*luxO*” en *A. baldaniorum* Sp245?

## 7. HIPOTESIS

La eliminación del gen “*luxO*” en *A. baldaniorum* Sp245 nos dará como resultado un menor desempeño en alguno de los fenotipos a estudiar (Formación de biopelícula, tiempo de generación, sensibilidad al sodio y floculación bacteriana) bajo cambios en la fuente de nitrógeno *in vitro*.

## 8. OBJETIVOS

### 8.1 Objetivo general

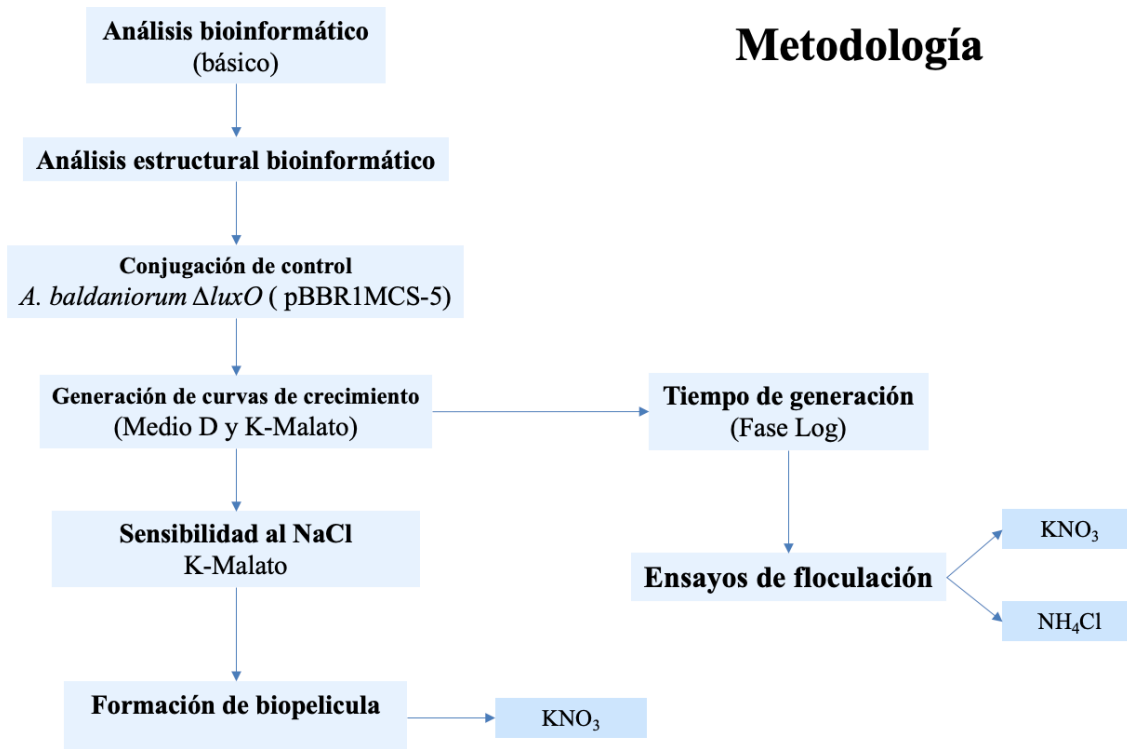
- Estudiar bioinformáticamente y fenotípicamente al gen “*luxO*” en *A. baldaniorum* Sp245 evaluando la formación de biopelícula, tiempo de generación, sensibilidad al sodio y floculación bacteriana bajo cambios en la fuente de nitrógeno.

### 8.2 Objetivos específicos

- 1) Analizar de manera bioinformática la proteína “LuxO-L” con base a análisis comparativos estructurales.
- 2) Analizar la filogenia de la proteína “LuxO-L” con respecto a otras especies de este género.
- 3) Generar la conjugación del control de la cepa mutante y su vector vacío.
- 4) Relacionar la ausencia o la sobreexpresión de *luxO* con un porcentaje de alteración en la función de los fenotipos de formación de biopelícula, tiempo de generación, sensibilidad al sodio y floculación bacteriana.

## 9. MATERIAL Y MÉTODOS

### 9.1 Estrategia de trabajo



### 9.2 Análisis Bioinformático

El análisis bioinformático se realizó con los programas: **NCBI BLAST**, **CLUSTAL W** y **SMART PROTEIN** para los alineamientos pertenecientes a los homólogos de la proteína LuxO tanto en *A. baldaniorum* Sp245 como en eubacterias y la predicción de dominios proteicos.

Se realizaron análisis filogenéticos usando el programa **MEGA X11** para la realización de los árboles filogenéticos posteriores a los alineamientos de la proteína LuxO-L en eubacterias y en especies del género *Azospirillum* con genoma completo en la base de datos del NCBI.

Se utilizó el programa **Chimera X** versión 1.8 para el análisis de la estructura proteica que se modeló por inteligencia artificial utilizando el programa **Alphafold-3**, y se analizó usando el programa **Foldscript v0.9** para confirmar y validar la estructura proteica, se compararon diferencias y similitudes entre las proteínas NtrC I de *Aquifex aeolicus* con código de acceso 4L4U y LuxO de *Photobacterium augustum* con código de acceso 5EP0 y 5EP2 previamente cristalizadas y depositadas en la base de datos del PDB (Protein Data Bank por sus siglas en ingles).

### **9.3 Ensayo de conjugación bacteriana**

Se dejó crecer un precultivo de *A. baldaniorum ΔluxO* en 5mL de medio k-lactato y un precultivo de *E. coli* S17.1 conteniendo el vector pBBR1MCS-5 en LB durante toda la noche, posteriormente se transfirieron 50uL de *A. baldaniorum ΔluxO* a un nuevo tubo con 5mL de k-lactato y se dejaron crecer de 6 a 8 hrs en agitación sin antibiótico, de igual manera se transfirió a 2 ml de LB 100uL del precultivo de *E. coli* S17.1 (pBBR1MCS-5) en donde se dejó crecer durante 3 hrs con agitación a 37 grados, posterior al crecimiento de las cepas, se utilizó una placa de medio Difco sin antibiótico en donde se agregaron de manera principal 10uL de *E. coli* S17.1 en condiciones de esterilidad y se dejó secar la gota generada para agregar después 20uL de *A. baldaniorum ΔluxO* sobre la gota inicial, al finalizar se dejaron creciendo durante 24 hrs en condiciones de humedad a 30 grados.

Al día siguiente se recogieron con un asa bacteriológica estéril los crecimientos bacterianos de la placa de medio Difco anterior y se transfirieron a un tubo de eppendorf con medio mínimo para generar las diluciones a la -1 y -2 donde posteriormente se tomaron 50uL de dilución y dejaron crecer en las nuevas placas 24 hrs en las mismas condiciones tratando de conseguir colonias aisladas.

### **9.4 Ensayo de curvas de crecimiento**

Se realizó el ensayo de curva de crecimiento en medio Difco (medio completo) y K-Malato (Medio mínimo). Se inició con un precultivo de cada cepa con un promedio de 12 hrs de

crecimiento, y se ajustó la D.O<sub>600nm</sub> a 2, posteriormente se realizó una dilución 1/100 en matraces de 125 ml con 50 ml del medio correspondiente, se dejó creciendo por 12 hrs y se tomaron lecturas cada 2 horas. Se realizó el método de UFC's a las 16 y 18 h para posteriormente poder realizar la técnica de tiempo de generación.

#### **9.4.1 Determinación del tiempo de generación**

La técnica de tiempo de generación se realizó tomando una alícuota del experimento de curva de crecimiento del medio correspondiente, se tomaron muestras a las 16 y 18 hrs de fase logarítmica y D.O 0.5 - 0.65.

Una vez obtenido el crecimiento deseado se tomaron alícuotas de 100uL y se colocó en un tubo eppendorf con 900uL de medio D, previamente preparado y esterilizado adecuadamente.

A continuación, se realizaron diluciones en serie hasta llegar a -8 órdenes de magnitud disolviendo la alícuota de 100uL en cada pase de manera uniforme. Posteriormente, en una placa de Rojo Congo (RC) previamente preparada con los antibióticos necesarios se agregaron 5 gotas de 10uL en cada segmento previamente separado de la serie -6 y -7, se dejó crecer la placa de RC a 30 grados C, por 48 hrs y posteriormente se llevó a cabo el conteo de las colonias. Al final se calculó el tiempo de generación usando las siguientes formulas:

**$n = 3.3 (\log N - \log N_0)$**  en donde N=número final de células y N<sub>0</sub>= número inicial de células siendo n= número de generaciones que ha ocurrido durante el periodo de crecimiento exponencial.

Y posteriormente poder calcular el tiempo de generación con base a la siguiente formula  **$g = t/n$**  donde g= tiempo de generación, t=tiempo de crecimiento exponencial y n= número de generaciones durante el periodo exponencial.

## 9.5 Ensayo de biopelícula

Las cepas se sembraron en Rojo Congo (RC) a 30°C por dos días, de la placa se tomaron 3 colonias de cada una de las cepas de *Azospirillum*, que se inocularon en 15 ml de medio de cultivo Difco en un tubo de cristal de 5 ml, se incubaron a 30 ° C y 150 rpm, por 16h, hasta  $DO_{600nm}$  de 1.1 a 1.4. Se tomaron, 1 ml de cultivo en un tubo eppendorf, se centrifugó a 8,000 rpm, 3 min, el paquete celular se resuspendió en buffer de fosfatos (BF) (Para 100ml. [10X]:  $Na_2HPO_4$ -1.42g,  $KH_2PO_4$ -.24g, KCl-.2g, NaCl-8g [66 mM, pH 6.8]), a DO de 2.0, esta suspensión fue diluida 1:100 en medio Nfb\* (Para 1L: Acido malico-3.7g,  $K_2HPO_4$  [10%]-5ml,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  [10%]-2ml, NaCl [10%]-1ml,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  [1%]-2ml, Micronutrientes-2ml, Fe-EDTA [1.64%]-4ml,  $KNO_3/NH_4Cl$ -\*\*). De la dilución de los cultivos se sembraron 7.5 ml en cada tubo. Se realizo un triplicado para cada cepa. En 3 tubos se determinó la unión a cristal violeta (CV) y en los otros se determinaron las proteínas totales.

Se incubaron por 5 días a 30° en condiciones estáticas y en cámara húmeda y posteriormente se adicionaron 500uL de CV al .5% a cada tubo de la muestra para CV y se incubaron por 30 mins a temperatura ambiente. Se elimino el CV no adherido, se dejó secar por 1 hr. Se agregaron 7.5 ml de Ácido acético al 33%, se tomaron 250uL de cada tubo para leer al espectrofotómetro a  $DO_{595nm}$ .

Nota: La biopelícula se normaliza al determinar las proteínas totales

\*\* - Dependiendo el tipo de fuente de nitrógeno

### 9.5.1 Determinación de proteínas totales

A partir del ensayo de biopelícula, se tomó una alícuota de cada tubo en duplicado, para la cuantificación de proteínas totales. El paquete celular se lavó 2 veces con BF 10 mM y al final se resuspendió en 1 ml de este. Se dejó enfriar y posteriormente se llevó a sonicar la muestra a una amplitud de 30 Hertz, de 3 a 5 pulsaciones durante 30 seg, se repitió el proceso 3 veces hasta observar que el paquete celular se haya disuelto en su mayoría y observar restos celulares en el fondo. Se utilizo una relación 1:7 en un volumen de 200uL y se agregaron 50 uL de solución CBB [1N/HCL 1N] para obtener un total de 250 µl y se cuantificó al

espectrofotómetro a una longitud de onda de 610 nm. Se calculó la cantidad de proteínas totales a partir de la curva estándar de proteínas con albúmina grado biología molecular de 0 a 40ug/ml.

## **9.6 Ensayo de sensibilidad al sodio**

El día anterior se tomaron de una caja de Agar RC 3 o 4 colonias con crecimiento uniforme, se preparó un precultivo en medio D con Gm a 50mg/ml que es el antibiótico de selección, y una D.O600nm en fase exponencial de entre 0.5 a 0.7 que se ajustó a una D.O600nm de 2 total, posteriormente se sembraron en 20mL de medio K-malato\* (Para 100ml:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -.087g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -.167g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -.02g, NaCl-\*\*, ácido málico-.5g, CaCl [2%]-.1ml,  $\text{FeCl}_3$  [1%]-.1ml,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  [0.2%]-.1ml,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ [20%]-.5ml, Oligoelementos-.1ml [pH 6.8]) las cepas en un matraz para cada concentración de NaCl al cual se le ajusto la cantidad de NaCl a partir de una concentración de stock de 5M que se preparó con anterioridad, en cada matraz se agregaron las siguientes concentraciones de NaCl 10mM, 20mM, 50mM, 100mM, 150mM, 200mM, 250mM y 300mM, posteriormente se dejaron los cultivos en crecimiento con agitación a 150rpm por 24 h para evaluar el crecimiento bacteriano en 15 y 22 horas a una D.O de 600nm.

\*\*-Dependiente de la cantidad de NaCl

## **9.8 Ensayo de floculación**

Se preparó un precultivo en medio D con 5uL de Gm (50mg/ml) como antibiótico de resistencia en las cepas, el día anterior se tomó de una caja de Agar RC 3 o 4 colonias con crecimiento uniforme hasta alcanzar una D.O en fase exponencial entre 0.5 a 0.7 y se ajustó a una D.O de 2 total, posteriormente se sembraron 3 repeticiones a una dilución 1/100 en matraces de 50mL con 10mL de medio para floculación (Para 100ml:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -.087g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -.167g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -.02g, NaCl-.01g, Fructosa[400mM]-2ml, CaCl [2%]-.1ml,  $\text{FeCl}_3$  [1%]-.1ml,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  [2%]-.1ml,  $\text{KNO}_3$ [100mM]-.5ml, Oligoelementos-.1ml

[pH 6.8]) por cada cepa a experimentar, se dejaron creciendo en agitación a 150 rpm durante 48 hrs y se midió el porcentaje de floculación a las 24 y 48 hrs de crecimiento.

### **9.8.1 Cuantificación de floculación bacteriana**

Para calcular la agregación bacteriana se interrumpió el crecimiento en incubación de los matraces de 50mL, posteriormente se dejó reposar el medio durante 35 mins (Se proponen 30mins para que sea suficiente tiempo para sedimentar los agregados) y se obtuvieron 3 alícuotas de 1mL del sobrenadante sin agregados y posteriormente se homogenizó el medio en el matraz para recolectar de igual manera 3 alícuotas de 1mL pero con agregados, se recolectan 3 alícuotas de 1 ml de cada muestra sobrenadante y mezcla homogénea. Posteriormente, se llevaron a la centrifuga las muestras a 10000 rpm durante 5 min para generar un pellet, uno de agregados y otro de sobrenadante para lavar con 1mL de Buffer TBCA (Buffer ocupado para disgregar células [1mM de EDTA y .01% de Tween20]) para separar de manera correcta los flóculos y el sobrenadante, se le dio un tratamiento mecánico intentando disolver la mayor cantidad de flóculos y sobrenadante para separar las células. Se midió con el espectrofotómetro en una placa de 96 pocillos para ambas alícuotas (3 repeticiones por cada cepa). Se propuso el uso de placas de 96 pocillos para la medición de 250uL en cada una para obtener un número más amplio de repeticiones por medición. El porcentaje de agregación se calculó midiendo la  $DO_{600nm}$ , donde la  $DO_a$  es la DO de la muestra homogeneizada y  $DO_b$ , la DO del sobrenadante <sup>(36)</sup>.

## 10.RESULTADOS

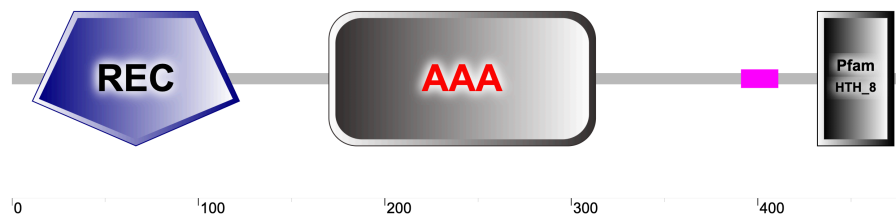
### 10.1Bioinformática

#### 10.1.1 Recuperación de la secuencia de nucleótidos

>CP022255.1:597309-598751 *Azospirillum baldaniorum* Sp245 plasmid Sp245\_p03

gen *luxO* like de *A. baldaniorum* Sp245

Con la herramienta BLASTX usando como base la secuencia de nucleótidos se obtuvo la traducción de la misma y que se analizó posteriormente en la herramienta bioinformática SMART PROTEIN en el cual se identificaron los dominios REC, AAA+ y HTH, que son característicos de proteínas del tipo BEBP's.

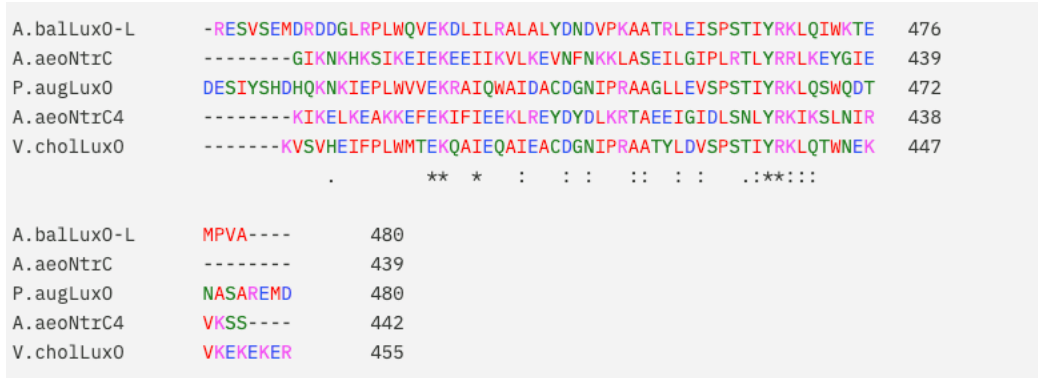


**Figura 9. Predicción de dominios por SMART PROTEIN.**

La proteína LuxO-L al contar con la topología de los dominios REC, AAA+ y un HTH, indica que presenta homología con los miembros de la super-familia NtrC, esta proteína participa en la regulación del metabolismo del nitrógeno en otros organismos <sup>(29)</sup>.

La presencia del motivo **GAFTGA** <sup>(22)</sup> en el dominio AAA+ (**Figura 12**) conservada sugiere que el regulador de respuesta LuxO-L contiene un sitio con el cual, se puede llevar a cabo la interacción con Sigma-54 y que probablemente funcione como BEBPs (Bacterial Enhancing Binding Protein) (**Anexo 1**).





B) Percent Identity Matrix – created by Clustal2.1

1: A. balLux0-L	100.00	36.45	50.64	37.33	54.91
2: A. aeoNtrC	36.45	100.00	39.04	49.30	38.19
3: P. augLux0	50.64	39.04	100.00	38.24	68.79
4: A. aeoNtrC4	37.33	49.30	38.24	100.00	39.45
5: V. cholLux0	54.91	38.19	68.79	39.45	100.00

**Figura 10. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de LuxO-L (*Azospirillum baldaniorum* Sp245), NtrC1 (*Aquifex aeolicus*), LuxO (*Photobacterium augustum*), NtrC4 (*Aquifex aeolicus*), LuxO (*Vibrio cholerae*).**

A) En color rojo se encuentra encerrado el motivo GAFTGA compartido entre los organismos comparados. B) Matriz de identidad generada de los alineamientos realizados encerrado en color rojo se encuentra el porcentaje de identidad de la proteína LuxO de *V. cholerae*, en color naranja la proteína LuxO de *P. augustum* y en color azul NtrCI de *A. aeolicus* todas comparándose con LuxO-L de *A. baldaniorum* Sp245.

### 10.1.2 Búsqueda realizada en BlastX de eubacterias con proteínas similares a LuxO-L.

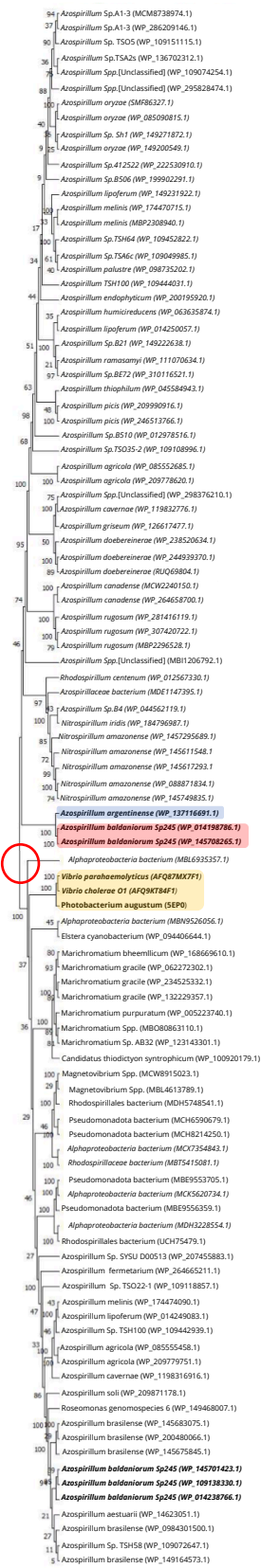
Se realizó una búsqueda de secuencias aminoacídicas similares a LuxO-L en eubacterias usando la herramienta BlastX, que compartieran similitud. Se recuperaron 100 secuencias de proteínas con un porcentaje de identidad compartida entre 55-86%, una cobertura superior a 96% y un e-value superior a  $1e-168$  siendo la proteína con código de acceso **WP\_137116691.1** perteneciente a *Azospirillum argentinense* la que comparte más similitud con LuxO-L con un porcentaje del 100% de cobertura y 86.04% de identidad, además se identificó que *A. baldaniorum* Sp245 cuenta con 5 secuencias (**Anexo 2**) que codifican para proteínas que pueden ser homólogos a LuxO-L (WP\_014198786.1). Una de estas secuencias

similares propuestas se localizó en el cromosoma de *A. baldaniorum* Sp245, mientras que los otros genes que codifican a las proteínas homólogas a LuxO-L se localizaron en diversas regiones del genoma. Se observó que LuxO-L está ampliamente conservada en el género *Azospirillum*, (**Anexo 2**).

### 10.1.2 Creación de árbol filogenético de LuxO-L con software MEGA X

Se realizó un árbol filogenético con 100 secuencias recuperadas a partir de la búsqueda en la plataforma BLASTX con apoyo del programa MEGA X usando un Bootstrap de 500 repeticiones por el método de máxima verosimilitud para obtener la filogenia de esta familia de proteínas en eubacterias.

Las proteínas obtenidas en la búsqueda realizada con la herramienta BLASTX, se utilizaron para construir el árbol filogenético (**Fig. 11**). Se observa en el árbol obtenido que se ubican como parte del mismo clado; *A. baldaniorum* Sp245 con número de acceso **WP\_014198786.1** y el homólogo en *A. argentinense* con número de acceso **WP\_137116691.1** conformado por 3 proteínas. Mientras que, las secuencias de *Vibrio cholerae* se localizan en un clado distante de las proteínas homólogas del género *Azospirillum*. Lo anterior nos sugiere que estos genes son ortólogos, cuya función podría ser la de un presunto regulador transcripcional en las diferentes bacterias. Esta proteína se encuentra muy conservada en el género *Azospirillum*.



**Figura 11. Árbol de homólogos LuxO-L (100 secuencias recuperadas del NCBI usando BLASTX).**

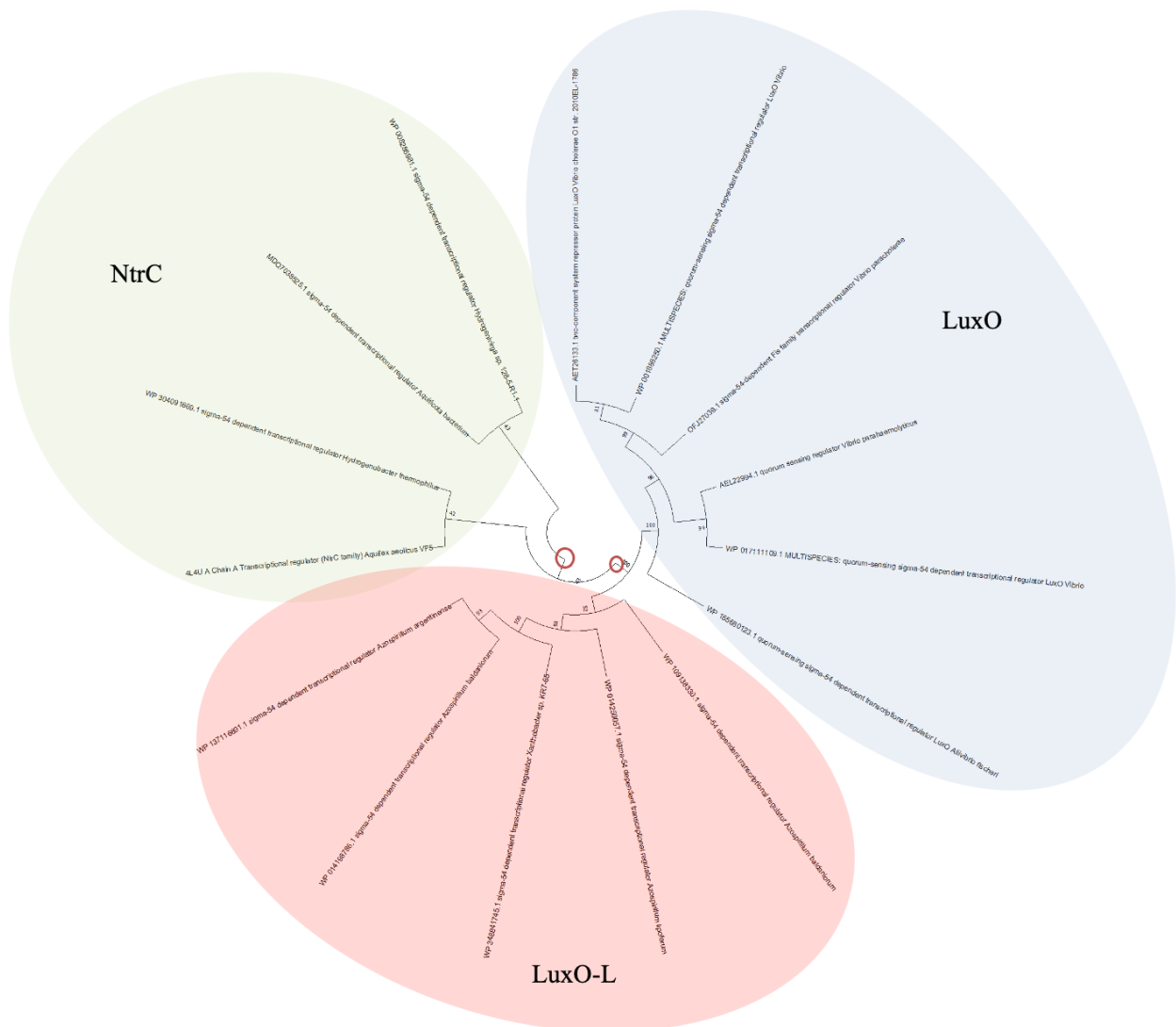
En color rojo la proteína que denominamos LuxO-L de *A. baldaniorum* Sp245 con número de acceso **WP\_014198786.1**, en color azul la proteína de *A. argentinense* y se observa que se encuentran en un clado diferente a la proteína LuxO de *V. cholerae* y *P. augustum* en color amarillo.



LuxO-L de *A. brasiliense* Sp7 (WP\_059398498.1) y su homólogo (WP\_23790467.1) ambas son secuencias homologas a la proteína NtrC<sup>(37)</sup> que tiene como función responder al metabolismo de nitrógeno se encuentran encerrados en color verde en la **Figura 12**. En el caso de LuxO-L se observa que se encuentra en una subfamilia diferente al resto de proteínas similares siendo solo su secuencia homologa presente en *A. argentinense* la que formaría parte de esta subfamilia de proteínas, por lo que podríamos teorizar que debería tener una función específica con respecto a las demás.

### 10.1.4 Árbol filogenético LuxO-L, LuxO y NtrC.

Se realizó un árbol filogenético con las 15 secuencias de mayor similitud recuperadas a partir de la búsqueda en la plataforma BLASTP de LuxO-L, NtrC I y LuxO con apoyo del programa MEGA X usando un Bootstrap de 500 repeticiones por el método de máxima verosimilitud con el fin de entender en que familia se agruparía a la proteína LuxO-L, se puede observar que NtrC I y sus homólogos pertenecen a una familia aparentemente diferente, mientras que LuxO-L genera una subfamilia junto con otras proteínas que pertenecen al género *Azospirillum*, mientras que LuxO de *Vibrio* de igual manera se divide en una subfamilia distinta.

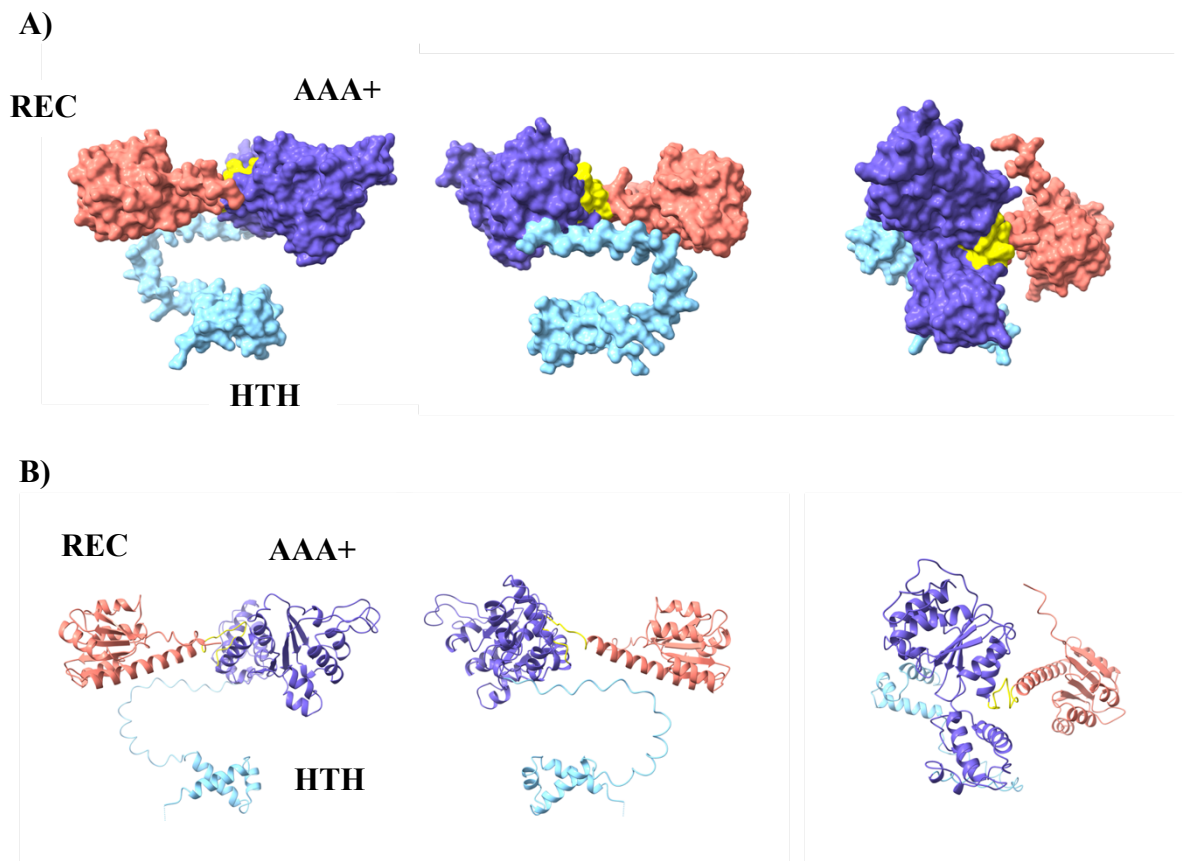


**Figura 13. Árbol filogenético de LuxO-L, LuxO y NtrC I.**

En color rojo se observa la familia de proteínas en donde se localiza la secuencia de LuxO-L (**WP\_014198786.1**) de *A. baldaniorum* Sp245, en color verde encerradas se encuentran las secuencias proteicas que pertenecen a la familia NtrC y en color azul las secuencias proteicas que pertenecen a LuxO.

### 10.1.6 Análisis estructural de la proteína LuxO-L de *A. baldaniorum* Sp245

Se modeló la estructura proteica de LuxO-L de *A. baldaniorum* Sp245 con el programa AlphaFold-3 con un puntaje pTM > 0.5 y una predicción aminoácido por aminoácido plDDT de muy alta a confidente arriba de 70 <sup>(38)</sup>, así como el procesamiento posterior usando Foldscript v0.9 para la elección de la mejor predicción por I.A. Se realizaron análisis comparativos usando los cristales de *P. augustum* LuxO (5EP0) y *A. aeolicus* NtrC I (4L4U).

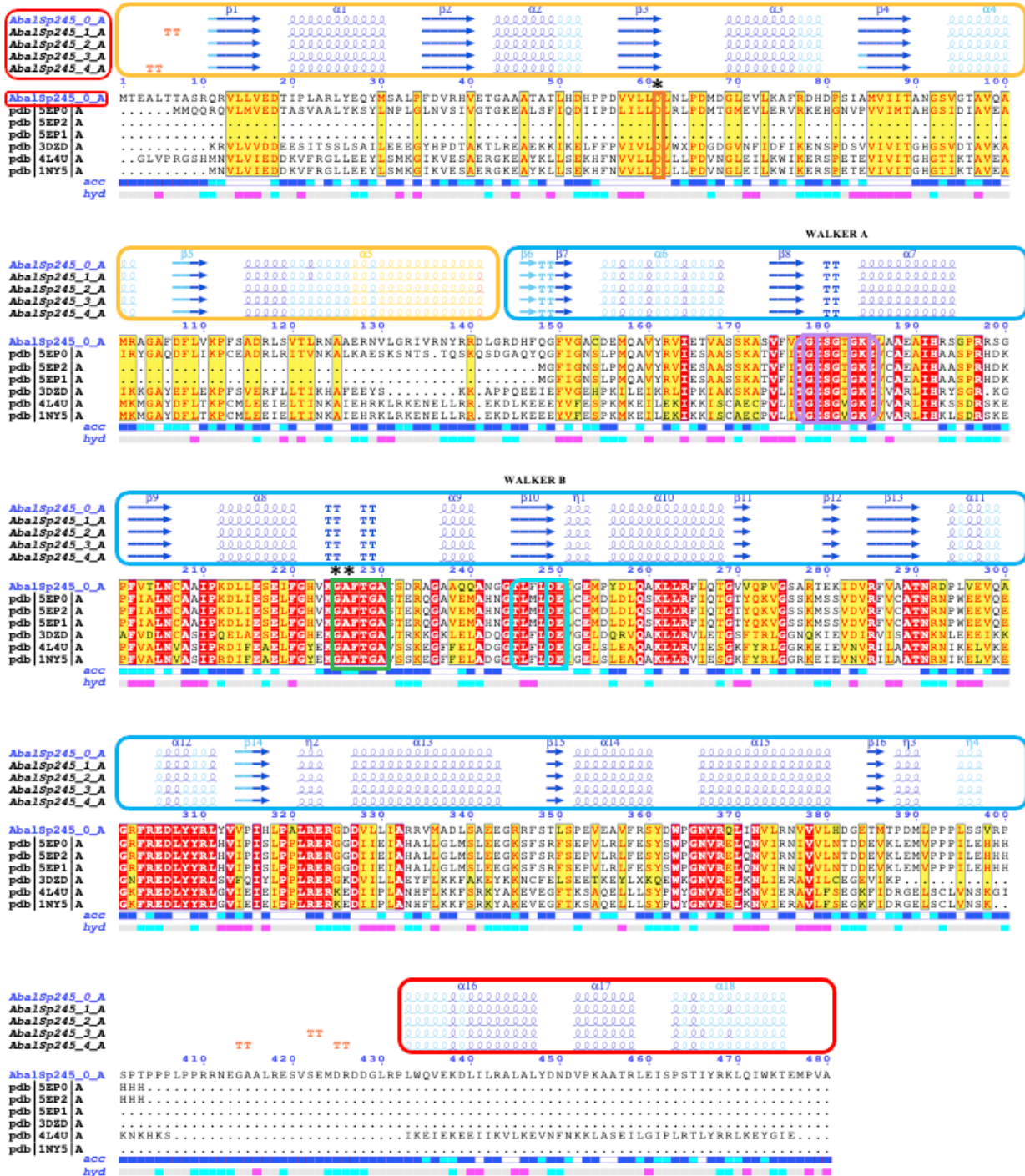


**Figura 14. Modelado de LuxO-L con AlphaFold-3.**

A) Modelado de superficie proteica. B) Modelado de estructuras secundarias. En color salmón se puede observar la estructura perteneciente al dominio REC (Dominio receptor de señal con el Aspartato conservado), en color morado se observa el dominio AAA+ (Dominio de hidrólisis de ATP e interacción con Sigma-54) y en color azul se puede observar el dominio HTH (Dominio de unión a ADN).

Se procedió a comparar la estructura secundaria de LuxO-L *A. baldaniorum* Sp245, usando la herramienta Foldscript v0.9 para la generación de los alineamientos de las estructuras

homologas de LuxO-L y la elección de la mejor predicción proteica usando como comparación la base de datos del PDB (Protein Data Bank).



### **Figura 15. Alineamiento y selección de la predicción más adecuada usando la base de datos del PDB (Protein Data Bank).**

Foldscript v0.9 nos genera una elección adecuada para dar validación a la estructura predicha por AlphaFold-3 en base a datos previamente registrados del PDB por lo que se genera una búsqueda de estructuras cristalizadas y se hace la búsqueda de homólogos estructurales y secuencias parecidas a LuxO-L perteneciente a *A. baldaniorum* Sp245, en este caso se comparó con 6 cristales que pertenecen a *P. augustum* LuxO (5EP0, 5EP1, 5EP2), *A. aeolicus* NtrC4 (3DZD), *A. aeolicus* NtrC 1 (4L4U), *A. aeolicus* sigma54 activador (1NY5). En color rojo con fondo blanco son secuencias con 100% de identidad, en color rojo con fondo amarillo son aminoácidos con > 70% de identidad y en color negro son aminoácidos con <50%, de igual manera se localizaron en el alineamiento el dominio AAA+(encerrado en color azul) con sus motivos de importancia: **Walker A** (encerrado en color morado), **Walker B** (encerrado en color turquesa) y **GAFTGA** (encerrado en color verde), el dominio **REC**(encerrado en color amarillo) con el residuo **Asp 54/55** (encerrado en color naranja ) y el dominio **HTH**(encerrado en color rojo).

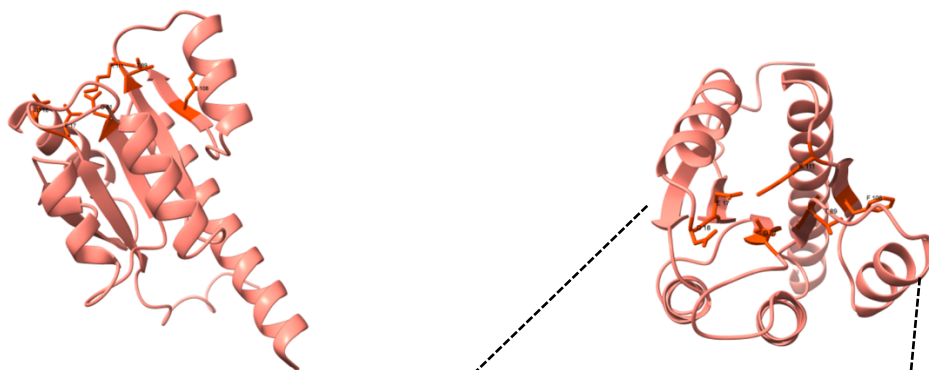
Al observar el alineamiento de las proteínas que se recuperaron de la base de datos del PDB se observó a proteínas de tipo NtrC (**3DZD y 4L4U**) y LuxO (**5EP0, 5EP1, 5EP2**), posteriormente se seleccionó la estructura nombrada como **AbalSp245\_0 (Fig. 15)** que pertenece a LuxO-L de *A. baldaniorum* Sp245 como el modelo validado, en el caso de LuxO-L sus homólogos más cercanos son ambas proteínas reguladoras de respuesta como LuxO (**WP\_045083340.1**) de *P. augustum* y NtrC 1 (**WP\_010880700.1**) de *A. aeolicus*, entre estas comparaciones proteicas según el programa Foldscript v0.9, se observa una alta homología entre LuxO-L de *A. baldaniorum* Sp245 y LuxO de *P. augustum*, esta homología no se ve favorecida en el caso de la proteína NtrC 1 de *A. aeolicus* según el análisis previo realizado en este estudio (**Fig. 10**), se sugiere que la predicción y el alineamiento usando la base de datos del PDB genera una predicción mejorada cuando se acopla al modelo de LuxO (**WP\_045083340.1**) de *P. augustum*, por lo que esta proteína tendría más homología en aminoácidos que NtrC 1 (**WP\_010880700.1**) de *A. aeolicus*, posteriormente se observa que el dominio más conservado con respecto al análisis estructural entre todas las proteínas alineadas es el dominio AAA+(**Fig. 15**) que es el dominio encargado de llevar a cabo la hidrólisis del ATP y hacer contacto con sigma 54, igualmente dentro del dominio podemos observar la presencia de los motivos **Walker A** [GXXXXGK[D/E]] y **Walker B** [hhhhD[D/E]] conservados, que están implicados en la unión e hidrólisis del ATP y el motivo **GAFTGA (Fig.15)** que está implicado en la interacción con sigma 54. Los dominios menos compartidos son el dominio aceptor de señal mejor conocido como **REC** que conserva los aminoácidos necesarios para llevar a cabo la fosfotransferencia como el **Asp 54/55 (Fig. 15)**, independientemente de la baja homología presente, y el dominio de unión a ADN conocido como **HTH** cuyo análisis se complica por su naturaleza poco cristalizable.

### 10.1.7 Analisis estructural del dominio REC de LuxO-L.

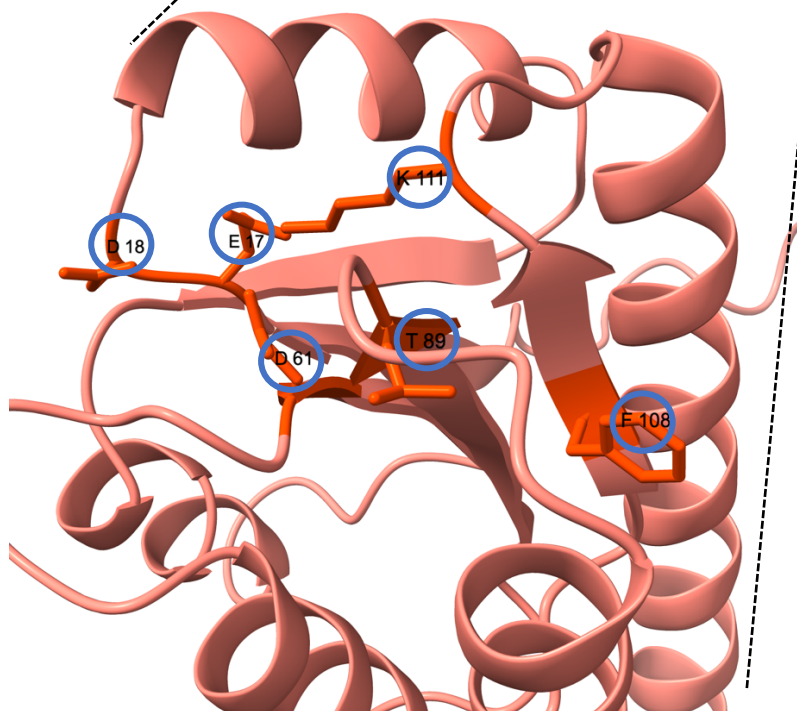
En cuanto al dominio REC se realizó un estudio con el modelado por Alphafold-3 y visualización con el programa Chimera X v1.8, LuxO-L conserva una gran parte de la estructura necesaria para llevar a cabo la fosforilación del dominio <sup>(17)</sup>.

El dominio REC está definido como un dominio de fosfotransferencia cuya estructura cuenta con 5 hélices alfa y 5 láminas beta de manera alternada, formando un centro de láminas beta y en su disposición externa se encuentran localizadas las hélices alfa en el dominio, a su vez se encuentra el **Asp 54/55** <sup>(39)</sup> y, otros residuos presentes en la mayoría de los microorganismos, sin embargo, Laub y colaboradores han demostrado que la covariación de residuos puede deberse a que la HKs responde a su RR cognado <sup>(40)</sup>, esto abre la teoría de una posible especificidad a cierta respuesta debido a la variación aminoacídica., Se realizaron alineamientos con otros dominios REC cristalizados reportados con actividad y se localizó el quinteto de aminoácidos funcionales según Brüderlin <sup>(17)</sup> estos aminoácidos son **ED, D, S/T, Y/F, K** que se encuentran presentes en el dominio REC de *A. baldaniorum* Sp245 (**Fig.17**) por lo que podríamos teorizar que LuxO-L cuenta con los aminoácidos necesarios para recibir una señal de fosfotransferencia y ser activado.

A)

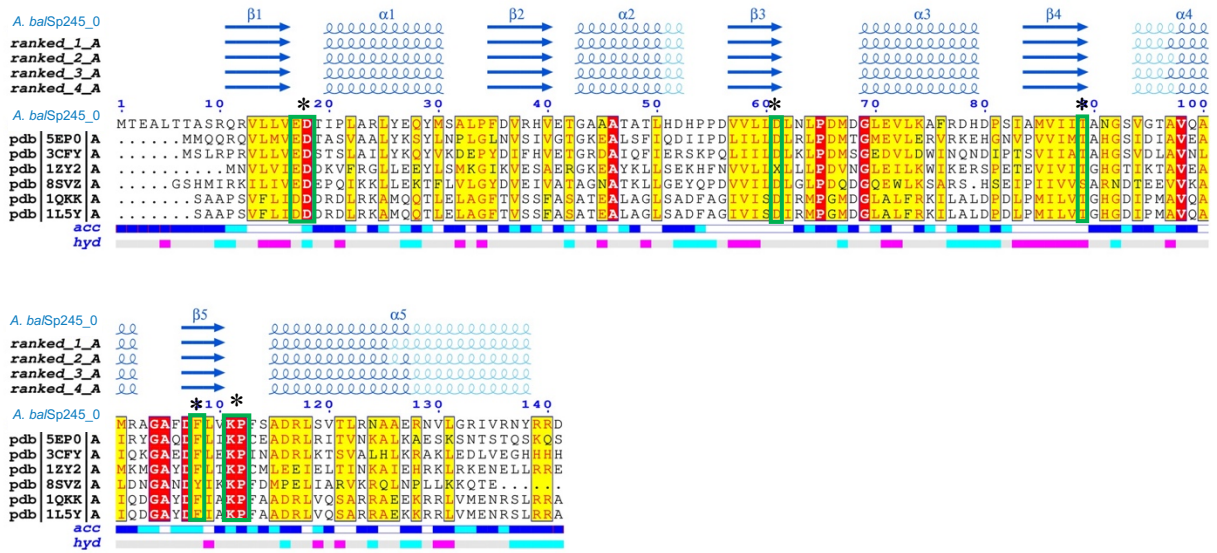


B)



**Figura 16. Estructura del dominio REC de LuxO-L (*A. baldaniorum* Sp245).**

A) Estructura del dominio REC. B) Péntada de aminoácidos en color azul [ED, D, S/T, Y/F, K] que interviene en la fosforilación del Aspartato 54 (61 en *A. baldaniorum* Sp245).



**Figura 17. Alineamiento del dominio REC de LuxO-L de *A. baldaniorum* Sp245.**

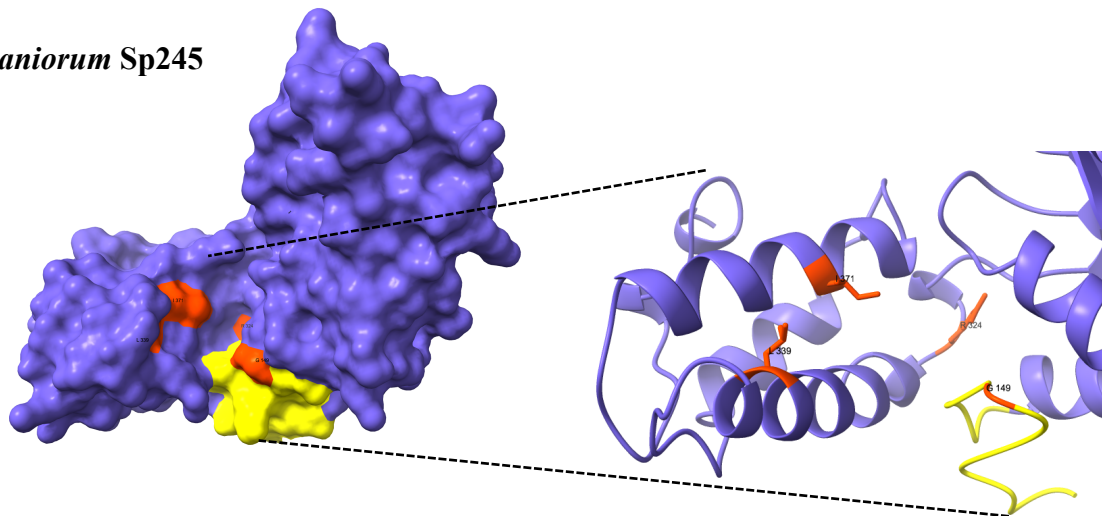
Se realizó un alineamiento con la base de datos del PDB en 6 secuencias de dominios REC reportadas con función presuntiva de fosfotransferencia en los organismos *P. augustum* (5EP0), *V. parahaemolyticus* (3CFY), *A. aeolicus* (1ZY2), *F. tularensis* (8SVZ), *S. meliloti* (1QKK, 1L5Y) y se realizó el análisis del dominio REC de LuxO-L, en color rojo con fondo blanco son secuencias con 100% de identidad. En color rojo con fondo amarillo son aminoácidos con > 70% de identidad y en color negro son aminoácidos con 50% <. En recuadros verdes se muestran los a.a ED, D, S/T, Y/F, K responsables de ayudar con la fosfotransferencia.

### 10.1.8 Análisis estructural del dominio AAA+ de LuxO-L.

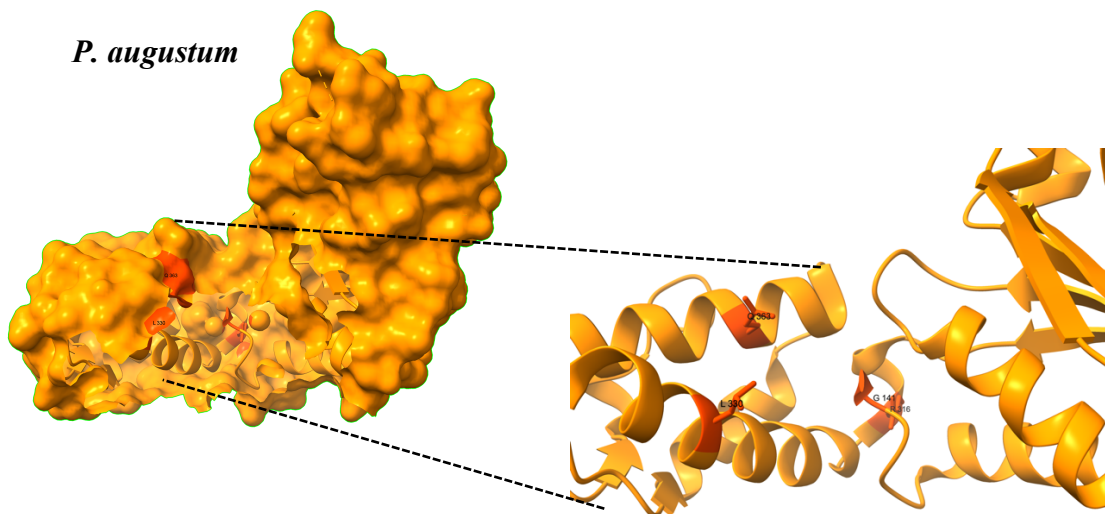
El dominio AAA+ es el dominio más conservado en ambas proteínas, LuxO (**WP\_045083340.1**) de *P. augustum* y en la proteína NtrC 1 (**WP\_010880700.1**) de *A. aeolicus*, por lo que es complejo diferenciarlos, ambos dominios por la naturaleza de la proteína cumplen la función de hacer contacto con sigma 54 y llevar a cabo la hidrólisis del ATP <sup>(41)</sup>.

La hidrólisis y la posterior regulación es dependiente de la función del dominio pues el contar con los motivos Walker A y Walker B conservados hacen posible la unión del ATP y ayudan a la hidrólisis de este <sup>(38)</sup>. En algunos casos un cambio en el aminoácido genera que la unión o la hidrólisis no sea posible lo que lleva a la diferenciación en la función de la proteína <sup>(42)</sup>, en el caso de LuxO de *P. augustum* se teoriza que aparte de los motivos Walker A y Walker B presentes, se encuentra una cavidad de interacción en donde la molécula de ATP se une y se lleva a cabo el cambio conformacional que lleva al complejo cerrado de la polimerasa a abrirse y llevar a cabo la transcripción de las proteínas reguladas por sigma 54 <sup>(26)</sup>.

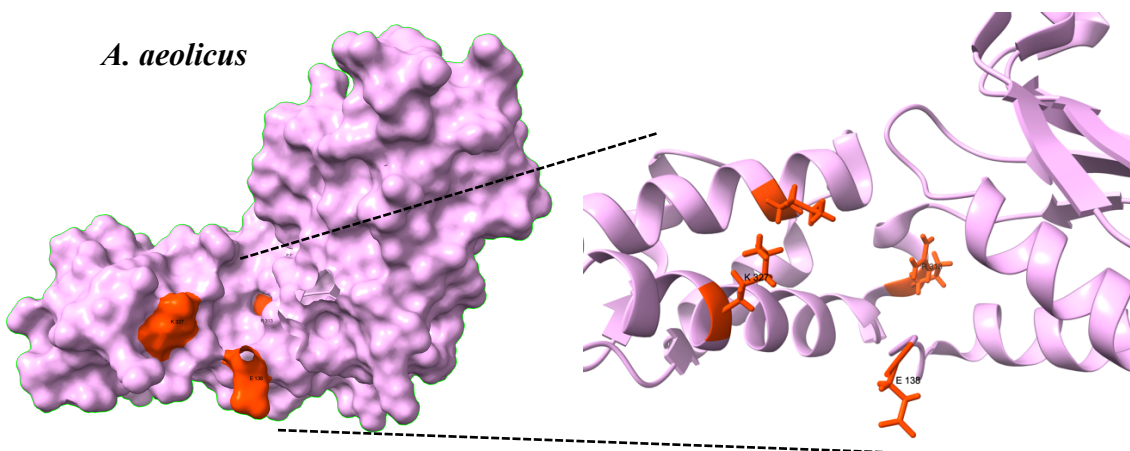
*A. baldaniorum* Sp245



*P. augustum*



*A. aeolicus*

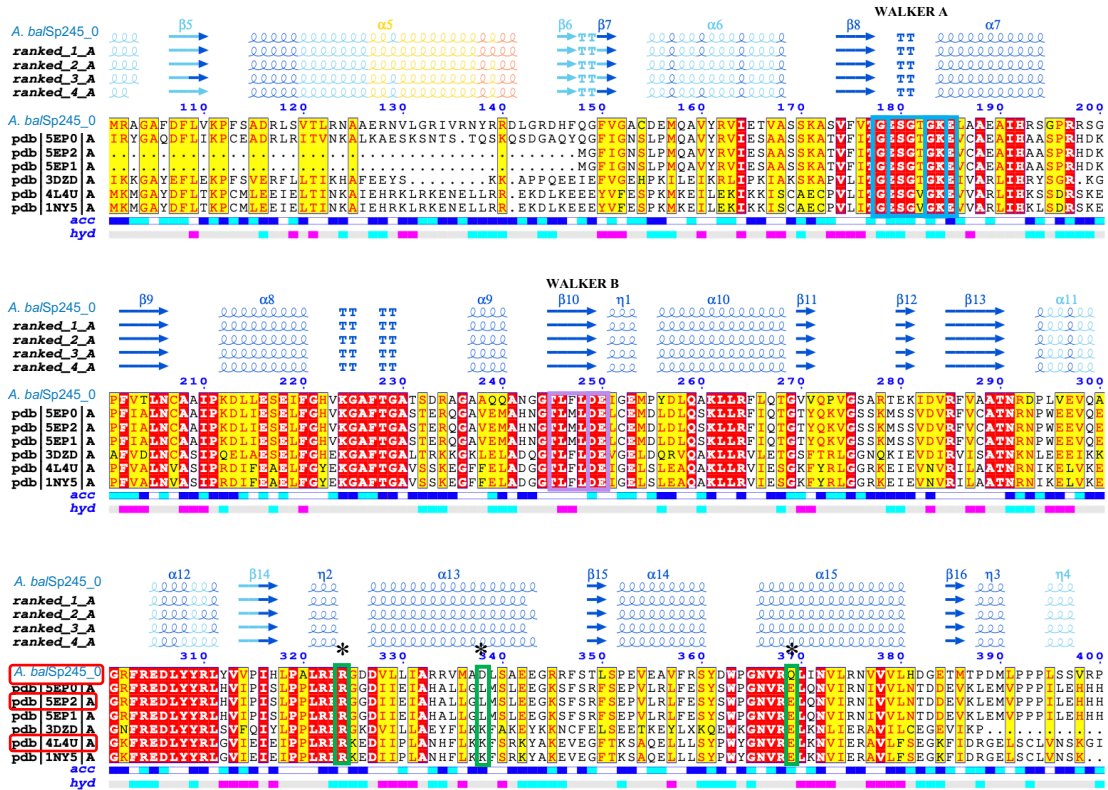


### **Figura 18. Supuesta cavidad de interacción de LuxO-L, LuxO (5EP2) y NtrC I (4L4U).**

En color rojo se observan los aminoácidos (**ARG316, LEU330, GLN363**) propuestos que llevan a cabo la unión de una molécula de ATP en LuxO (26). En *P. augustum* se mantiene la terna funcional (**ARG316, LEU330, GLN363**), en *A. aeolicus* como una NtrC (43) se observan cambios (**ARG316, LYS327, LYS371**) y en *A. baldaniorum* Sp245 de igual manera se observan cambios siendo la terna propuestamente compuesta por **ARG324, LEU339, ILE371**.

Se empleó como modelo de estudio comparativo la estructura cristalizada de *P. augustum* con código **5EP2** recuperada de la base de datos del PDB, se localizó en la cavidad de interacción los residuos implicados en la interacción con el ATP (**ARG316, LEU330, GLN363**) en LuxO <sup>(26)</sup> para esta proteína. En *A. baldaniorum* Sp245 se conserva el aminoácido **ARG316** y **LEU339** en la misma posición, sin embargo, hay un cambio aminoacídico en la posición **GLN363---ILE371** en *A. baldaniorum* Sp245.

La proteína NtrC 1 de *A. aeolicus* (**4L4U** recuperada del PDB con código de acceso **WP\_010880700.1**) cuenta de igual manera con la cavidad de interacción de manera estructural, conservando en el mismo lugar la **ARG316**, en donde se encuentran modificaciones en los aminoácidos descritos que generan la interacción **LEU330---LYS327** y **GLN363---LYS371**.



**Figura 19. Generación de alineamiento y análisis estructural entre homólogos del dominio AAA+ de LuxO-L.**

Se realizó un alineamiento de diferentes estructuras reportadas en el PDB pertenecientes a los organismos *P. augustum* (5EP0, 5EP2, 5EP1) y *A. aeolicus* (3DZD, 4L4U, 1NY5). Los 3 aminoácidos (ARG316, LEU330 y GLN363) reportados según Boyaci (26) que generan la cavidad de interacción en donde se une el ATP se encuentran encerrados en color verde, los motivos Walker A en color azul y Walker B en color magenta se encuentran conservados de igual manera. En color rojo con fondo blanco son secuencias con 100% de identidad, en color rojo con fondo amarillo son aminoácidos con > 70% de identidad y en color negro son aminoácidos con <50%.

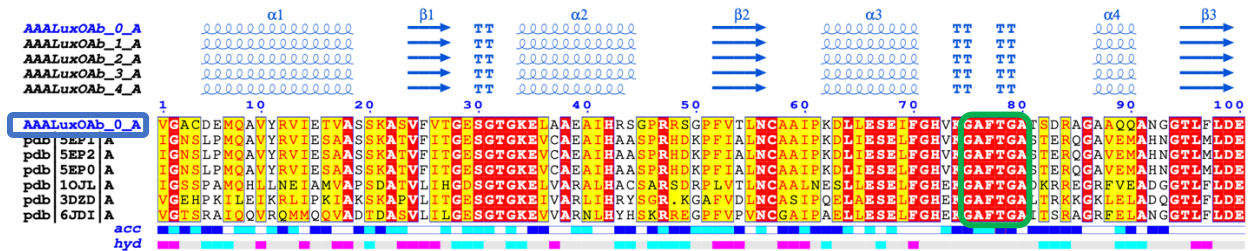
El análisis de alineamiento de estructuras y secuencias del PDB, revela que hay una variación en los aminoácidos presentes en la cavidad de interacción de las proteínas LuxO-L de *A. baumannii* Sp245 (WP\_014198786.1), LuxO de *P. augustum* (WP\_045083340.1) y NtrC 1 de *A. aeolicus* (WP\_010880700.1), en donde solo se conserva la ARG316 en la misma posición al fondo de la cavidad en las 3 proteínas, de igual manera los motivos Walker A y Walker B se encuentran conservados en la totalidad de las proteínas analizadas (Fig. 19), los cambios en ciertos aminoácidos que conforman la cavidad de interacción sugieren que



## Figura 20. Modelado del motivo GAFTGA.

En color cian se observa el motivo **GAFTGA**, es un motivo propuesto para la interacción con sigma54 reportado (44)(41,45).

A)



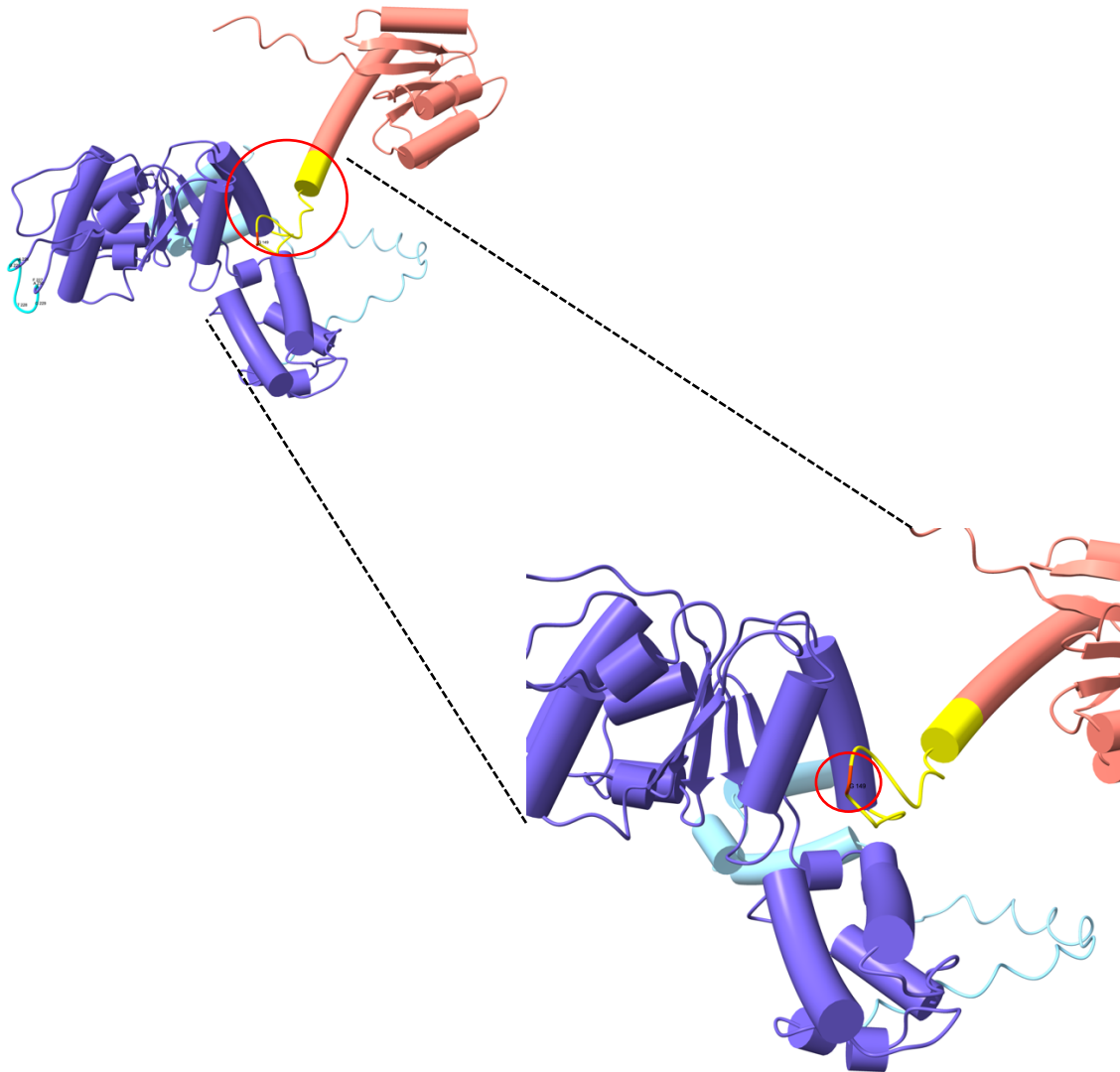
## Figura 21. Representación esquemática de la conservación del motivo GAFTGA.

Alineamiento de una región conservada en el dominio AAA+ de *P. augustum* (5EP0, 5EP1, 5EP2), *S. enterica* (10JL), *A. aeolicus* (3DZD), *P. aeruginosa* (6JDI). Se puede notar la alta conservación del motivo **GAFTGA**.

Se comparó el motivo **GAFTGA** que se encuentra altamente conservado en el dominio AAA+ en la mayoría de **BEBPs (Bacterial Enhancing Binding Proteins)** que están relacionadas con la desestabilización del complejo cerrado formado por sigma54 pues es un marcador que nos podría confirmar que la interacción con sigma54 es probable <sup>(22)(41)(45)</sup>, en el caso de LuxO-L de *A. baldaniorum* Sp245 este motivo se encuentra conservado tanto en posición como en secuencia con respecto a LuxO de *P. augustum* (5EP0) y NtrC1 de *aeolicus* (4L4U).

Se procedió a comparar la estructura general de LuxO con LuxO-L y se encontró que según Boyaci <sup>(26)</sup> el presunto linker entre el dominio REC y AAA+ que está bien definido por una glicina en la posición **141** se encuentra presente en LuxO-L de *A. baldaniorum* Sp245 y no se encuentra presente en las proteínas de tipo NtrC pues hay un cambio de aminoácido por un residuo de ácido glutámico (E), la glicina **141** es un residuo aminoacídico que se encuentra en proteínas clasificadas como tipo LuxO, principalmente su ausencia de carga y tamaño impide la unión de ATP a la cavidad de interacción por medios estéricos cuando la proteína se encuentra en estado no fosforilado, lo que evita la formación de la estructura del hexámero

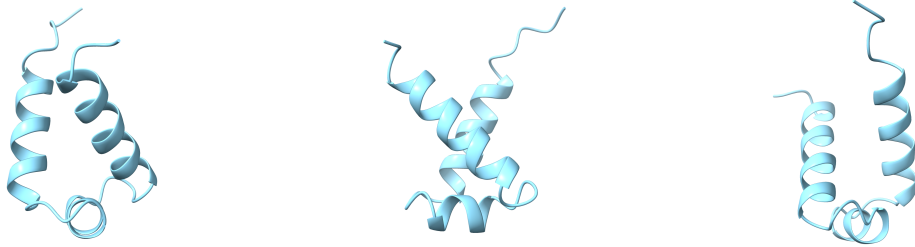
(26) que es capaz de llevar a cabo la función de BEBPs, de igual manera algo a destacar es que la secuencia que genera el linker de 20 aminoácidos no tiene homología reportada en las proteínas LuxO.



**Figura 22. Modelado del linker probable y posición de la glicina 141.**

Encerrado en color rojo se puede observar la **glicina 141** en el modelo generado a partir de la secuencia de *A. baldaniorum* Sp245 y en color amarillo observamos el presunto linker de 20 aa.

### 10.1.9 Análisis estructural del dominio HTH de LuxO-L.



**Figura 23. Dominio HTH presente en LuxO-L.**

El dominio HTH permite la unión a ADN, por lo tanto, la proteína es capaz de unirse a regiones específicas conocidas como regiones consenso en el ADN. Estas regiones están presentes en reguladores de transcripción <sup>(46)</sup> y nos pueden ayudar a definir en donde es que se está llevando a cabo la regulación. Por lo tanto, se generó un modelo con Alphafold-3 que se analizó posteriormente con el programa Chimera-X v1.8 para observar de manera estructural y secuencial a que proteína parece tener una mayor homología, sin embargo, al ser un dominio que contacta directamente con el ADN es difícil su cristalización de manera exitosa en la mayoría de las proteínas de tipo LuxO o NtrC.

**A)**

	1	10	20	30	40
<b>A. balLuxO-L</b>	P L W Q V E K D L I L R A L A L Y D N D V P K A A T R L E I S P S T I Y R K L Q I W				
<b>P. augLuxO</b>	P L W V V E K R A I Q W A I D A C D G N I P R A A G L L E V S P S T I Y R K L Q S W				
<b>V. cholLuxO</b>	P L W M T E K Q A I E Q A I E A C D G N I P R A A T Y L D V S P S T I Y R K L Q T W				
<b>A. aeoNtrC</b>	S I K E I E K E E I I K V L K E V N F N K K L A S E I L G I P L R T L Y R R L K E Y				
<b>A. aeoNtrC4</b>	. . K E F E K I F I E E K L R E Y D Y D L K R T A E E I G I D L S N L Y R K I K S L				

**B)**

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: A. balLuxO-L	100.00	59.52	57.14	26.19	32.50
2: P. augLuxO	59.52	100.00	76.19	23.81	27.50
3: V. cholLuxO	57.14	76.19	100.00	23.81	27.50
4: A. aeoNtrC	26.19	23.81	23.81	100.00	40.00
5: A. aeoNtrC4	32.50	27.50	27.50	40.00	100.00

### Figura 24. Alineamiento de la secuencia aminoacídica del dominio HTH.

A) Alineamiento del dominio HTH de *P. augustum* (LuxO), *V. cholerae* (LuxO), *A. aeolicus* (NtrC1, NtrC4) y *A. baldaniorum* Sp245 (LuxO-L). B) Porcentaje de identidad de los alineamientos realizados, encerrado en color rojo *V. cholerae* (LuxO), en naranja *P. augustum* (LuxO) y en azul *A. aeolicus* (NtrC1).

#### 10.1.10 Búsqueda de homólogos de proteínas involucradas en Quorum sensing en *A. baldaniorum* Sp245.

Se realizó la búsqueda de homólogos de las proteínas involucradas en Quorum sensing reportadas en literatura previa <sup>(27)(47)</sup> hasta el momento en el género *Vibrio*, debido a que LuxO es más estudiado por su relación con la comunicación celular en este modelo, se procede a ocupar como microorganismo de comparación a *V. cholerae* entre otros organismos y buscar homólogos de estas proteínas dentro del genoma de *A. baldaniorum* Sp245.

Se analizaron las proteínas pertenecientes a cualquiera de los 3 sistemas reportados de Quorum sensing en *Vibrio* <sup>(27)</sup>:

Código	Proteína	Función
>WP_001888250.1	LuxO	Regulador transcripcional acoplado a sigma-54 de Quorum sensing
BAE87106.1	LuxQ	Cinasa histidinica
BAE87105.1	LuxP	Receptor acoplado a LuxQ
BAE87114.1	LuxS	Acyl-homoserin lactona sintetasa
AWB73124.1	LuxR	Regulador transcripcional
BAE87111.1	LuxU	Fosfotransferas de Histidina
WP_219208515.1	CqsA	Alfa-hydroxicetona sintetasa de autoinductor
WP_001897118.1	CqsS	Cinasa histidinica
WP_000340100.1	HapR	Regulador transcripcional maestro de Quorum sensing
pdb 1YG2	AphA	Activador genetico
AET28634.1	LuxN	Cinasa histidinica
EKM23535.1	LuxM	Acyl-homoserin lactona sintetasa

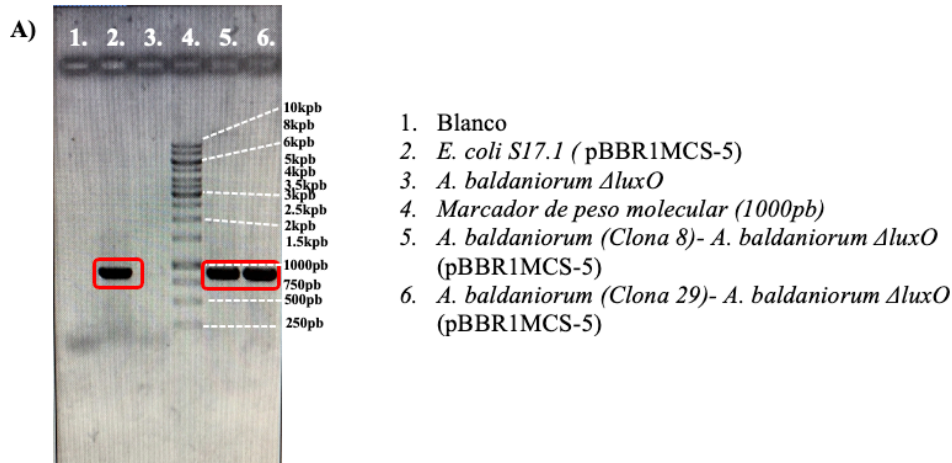
**Tabla 1. Proteínas pertenecientes a sistemas de QS en *Vibrio*.**

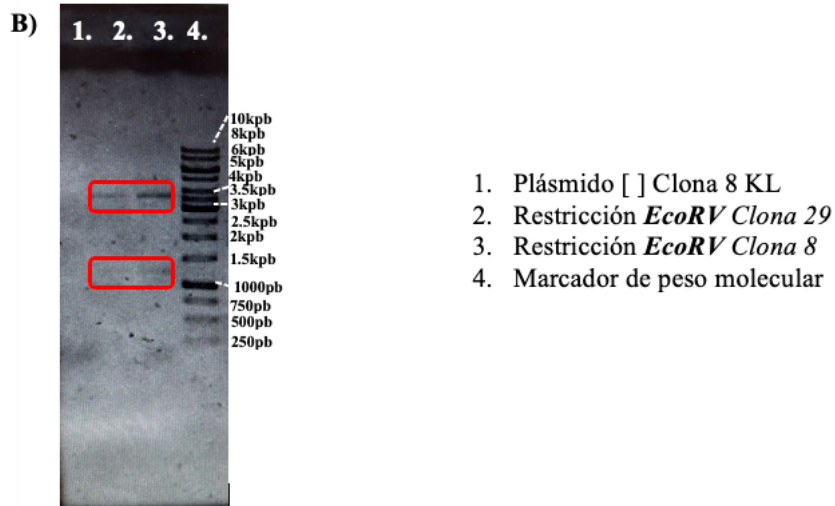
Se encontraron en el genoma de *A. baldaniorum* Sp245 proteínas con una cobertura menor al 30% en algunos casos y una identidad menor al 40% (**Anexo 4**). Por lo que se decidió descartar la posibilidad de que la proteína LuxO-L de *A. baldaniorum* Sp245 estuviera

involucrada en las vías canónicas del Quorum Sensing al no contar con la maquinaria para generar las moléculas AHL (Acyl-Homoserin-Lactonas).

## 10.2 Obtención de la cepa control *A. baldaniorum* $\Delta luxO$ (pBBR1MCS-5)

Una vez obtenido el plásmido pBBR1MCS-5 se realizó la conjugación con *E. coli* S17.1 en células *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$ , se obtuvieron transcojugantes que se analizaron por PCR para la confirmación de la conjugación y por restricción para comprobar que la conjugación fue exitosa (**Figura 26A**). Se realizó la PCR con los primers **Gm-R** y **M13-F** para comprobar que se tuviera esta secuencia presente en las clonas 8 y 29. Se esperaba un amplificado de ~820 pb. Para la digestión se utilizó a la enzima **EcoRV** para comprobar que se tuviera el plásmido en las clonas 8 y 29 Se esperaba un corte con pesos de ~1200 y ~3,500 pb (**Figura 26B**).



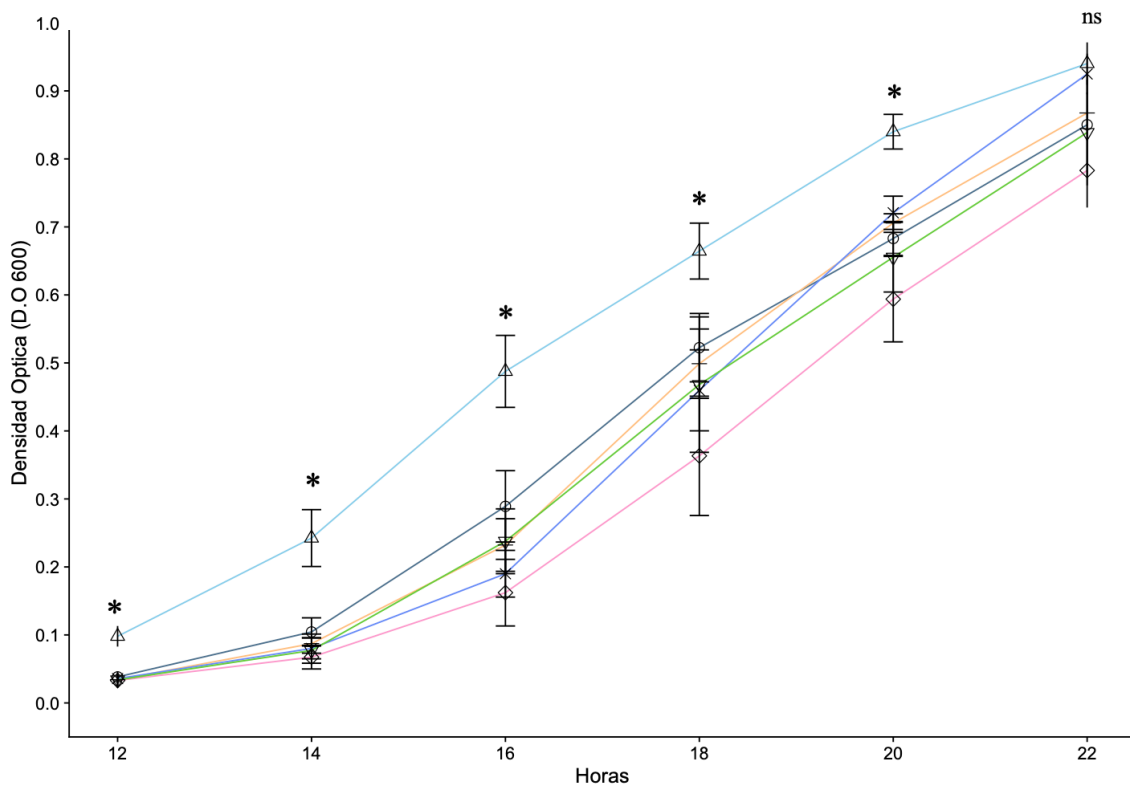


**Figura 25. Comprobación de la conjugación de *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  (*pBBR1MCS-5*).**

A) Comprobación de la conjugación por PCR. B) Comprobación por restricción enzimática con *EcoRV* de la clona 8 y 29, se observan 2 fragmentos con un peso de 1,200 pb y 3,500 pb correspondientes a la digestión planteada del plásmido *pBluxO*.

### 10.3 Curva de crecimiento en medio D

El efecto de la mutación por eliminación del gen *luxO-L*, se observó en el crecimiento de la cepa por medio de la determinación de la curva de crecimiento por espectrofotometría (Fig.27). Se observó un crecimiento mayor en  $DO_{600nm}$  por parte de la cepa *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  en el medio D en comparación con el resto de las cepas en las fases de latencia y crecimiento exponencial.



**Figura 26. Curva de crecimiento de cepas de *A. baldaniorum* Sp245 en medio Difco (D).**

Curva de crecimiento de las cepas *A. baldaniorum* Sp245 (Wild-type) en color azul marino, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  en color azul cielo, Sp245 (*pBluxO*) en color naranja, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  (*pBluxO*) en color morado, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  (*pBBR1MCS-5*), en color verde, *A. baldaniorum* Sp245(*pBBR1MCS-5*) en color rosa. Los datos que se presentan son resultado de 3 ensayos independientes y se muestra el error estándar. [\* significa una diferencia de  $<.05$  p, \*\* significa una diferencia  $<.01$  p y \*\*\* significa una diferencia  $<.001$  p, ns= no hay diferencia significativa].

### 10.3.1 Tiempo de generación en medio D

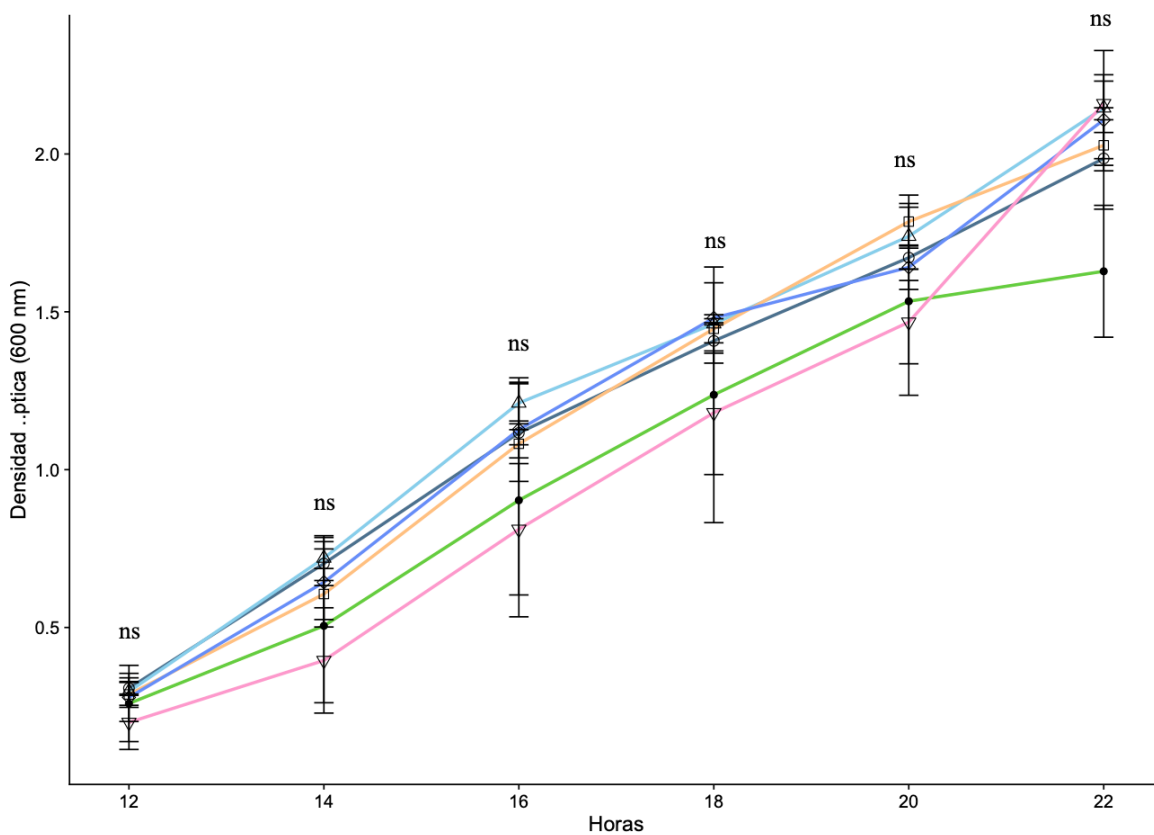
El tiempo de generación bacteriano calculado en un intervalo de 2 hrs en la fase exponencial usando como medida las UFC/ml nos da como resultado un crecimiento muy lento para la cepa *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  mientras que las demás cepas se comportan acorde a *A. baldaniorum* Sp245.

Cepa	Media $\pm$ SE (min)
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	37.8 $\pm$ 1.39
<i>A. baldaniorum</i> $\Delta luxO$	165.2 $\pm$ 44.12
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 (pBluxO)	48.4 $\pm$ 16.38
<i>A. baldaniorum</i> $\Delta luxO$ (pBluxO)	49.6 $\pm$ 16.82
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 (pBBR1MCS-5)	28.2 $\pm$ 1.39
<i>A. baldaniorum</i> $\Delta luxO$ (pBBR1MCS-5)	21.2 $\pm$ 2.29

**Tabla 2. Tiempo de generación a las 16 y 18 hrs de *A. baldaniorum* Sp245 en medio Difco.**

## 10.4 Curva de crecimiento en K-malato

Cuando se realizó la curva de crecimiento con el cambio de medio, así como de la fuente de carbono y nitrógeno, se observa que la cepa *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  y la cepa *A. baldaniorum* Sp245 crecen al mismo ritmo, también observamos un retraso en el crecimiento de las cepas *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  (pBBR1MCS-5) y *A. baldaniorum* Sp245 (pBBR1MCS-5), mientras que en las demás cepas no se observa diferencia alguna entre las cepas y su crecimiento ya que todas muestran el mismo fenotipo que *A. baldaniorum* Sp245.



**Figura 27. Curva de crecimiento de *A. baldaniorum* Sp245 en medio k-malato.**

Curva de crecimiento de las cepas *A. baldaniorum* Sp245 (Wild-type) en color azul marino, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  en color azul cielo, *A. baldaniorum* Sp245 (pBluxO) en color naranja, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  (pBluxO) en color morado, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  (pBBR1MCS-5) en color verde, *A. baldaniorum* Sp245(pBBR1MCS-5) en color

rosa. Los datos que se presentan son resultado de 3 ensayos independientes y se muestra el error estándar. [\* significa una diferencia de <.05p, \*\* significa una diferencia <.01 p y \*\*\* significa una diferencia <.001 p, ns= no hay diferencia significativa].

#### 10.4.1 Tiempo de generación en K-malato

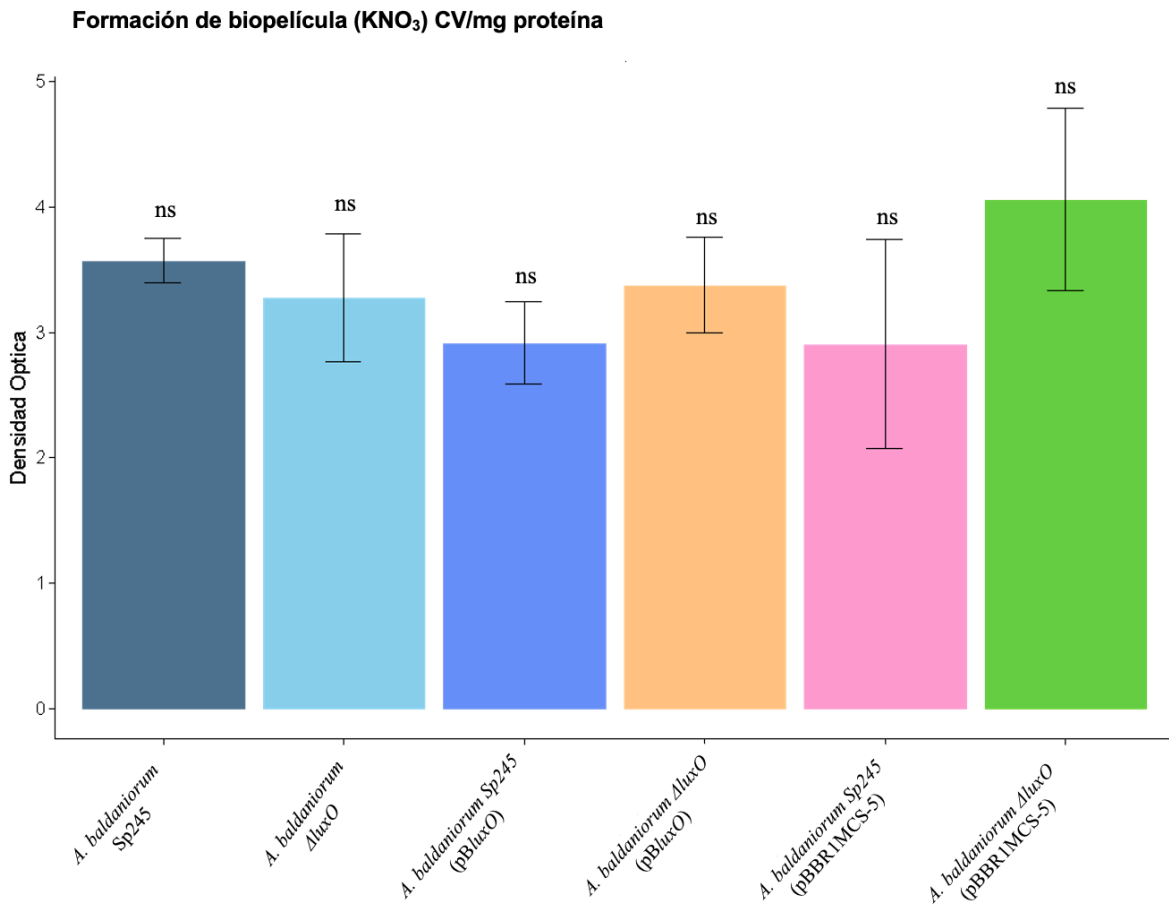
El tiempo de generación en el intervalo de 2 hrs en la fase exponencial nos da como resultado un crecimiento muy lento en la cepa *A. baldaniorum* Sp245 (p*BluxO*) [Sobreexpresión], mientras que en las demás cepas se observa un comportamiento parecido al de *A. baldaniorum* Sp245.

Cepa	Media ± SE (min)
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	24.21 ± 4.73
<i>A. baldaniorum</i> $\Delta luxO$	27.51 ± 0.73
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 (p <i>BluxO</i> )	112.68 ± 89.34
<i>A. baldaniorum</i> $\Delta luxO$ (p <i>BluxO</i> )	28.33 ± 0.57
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 (pBBR1MCS-5)	46.97 ± 1.51
<i>A. baldaniorum</i> $\Delta luxO$ (pBBR1MCS-5)	40.02 ± 3.30

**Tabla 3. Tiempo de generación a las 16 y 18 hrs de *A. baldaniorum* Sp245 en medio k-malato.**

## 10.5 Biopelícula KNO<sub>3</sub>

Se determinó la formación de biopelícula a 5 días en condiciones estáticas, los datos se muestran en la (Fig. 31) en donde se indica que no se obtuvieron diferencias significativas comparando con los valores obtenidos con la cepa *A. baldaniorum* Sp245.

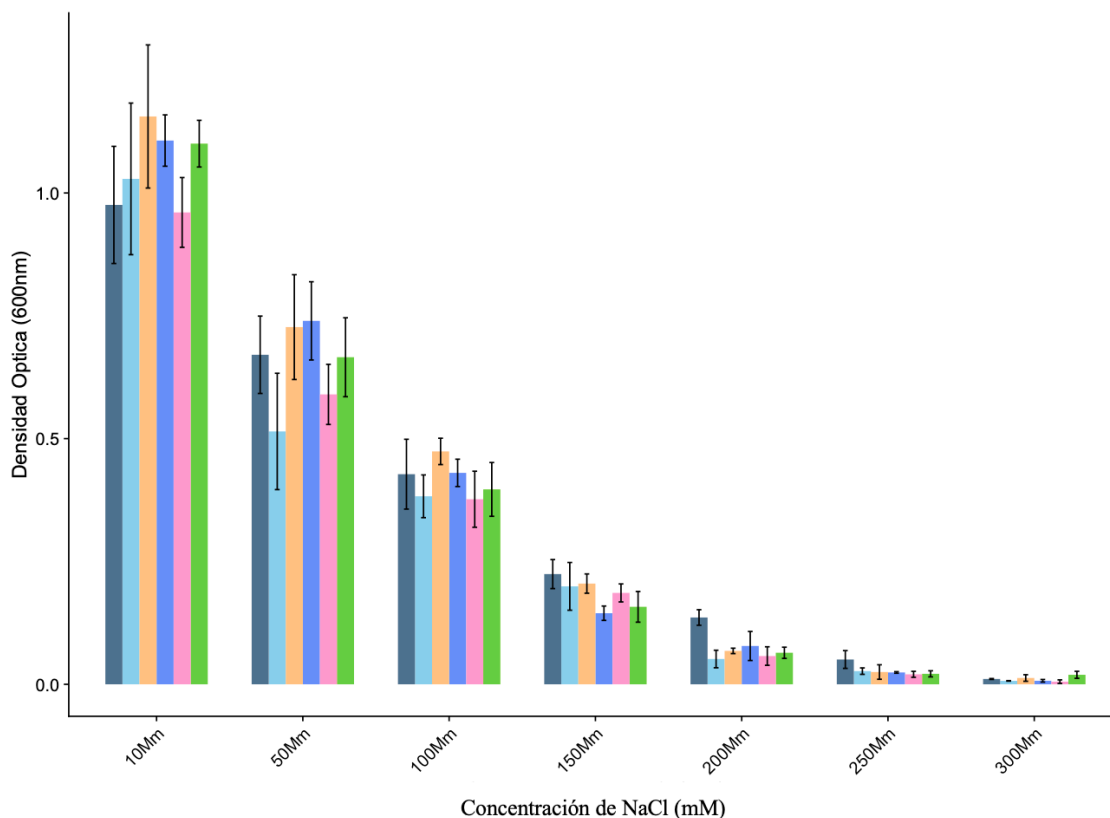


**Figura 28. Generación de biopelícula KNO<sub>3</sub>.**

Se normalizo con Cristal violeta/ Miligramos de proteína de las cepas *A. baldaniorum* Sp245 (Wild-type) en color azul marino, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  en color azul cielo, *A. baldaniorum* Sp245 (pBluxO) en color naranja, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  (pBluxO) en color morado, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  (pBBR1MCS-5), en color verde, *A. baldaniorum* Sp245(pBBR1MCS-5) en color rosa. Los datos que se presentan son resultado de 3 ensayos independientes y se muestra el error estándar. [\* significa una diferencia de <.05p, \*\* significa una diferencia <.01p y \*\*\* significa una diferencia <.001p, ns= no hay diferencia significativa].

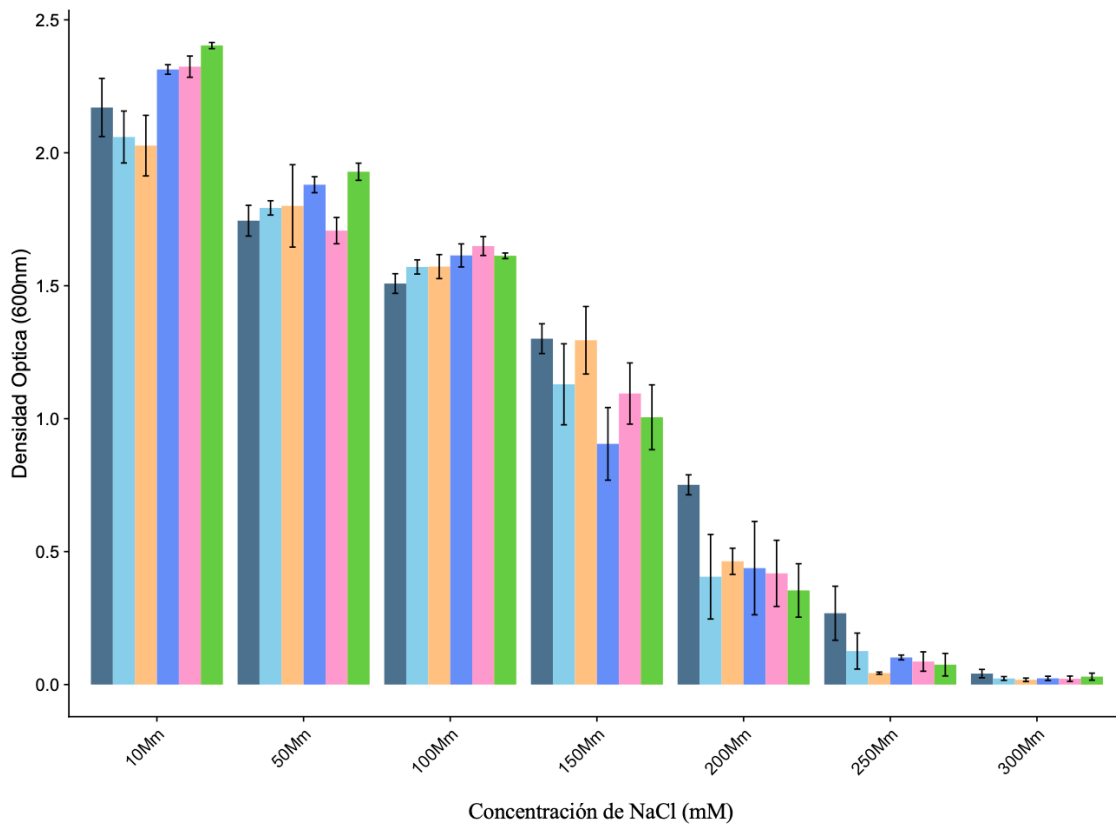
## 10.8 Susceptibilidad al NaCl en medio k-malato

En los datos obtenidos de crecimiento en las cepas al aumento a la concentración de NaCl a las 15 hrs (**Fig. 32**), como a las 22 hrs (**Fig.33**) no se observaron cambios significativos comparados con el valor obtenido con la cepa *A. baldaniorum* Sp245.



**Figura 29. Sensibilidad al NaCl a 15 hrs.**

Se midió la sensibilidad al sodio por parte de las cepas *A. baldaniorum* Sp245 (Wild-type) en color azul marino, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  en color azul cielo, *A. baldaniorum* Sp245 (pBluxO) en color naranja, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  (pBluxO) en color morado, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  (pBBR1MCS-5), en color verde, *A. baldaniorum* Sp245(pBBR1MCS-5) en color rosa. Los datos que se presentan son resultado de 3 ensayos independientes y se muestra el error estándar. [\* significa una diferencia de  $<.05$  p, \*\* significa una diferencia  $<.01$  p y \*\*\* significa una diferencia  $<.001$  p, ns= no hay diferencia significativa].

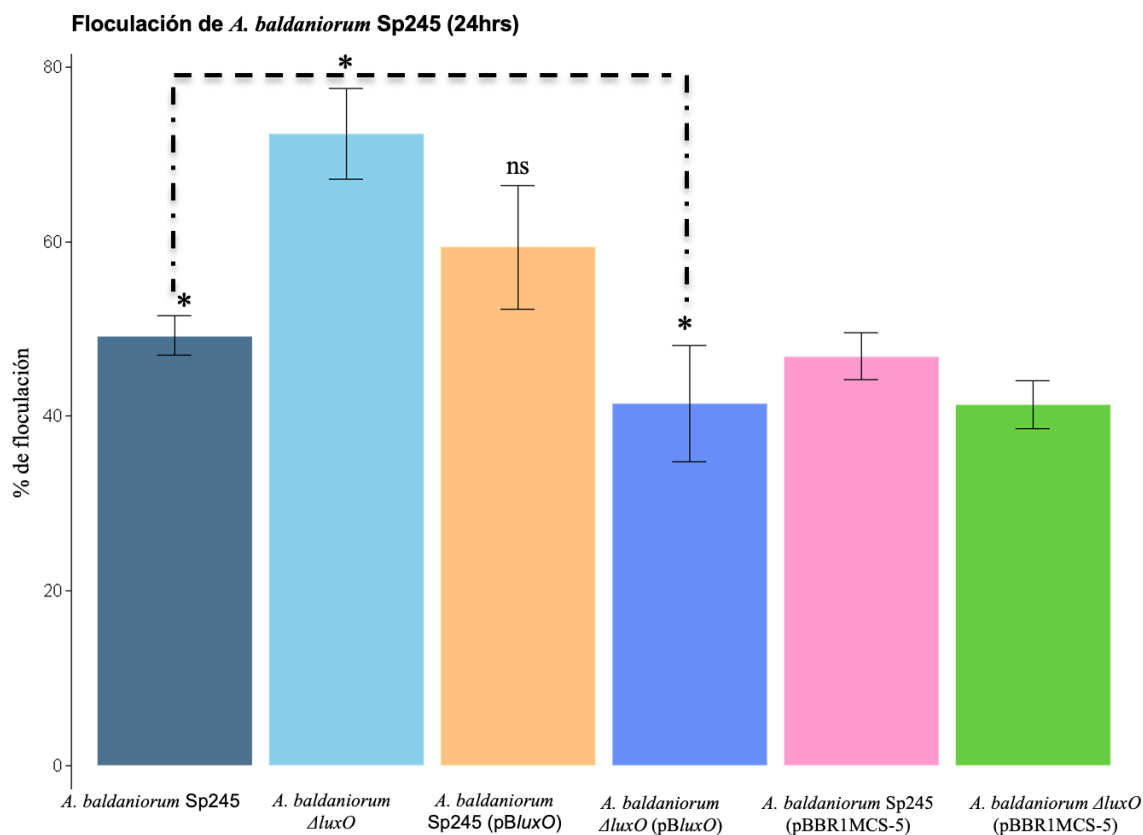


**Figura 30. Sensibilidad al NaCl a 22 hrs.**

Se midió la resistencia al sodio por parte de las cepas *A. balduaniorum* Sp245 (Wild-type) en color azul marino, *A. balduaniorum*  $\Delta luxO$  en color azul cielo, *A. balduaniorum* Sp245 (pBluxO) en color naranja, *A. balduaniorum*  $\Delta luxO$  (pBluxO) en color morado, *A. balduaniorum*  $\Delta luxO$  (pBBR1MCS-5), en color verde, *A. balduaniorum* Sp245(pBBR1MCS-5) en color rosa. Los datos que se presentan son resultado de 3 ensayos independientes y se muestra el error estándar. [\* significa una diferencia de  $<.05p$ , \*\* significa una diferencia  $<.01 p$  y \*\*\* significa una diferencia  $<.001 p$ , ns= no hay diferencia significativa].

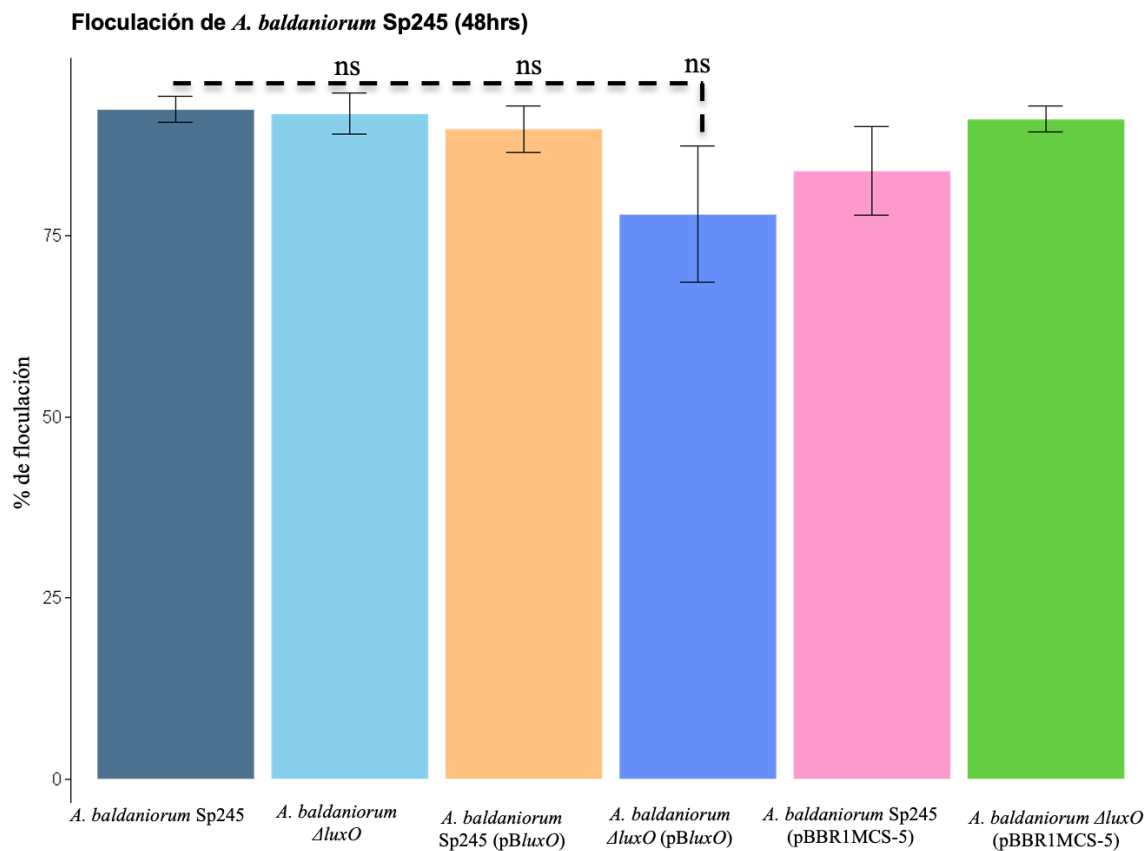
## 10.8 Floculación bacteriana con KNO<sub>3</sub> en 24 y 48 hrs.

En la floculación bacteriana con medio Floc adicionado con KNO<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno a las 24 hrs (**Fig. 34**) *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  mostró mayor floculación con respecto a la cepa silvestre *A. baldaniorum* Sp245 y demás cepas; fenotipo que se recupera con la complementación. La floculación es similar en todas las cepas al cabo de 48 h de crecimiento (**Fig.35**).



**Figura 31. Floculación bacteriana en KNO<sub>3</sub> a 24 hrs.**

Se midió el porcentaje de floculación por parte de las cepas *A. baldaniorum* Sp245 (Wild-type) en color azul marino, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  en color azul cielo, *A. baldaniorum* Sp245 (pBluxO) en color naranja, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  (pBluxO) en color morado, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  (pBBR1MCS-5), en color verde, *A. baldaniorum* Sp245(pBBR1MCS-5) en color rosa usando UFC/ml. Los datos que se presentan son resultado de 3 ensayos independientes y se muestra el error estándar. [\* significa una diferencia de <.05 p, \*\* significa una diferencia <.01p y \*\*\* significa una diferencia <.001p, ns= no hay diferencia significativa].

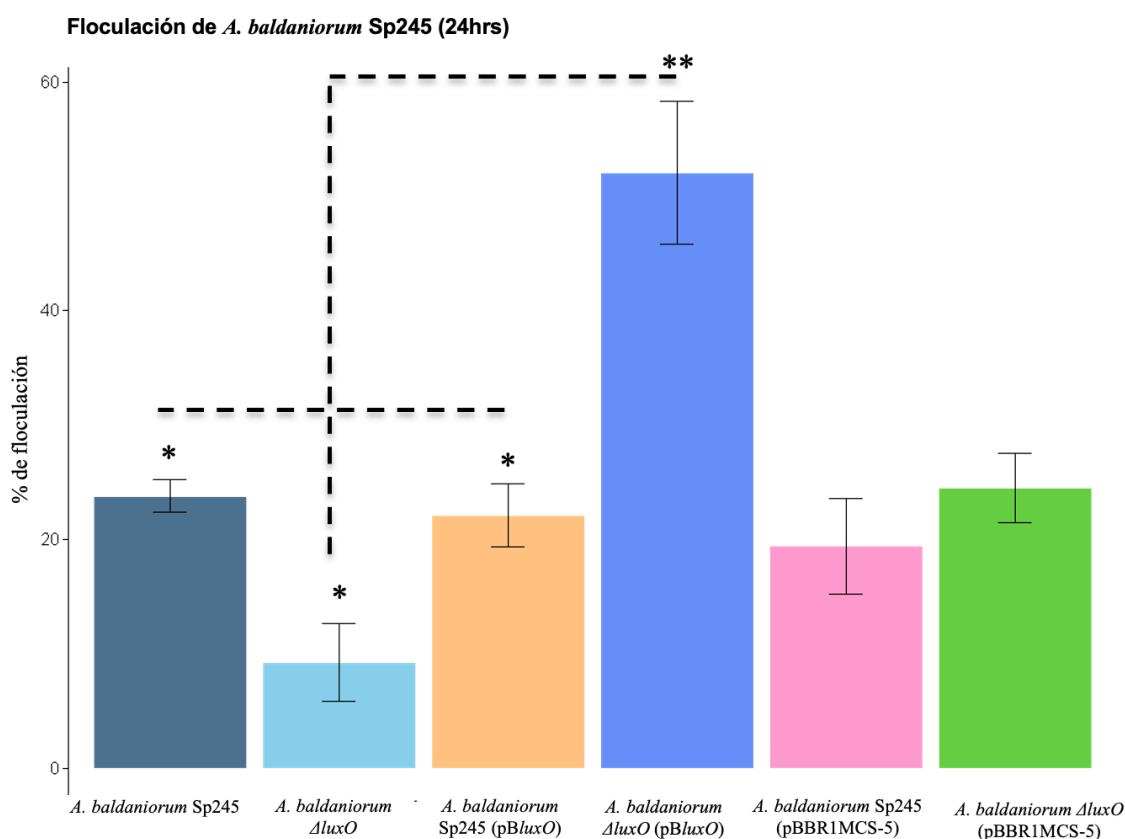


**Figura 32. Floculación bacteriana en  $KNO_3$  a 48 hrs.**

Se midió el porcentaje de floculación por parte de las cepas *A. baldaniorum* Sp245 (Wild-type) en color azul marino, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  en color azul cielo, *A. baldaniorum* Sp245 (pBluxO) en color naranja, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  (pBluxO) en color morado, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  (pBBR1MCS-5), en color verde, *A. baldaniorum* Sp245(pBBR1MCS-5) en color rosa usando UFC/ml. Los datos que se presentan son resultado de 3 ensayos independientes y se muestra el error estándar. [\* significa una diferencia de  $<.05p$ , \*\* significa una diferencia  $<.01p$  y \*\*\* significa una diferencia  $<.001 p$ , ns= no hay diferencia significativa].

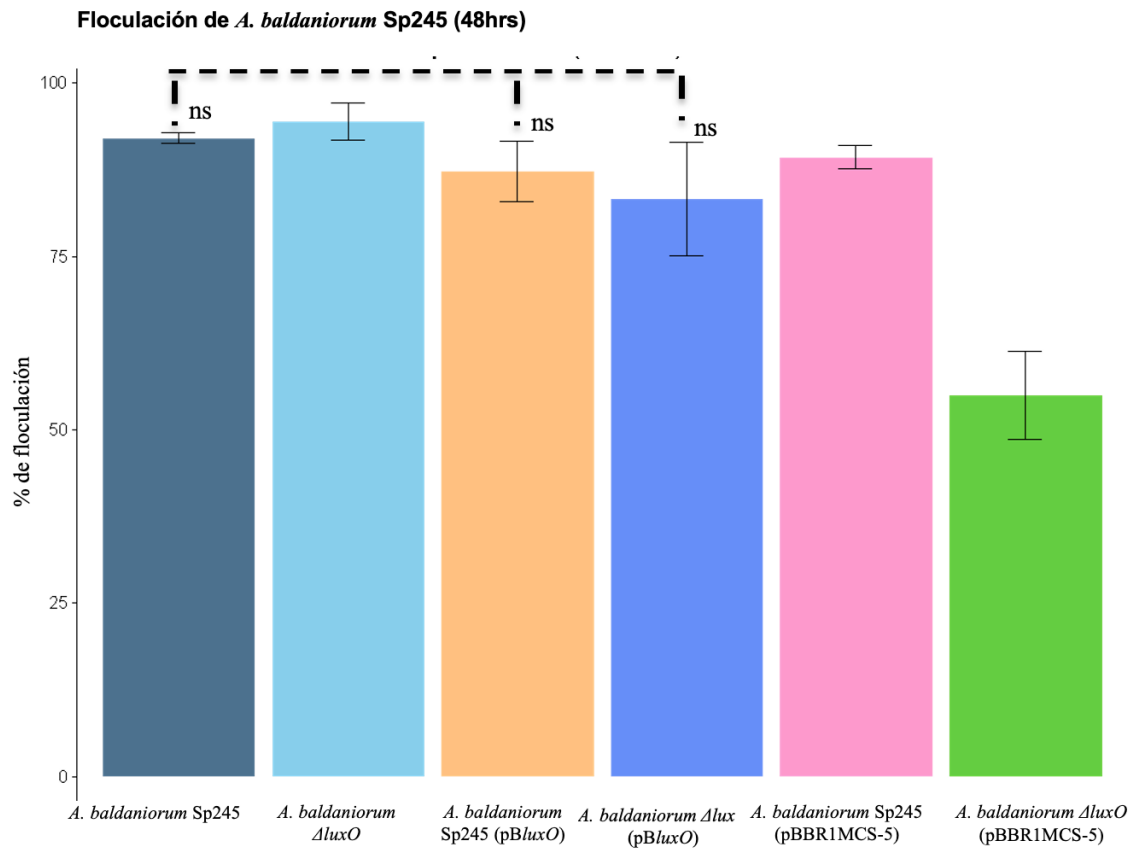
## 10.9 Floculación bacteriana con NH<sub>4</sub>Cl en 24 y 48 hrs.

Determinamos la floculación bacteriana en el medio Floc adicionado con NH<sub>4</sub>Cl como fuente de nitrógeno a las 24 hrs (**Fig. 36**). La cepa *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  mostró menor floculación con respecto a las demás cepas, e incluso se observa que, cuando se complementa con el gen la floculación se ve aumentada de manera temprana con respecto a la cepa silvestre. Mientras que *A. baldaniorum* Sp245 (pBluxO), que contiene varias copias extras del gen “luxO”, es similar la cepa silvestre. En cuanto a las 48 h (**Fig. 37**) el fenotipo de floculación en todas las cepas.



**Figura 33. Floculación bacteriana en NH<sub>4</sub>Cl a 24 hrs.**

Se midió el porcentaje de floculación por parte de las cepas *A. baldaniorum* Sp245 (Wild-type) en color azul marino, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  en color azul cielo, *A. baldaniorum* Sp245 (pBluxO) en color naranja, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  (pBluxO) en color morado, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  (pBBR1MCS-5), en color verde, *A. baldaniorum* Sp245(pBBR1MCS-5) en color rosa usando UFC/ml. Los datos que se presentan son resultado de 3 ensayos independientes y se muestra el error estándar. [\* significa una diferencia de <.05p, \*\* significa una diferencia <.01p y \*\*\* significa una diferencia <.001p, ns= no hay diferencia significativa].



**Figura 34. Floculación bacteriana en  $NH_4Cl$  a 48 hrs.**

Se midió el porcentaje de floculación por parte de las cepas *A. baldaniorum* Sp245 (Wild-type) en color azul marino, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  en color azul cielo, *A. baldaniorum* Sp245 (pBluxO) en color naranja, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  (pBluxO) en color morado, *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  (pBBR1MCS-5), en color verde, *A. baldaniorum* Sp245(pBBR1MCS-5) en color rosa usando UFC/ml. Los datos que se presentan son resultado de 3 ensayos independientes y se muestra el error estándar. [\* significa una diferencia de  $<.05p$ , \*\* significa una diferencia  $<.01p$  y \*\*\* significa una diferencia  $<.001 p$ , ns= no hay diferencia significativa].

## 11. DISCUSIÓN

El medio ambiente en el que viven las bacterias no es estático más bien cambiante, es por esto que la respuesta a estímulos está regulada por una serie de diversos sistemas cuyos componentes son receptores y aceptores de señales externos en la mayoría de los casos, entre ellos, los sistemas más estudiados son los de doble componente (TCS) cuya importancia recae en la traducción y especificación de la señal proveniente del exterior, así como la respuesta que se genera en la bacteria. El gen *luxO* de *A. baldaniorum* Sp245 forma parte de un propuesto set de genes primeramente nombrados y descubiertos durante el análisis realizado por Gamboa en el 2014 <sup>(35)</sup>, donde se localizaron en las inmediaciones y bajo el mismo sentido de traducción, los genes codificantes de manera presuntiva para 2 histidinas cinasas cuyo estudio se inició en el laboratorio de la interacción bacteria-planta y nombradas como: HkhB <sup>(33)</sup> y HkhC <sup>(34)</sup> así como 3 reguladores de respuesta propuestos: CdgE <sup>(35)</sup>, CheY-L <sup>(48)</sup> y LuxO-L (este estudio). El gen *luxO* que codifica para la proteína LuxO-L se encuentra ubicado en el plásmido 3 de *A. baldaniorum* Sp245 y cuenta con características específicas que nos podrían sugerir su funcionalidad, principalmente con base a su secuencia aminoacídica pues cuenta con mayor similitud a una proteína de tipo LuxO presente en los organismos como *P. augustum* <sup>(26)</sup> y *V.cholerae* <sup>(47)</sup> que a una proteína de tipo NtrC 1 <sup>(43)</sup> descrita y estudiada principalmente en *A. aeolicus* (**Fig. 10**). LuxO-L esta conservada en distintas especies con secuencias similares y porcentajes de identidad entre el **55-86%**, cobertura superior a **96%** y un e-value superior a **1e-168** (**Anexo 1**), La proteína presenta una estructura secundaria similar con las proteínas *P. augustum* <sup>(26)</sup> y *V.cholerae* <sup>(47)</sup> (**Fig.15**) y contiene los dominios **REC, AAA+ y HTH** (**Fig.9**) similar a los descritos que se encuentran presentes de igual manera en la subfamilia de proteínas NtrC I <sup>(22)</sup>; por lo tanto, sugerimos que forma parte de la familia de las BEBPs y dentro de ésta se ubica en la subfamilia tipo I, cuyos miembros han sido ampliamente estudiados por su estrecha relación con el factor sigma 54 <sup>(22)</sup>. Algunas se relacionan a la regulación del metabolismo del nitrógeno <sup>(49)</sup>. Dentro de esta subfamilia se encuentran LuxO y NtrC 1 que son reguladores de respuesta, estudiados por sus funciones únicas, en el caso de LuxO es un regulador de respuesta asociado a Quorum Sensing en *Vibrio* <sup>(50)</sup>, mientras que la proteína NtrC 1 se asocia a la regulación del metabolismo del nitrógeno <sup>(47)(48)</sup>. La secuencia de LuxO está ampliamente conservada en el

género *Azospirillum* según análisis realizados de alineamiento de secuencias en este estudio (**Anexo 1**); Sin embargo, en un estudio realizado en el año 2014 donde se analizó el plasmidoma de *A. baldaniorum* Sp245 se encontró que menos del 20% de las proteínas presentes en el plásmido 3 en donde se localiza el gen *luxO* estaban conectados a eventos de transferencia horizontal de genes en bacterias de diferentes géneros <sup>(53)</sup> por lo que se puede especular que se presentara una diferenciación a través de eventos de recombinación intragenica.

Por medio de análisis filogénicos se obtuvo que la secuencia perteneciente a LuxO de *V. cholerae* y la secuencia de LuxO-L de *A. baldaniorum* Sp245 se localizan en linajes diferentes de esta familia pese a la similitud en su arquitectura, generando una separación de familias notorias entre las secuencias de eubacterias (**Fig. 11**), ya que se ha descrito que, en el género *Azospirillum* solo unas pocas especies poseen el mecanismo de Quorum sensing, por los auto inductores de tipo homoserino lactonas (HSLs), la excepción es *Azospirillum lipoferum*, en esta especie se describió la producción de una HSL <sup>(49)</sup>. Lo que es interesante de especular es que, esta proteína si bien posee similitud en cuanto los dominios, podría haber sufrido una expansión en su desempeño cómo regulador transcripcional, asociado a una regulación de funciones que le permitan una mejor interacción con la planta, aspectos aún no establecidos en este estudio.

El análisis filogénico realizado con secuencias obtenidas de 100 eubacterias permitió identificar una secuencia muy similar a la de LuxO-L de *A. baldaniorum* Sp245, que pertenece a *A. argentinense* con una similitud del **86%** y una cobertura del **99%** (**Anexo 1**), lo que podría significar que ambas proteínas pudieran provenir de un ancestro en común pues se ubican en la misma rama de la familia indicando que ambas proteínas pudieran estar relacionadas a una función específica presente en ambas bacterias al ser secuencias homólogas. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de secuencias genómicas de especies del género que se encontraran cerradas a nivel genómico, en la base de datos del NCBI para una mayor validez; es interesante comentar que, la mayoría de secuencias del género *Azospirillum* utilizadas para el estudio presentaban al menos 2 secuencias con una similitud por arriba del **45%** de cobertura a LuxO-L en su genoma (**Fig. 12**). Se detectó que hay varios genes parálogos a LuxO-L presentes en el genoma (**Anexo 2**), lo que significaría que existe

redundancia genómica. Se continuó con el estudio de la relación que existía entre NtrC 1, LuxO y LuxO-L en donde se descubrió que cada proteína, aunque sus secuencias fueran parecidas formaban su propia familia siendo LuxO-L de *A. baldaniorum* y *A. argentinense* clasificadas de manera diferente al resto (**Fig.13**) concluyendo que, aunque son proteínas que parecen tener una relación cercana, podrían ser genes ortólogos presentes en el género *Azospirillum*.

Con respecto a la estructura de la proteína LuxO-L se utilizó inteligencia artificial con ayuda de la plataforma Alphafold-3 <sup>(38)</sup> que nos permitió modelar la estructura tridimensional (**Anexo 7**) a través de su secuencia aminoacídica **WP\_014198786.1** (**Fig.14**) con un puntaje pTM > 0.5 y una predicción entre aminoácidos pLDDT de muy alta confiabilidad (arriba de 70) <sup>(54)</sup>, para que a través de análisis comparativos con los cristales de LuxO de *Photobacterium augustum* (Código de acceso PDB: 5EP0 y 5EP2) y NtrC 1 de *A. aeolicus* (Código de acceso PDB: 4L4U) reportados anteriormente procesar la información. Se procedió a analizar la proteína LuxO-L utilizando el programa Foldscript v0.9 (**Fig.15**) en el que pudimos diferenciar la estructura con mayor similitud siendo el modelado perteneciente a LuxO-L de *A. baldaniorum* Sp245 nombrado **AbalSp245\_0** la estructura seleccionada para el estudio, de igual manera se obtuvieron como resultado del análisis los códigos de los cristales reportados con mayor homología a LuxO-L. Se encontró que el cristal **5EP0** perteneciente a *P. augustum* es el que mayor parecido tiene tanto estructural como de secuencia con LuxO-L, *P. augustum* es un microorganismo gram negativo, móvil, facultativamente aerobio perteneciente a la familia *Vibrionaceae* que vive en asociación con animales marinos y se encuentra en el mar ampliamente distribuido, es patógeno para humanos y cuenta con especies tanto luminiscentes como no luminiscentes <sup>(55)</sup>.

El análisis nos mostró que los dominios **REC** de las proteínas son los dominios que más variabilidad presentan y es comprensible debido a la variabilidad de las señales, estos dominios varían de manera considerable en su secuencia aminoacídica <sup>(40)</sup> sin embargo la conservación de ciertos aminoácidos necesarios para llevar a cabo la fosforilación como el aspartato 54/55 <sup>(17)</sup> (**Fig.16**) indica su funcionalidad. En este caso LuxO-L conserva la péntada **ED, D, S/T, Y/F, K** (**Fig.17**) de aminoácidos descrita por Brüderlin, ya que es el motivo que acepta el grupo fosforilo cedido por algún dominio Hpt <sup>(56)</sup>.

En cuanto al dominio AAA+ es de los más conservados, tanto en estructura como en función; este ha sido descrito en otras proteínas con diversas funciones como: proteínas de degradación, replicación genética, reparación genética, etc <sup>(57)</sup>; la diferencia principal entre estas proteínas se localiza en los aminoácidos involucrados en la cavidad de interacción (**Fig.18**) que son los encargados de llevar a cabo la unión del ATP <sup>(26)</sup>, en el caso de LuxO perteneciente a *P.augustum* tenemos **ARG316, LEU330, GLN363** en la posición correcta formando la triada catalítica descrita <sup>(26)</sup>, mientras que en NtrC 1 perteneciente a *A. aeolicus* tenemos sustituciones en algunos aminoácidos esenciales que son los descritos de importancia <sup>(43)</sup> **ARG316, LYS327, LYS371**; sin embargo, la posición se conserva en el contexto tridimensional pues al ser proteínas distintas su longitud es variable, en el caso de LuxO-L tenemos **ARG324, LEU339, ILE371** en donde la única diferencia que tenemos es la **ILE371** que se cambia por un residuo de glutamato en LuxO de *P. augustum* (**Fig.19**), mientras que se conservan los demás aminoácidos presentes en la cavidad de interacción y entre la mayoría el único que parece tener una actividad no reemplazable es la **Arginina** al conservarse al fondo de la cavidad, sin embargo el cambio de aminoácidos no afecta a la función de la cavidad de interacción, es más un vestigio conservado entre dominios AAA+ <sup>(26)</sup>, ya que de igual manera en el proceso de hidrólisis de ATP se encuentran involucrados los motivos **Walker A y Walker B (Fig. 19)** que forman asas en la estructura tridimensional y son capaces de hacer posible la unión del ATP y facilitar la hidrólisis del mismo a través de la unión de un cofactor necesario como el  $Mg^{2+}$  lo que conlleva a la hidrólisis de la molécula de ATP <sup>(38)</sup>. Con respecto a la forma en la que se podría regular la proteína LuxO, la **glicina 141** es un residuo que es necesario para poder llevar a cabo la interacción con ATP cuando la proteína se encuentra fosforilada, pues este residuo permite la interacción debido a su carga nula y tamaño pequeño, mientras que cuando se encuentra defosforilada la proteína, este residuo genera la interacción con la cavidad cerrándola y no permitiendo la unión de la molécula de ATP siendo esta forma de regulación algo nuevo demostrado hasta el momento solo en LuxO <sup>(23)</sup>, ya que en NtrC 1 esta interacción no es posible por la falta de la glicina, teniendo un cambio por un ácido glutámico (E) <sup>(58)</sup>. Por lo tanto, se sugiere que LuxO-L funcionaria de una manera similar en cuanto a su regulación pues cuenta con la glicina presente en la misma posición que LuxO; además, el linker presente en la región **REC-AAA+** en LuxO-L parece ser más rígido lo que daría la forma de una proteína NtrC 1

(Fig.22). Sin embargo, al ser un modelado y no un cristal la predicción de la proteína es posible que no sea exacta <sup>(59)</sup>, ya que se ha descrito que el linker no es una región que conserve identidad entre los diferentes géneros y especies <sup>(26)</sup>, siendo cada uno distinto. Otra característica fundamental presente en la mayoría de dominios AAA+ es el motivo de unión al factor sigma 54 [GAFTGA] y que está conservado en LuxO-L, el motivo es parte de un asa (Fig.21) que se genera en el hexámero capaz de contactar con sigma 54 <sup>(22)(41)</sup> en la parte externa. Finalmente se localizó en la secuencia el dominio HTH el cual es difícil de cristalizar porque siempre está en contacto con el ADN, sin embargo, se ha logrado analizar de maneras diversas su función <sup>(60)</sup>. En el caso del dominio HTH de LuxO-L según los análisis por alineamiento de secuencias se encontró que este dominio es más parecido al dominio HTH de LuxO de *P. augustum* (más del 50% de identidad) que al dominio HTH de NtrC 1 de *A. aeolicus*, a pesar de que se observó baja identidad en los residuos de aminoácidos (menos del 27% de identidad) (Anexo 5 y 6). Aunado a estas características, la estructura secundaria se conserva, así como la estructura tridimensional, por tanto, se propone que LuxO-L es una proteína de tipo BEBP.

Debido a la similitud encontrada entre LuxO y LuxO-L se pensó en revisar la secuencia del genoma de *A. baldaniorum* Sp245 con el fin de localizar secuencias homologas a las histidinas cinasas o de proteínas que se relacionaran con el Quorum sensing <sup>(58)(59)</sup> usando como base las proteínas descritas previamente de *V. cholerae* (Fig.25), posterior al análisis se encontró que en el genoma de *A. baldaniorum* Sp245 no hay proteínas homologas a las presentes en *V. cholerae* pues solo se encontraron proteínas con baja identidad entre el 30-40% y una cobertura menor al 40%, que podría pertenecer a los dominios de una histidina cinasa con alguna otra función, así como a homólogos de genes que codifiquen a homoserino lactonas sintasas, que produzcan auto inductores (HSL) <sup>(63)</sup>. Los datos arrojan que LuxO-L es una proteína con arquitectura y secuencia similar a las presentes en ambas LuxO y NtrC 1 por lo que se propone sea una proteína capaz de recibir el fosfato en el dominio REC y contactar con sigma 54 por medio del motivo GAFTGA presente en el dominio AAA+ regulándose de manera similar a LuxO.

Con el objetivo de iniciar la caracterización experimental del gen *luxO* se analizaron fenotipos que tuvieran relación con la interacción bacteriana en el entorno con la planta, pues es un proceso fundamental en el ciclo de vida de la bacteria <sup>(8)(64)(65)</sup>, Se inicio con la determinación de la curva de crecimiento y el tiempo de generación en el medio D de las cepas *A. baldaniorum ΔluxO*, *A. baldaniorum Sp245*, la cepa sobre-expresada, la cepa complementada y sus respectivos controles (albergando el plásmido vacío) (Fig. 27 y 28). Los resultados obtenidos muestran que hay una mayor D.O de la cepa *A. baldaniorum ΔluxO* en comparación con las demás cepas, además se observó un retraso en el crecimiento de la cepa *A. baldaniorum Sp245* (pBBR1MCS-5), que se podría explicar por la carga génica a la que se somete debido al vector que se utilizó <sup>(66)(67)</sup> como en el estudio realizado por Castañón en 2022 <sup>(48)</sup> en donde se observó que el plásmido utilizado en ese estudio generó un efecto en *A. baldaniorum Sp245* probablemente debido a la carga génica que implica en la bacteria. Las demás cepas presentaron un crecimiento uniforme en donde no se presenta alteración alguna, sin embargo, al realizar el cambio a otro medio como es el k-malato que es un medio de crecimiento mínimo utilizado ampliamente para crecer *A. baldaniorum Sp245* <sup>(68-70)</sup>, podemos observar que las cepas *A. baldaniorum ΔluxO* y *A. baldaniorum Sp245* crecen al mismo ritmo (Fig. 29 y 30), por lo tanto se pierde la ventaja en crecimiento que se generaba por parte de la cepa *A. baldaniorum ΔluxO*, sugiriendo que podríamos estar viendo un efecto en la densidad celular por parte de la eliminación de la proteína en el medio, al ser el medio Difco un medio rico tiene una variedad muy grande de nutrientes <sup>(71)</sup>, por lo que podemos pensar que en el medio mínimo k-malato podríamos tener un compuesto que está interfiriendo en el crecimiento de la cepa *A. baldaniorum ΔluxO*, o estamos generando un tipo de estrés a la cepa pues estamos limitando los nutrientes vitales, como la fuente de carbono al agregar malato como fuente principal <sup>(72)</sup>, o la fuente de nitrógeno al agregar  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fuente de nitrógeno principal pues se ha reportado la generación de flóculos en *Azospirillum* bajo condiciones de estrés en donde se ve implicado el metabolismo de carbono y nitrógeno <sup>(73)</sup>.

Al analizar los resultados del tiempo de generación se descubrió que la cepa *A. baldaniorum ΔluxO* en el medio Difco tiene un tiempo de generación largo en el intervalo de 2 horas durante la fase de crecimiento exponencial, lo que implica una reducción del crecimiento

celular, sugiriendo generalmente una viabilidad celular baja <sup>(74)</sup>, sin embargo hasta el momento no hay información al respecto de que una proteína de tipo LuxO o NtrC pueda influir en el ciclo celular de manera directa. Otra explicación probable es la generación de conglomerados celulares que aprovechando las limitantes de los ensayos podrían pasarse por alto, pues el fenotipo de floculación si se ha reportado previamente como un fenotipo controlado en cierta parte por la proteína LuxO <sup>(75)</sup>, y de igual manera en el género *Azospirillum* se ha visto a la floculación como un mecanismo de respuesta al estrés ambiental que permite la supervivencia de células viables <sup>(76)(77)</sup>. Las demás cepas mostraron un tiempo de generación parecido a *A. baldaniorum* Sp245. Finalmente, el tiempo de generación calculado en k-malato la cepa *A. baldaniorum* Sp245 (pBluxO) fue la que presentó en la misma brecha de tiempo, un tiempo de generación largo con respecto a la cepa silvestre, mientras que las demás cepas no tuvieron cambios significativos en el tiempo de generación.

La generación de biopelícula al igual que la floculación bacteriana son procesos que se pueden ver afectados por la cantidad, densidad y tipo de exopolisacáridos o polisacáridos capsulares presentes y segregados por la bacteria, los cuales dan lugar a la matriz extracelular <sup>(78)(79)</sup>. En el caso de la biopelícula, esta alteración se puede dar por estrés generado por la relación de nitrógeno/carbono en el medio <sup>(80)(81)</sup>. La proteína LuxO de *V. cholerae* <sup>(82)</sup> está relacionada estrechamente con la formación de biopelícula y NtrC con la generación de exopolisacáridos tanto en *Vibrio* como en otras especies <sup>(83)(84)</sup>. En este trabajo, la determinación se realizó en el medio mínimo k-malato adicionado con KNO<sub>3</sub>, en donde no se observó una diferencia estadísticamente significativa bajo estas condiciones de cultivo **(Fig.31)**.

Considerando los datos experimentales obtenidos de Gamboa A. 2014 <sup>(35)</sup> y, que el estrés osmótico es una condición que la bacteria puede sufrir en condiciones de campo, procedimos a estudiar la respuesta de las cepas construidas en condiciones de crecimiento en concentraciones altas NaCl a las 15 y 22 h. De acuerdo con los datos obtenidos en este trabajo, no se observaron diferencias en el crecimiento en las cepas desde los 10mM a los 150mM pero a partir de los 200mM de NaCl, con respecto a la cepa silvestre todas las cepas muestran un menor crecimiento, por lo que se propone que la regulación de genes que

generen resistencia al estrés osmótico alto está llevándose de manera adecuada y que el gen *luxO* no interviene en la función de los mismos.

Una característica ya descrita de *A. baldaniorum* Sp245 es la floculación debido a la formación de “grumos” de células, en presencia del oxígeno que permite a *Azospirillum* fijar nitrógeno bajo dichas condiciones <sup>(85)</sup>. Por lo tanto, procedimos a realizar ensayos de floculación usando el medio de floculación sin agregar nitrógeno, al cabo de 24 h se observó la ausencia de crecimiento, esto posiblemente debido al exceso de oxígeno y/o microelementos ausentes en el medio y necesarios para la actividad de la nitrogenasa <sup>(86)(87)</sup>. Por lo tanto, procedimos a evaluar la floculación en diferentes fuentes de nitrógeno como son **KNO<sub>3</sub>** y **NH<sub>4</sub>Cl**. En presencia de **KNO<sub>3</sub>** la cepa *A. baldaniorum*  $\Delta$ *luxO* floclula de manera más rápida que la silvestre (**Fig.34**), fenotipo que se revierte cuando se complementa génicamente dicha cepa, mientras que en **NH<sub>4</sub>Cl** se nota una menor floculación por parte de la cepa *A. baldaniorum*  $\Delta$ *luxO* comparada con la silvestre (**Fig.36**) que también se revierte cuando se complementa la cepa con el plasmido **pBluxO** a las 24 horas de crecimiento, mientras que a las 48 horas desaparecen mostrando la recuperación del fenotipo en ambas fuentes de nitrógeno. Estos fenómenos los podemos relacionar con el metabolismo del nitrógeno, ya que la fuente de carbono en ambos ensayos se mantiene constante así como el contenido del medio, un punto importante es que este fenotipo es transitorio, una posible respuesta es que al tener parálogos en el genoma bacteriano se cuenta con proteínas de rescate que podrían comenzar su transcripción posterior <sup>(86)(87)</sup>.

Gracias a la información obtenida en el estudio podemos concluir que LuxO-L en *A. baldaniorum* Sp245 está relacionado con el control del metabolismo de nitrógeno en ciertos fenotipos relacionados a su capacidad como PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), los cuales entre otros incluyen el crecimiento bacteriano, tiempo de generación, formación de biopelícula, resistencia al sodio y floculación bacteriana, sin embargo aún no se sabe que tan compleja es esta regulación, principalmente debido a la señalización específica celular y al exceso de genes que se transcriben para histidinas cinasas presentes en el genoma bacteriano de *A. baldaniorum* Sp245 <sup>(90)(53)</sup>. Se plantea que LuxO-L tiene función de regulador transcripcional que pudiera afectar los procesos de colonización bacteriana, pues

el fenotipo de floculación se ha ligado a una mayor tasa de colonización en raíces de plantas <sup>(91)</sup>. La fuente de nitrógeno ya sea  $\text{KNO}_3$  o  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en el caso de este estudio, parece ser la causa del estrés generado en la bacteria, la generación y regulación del tipo, cantidad y clase de exopolisacaridos es una señal de protección al estrés ambiental <sup>(75)(76)</sup> tal como es el caso de *Rhizobium tropici* en donde se observó que la producción de exopolisacaridos se ve favorecida en condiciones de limitación del nitrógeno en el medio con un exceso de carbono presente <sup>(94)</sup>, esto puede desencadenar una respuesta como la que observamos llevando a cabo un proceso de regulación en la generación de exopolisacaridos <sup>(95)</sup> que se han visto relacionados a una floculación temprana <sup>(76)(85)(96)</sup>, posteriormente se puede generar un rescate genético por parte de los homólogos presentes en el genoma, pues se han encontrado más de 4 genes parecidos a *luxO* en su genoma (este estudio), las secuencias homólogas de rescate presentes pueden ser una explicación del efecto temporal, por lo que se plantea que la importancia de esta proteína esta principalmente ligada a las etapas tempranas de colonización bacteriana a las raíces de la planta. En cuanto al análisis bioinformático y estructural de la proteína se sugiere que esta proteína es funcional, sin embargo hacen falta más estudios que determinen la regulación post-traducciona en condiciones basales o en condiciones de estrés, así como la respuesta a los diferentes compuestos nitrogenados segregados por las plantas <sup>(97)</sup>, esto podría ahondar en la función de LuxO-L como regulador transcripcional implicado en el metabolismo del nitrógeno, por tanto se plantea que LuxO-L es una proteína única e interesante de estudiar a profundidad, pues parece pertenecer a una nueva sub-familia de proteínas presentes en el género *Azospirillum* que son capaces de controlar respuestas a condiciones de estrés por nitrógeno cuyo impacto puede ser benéfico para el desarrollo de tecnologías agronómicas nuevas.

## 12. CONCLUSIONES

- El gen *luxO* es un gen ortólogo presente en varias cepas de diversos géneros de eubacterias, obtenidos de genomas completos del GenBank; contiene en los genomas de *Azospirillum* otra copia como un gen parólogo, obtenido por duplicación de *luxO* o por transferencia horizontal.
- El gen *luxO* codifica para la proteína LuxO-L cuya estructura tridimensional contiene los dominios requeridos para funcionar como un regulador de respuesta, tipo regulador transcripcional de tipo BEBPs. La proteína LuxO-L pertenece a una familia proteica diferente de NtrC y LuxO.
- El gen *luxO* no tiene efecto en la formación de biopelícula y sensibilidad al NaCl en las condiciones examinadas en este trabajo.
- El gen *luxO* está relacionado con el metabolismo del KNO<sub>3</sub> y NH<sub>4</sub>Cl en una respuesta temprana de floculación bacteriana en las condiciones examinadas.

### 13. PERSPECTIVAS

- Estudios de expresión génica por RT-qPCR del gen *luxO* en diferentes condiciones (Medio rico para *A. baldaniorum* Sp245) y condiciones de cambio en la fuente de nitrógeno presente en el medio (KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl y NFB\*).
- Realización de ensayos de movilidad bacteriana usando diferentes fuentes de nitrógeno (KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl y NFB\*) en *A. baldaniorum* Sp245 (Wild-type), *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$ , *A. baldaniorum* Sp245 (p*BluxO*), *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  (p*BluxO*), *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  (pBBR1MCS-5), *A. baldaniorum* Sp245(pBBR1MCS-5).
- Realización de ensayos de formación de biopelícula a 1, 3 y 5 días con distintas fuentes de nitrógeno (KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl y NFB\*) para las cepas *A. baldaniorum* Sp245 (Wild-type), *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$ , *A. baldaniorum* Sp245 (p*BluxO*), *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  (p*BluxO*), *A. baldaniorum*  $\Delta luxO$  (pBBR1MCS-5), *A. baldaniorum* Sp245(pBBR1MCS-5).
- Generación de cepas con mutaciones dobles  $\Delta luxO-\Delta hkhC$ ,  $\Delta luxO-\Delta hkhB$  y su complementación génica para análisis fenotípico.
- Cristalización de la proteína LuxO-L por método de la gota colgante para posterior análisis cristalográfico.

## 14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wisniewski-Dyé F, Borziak K, Khalsa-Moyers G, Alexandre G, Sukharnikov LO, Wuichet K, et al. Azospirillum Genomes Reveal Transition of Bacteria from Aquatic to Terrestrial Environments. PLoS Genet [Internet]. el 22 de diciembre de 2011 [citado el 14 de enero de 2025];7(12):e1002430. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3245306/>
2. Bartolini S, Pappalettere L, Toffanin A. Azospirillum baldaniorum Sp245 Induces Anatomical Changes in Cuttings of Olive (*Olea europaea* L., cultivar Leccino): Preliminary Results. Agronomy [Internet]. febrero de 2023 [citado el 19 de septiembre de 2024];13(2):301. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4395/13/2/301>
3. Cruz-Hernández MA, Mendoza-Herrera A, Bocanegra-García V, Rivera G. Azospirillum spp. from Plant Growth-Promoting Bacteria to Their Use in Bioremediation. Microorganisms [Internet]. mayo de 2022 [citado el 19 de septiembre de 2024];10(5):1057. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/5/1057>
4. Cassán F, Coniglio A, López G, Molina R, Nieves S, de Carlan CLN, et al. Everything you must know about Azospirillum and its impact on agriculture and beyond. Biol Fertl Soils [Internet]. el 1 de mayo de 2020 [citado el 19 de septiembre de 2024];56(4):461–79. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>
5. Steenhoudt O, Vanderleyden J. Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiol Rev. octubre de 2000;24(4):487–506.
6. Borland S, Prigent-Combaret C, Wisniewski-Dyé F. Bacterial hybrid histidine kinases in plant–bacteria interactions | Microbiology Society. [citado el 18 de septiembre de 2024]; Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.000370>
7. Wang S. Bacterial Two-Component Systems: Structures and Signaling Mechanisms. En: Protein Phosphorylation in Human Health [Internet]. IntechOpen; 2012 [citado el 19 de septiembre de 2024]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/38806>
8. Fukami J, Cerezini P, Hungria M. Azospirillum: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. AMB Express [Internet]. el 4 de mayo de 2018 [citado el 21 de enero de 2025];8(1):73. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>
9. Barba-Ostria CA. Los sistemas de dos componentes: circuitos moleculares versátiles. TIP Rev Espec En Cienc Quím-Biológicas [Internet]. junio de 2014 [citado el 18 de septiembre de 2024];17(1). Disponible en: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-888X2014000100005&lng=es](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2014000100005&lng=es)

10. Ganusova EE, Vo LT, Abraham PE, O'Neal Yoder L, Hettich RL, Alexandre G. The Azospirillum brasilense Core Chemotaxis Proteins CheA1 and CheA4 Link Chemotaxis Signaling with Nitrogen Metabolism. *mSystems* [Internet]. el 16 de febrero de 2021 [citado el 18 de septiembre de 2024];6(1):10.1128/msystems.01354-20. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/msystems.01354-20>
11. Bobik C, Meilhoc E, Batut J. FixJ: a Major Regulator of the Oxygen Limitation Response and Late Symbiotic Functions of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* [Internet]. julio de 2006 [citado el 18 de septiembre de 2024];188(13):4890–902. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JB.00251-06>
12. Sultan M, Arya R, Kim KK. Roles of Two-Component Systems in *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Int J Mol Sci* [Internet]. enero de 2021 [citado el 18 de septiembre de 2024];22(22):12152. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/22/12152>
13. Vincent F, Round A, Reynaud A, Bordi C, Filloux A, Bourne Y. Distinct oligomeric forms of the *Pseudomonas aeruginosa* RetS sensor domain modulate accessibility to the ligand binding site. *Environ Microbiol* [Internet]. 2010 [citado el 18 de septiembre de 2024];12(6):1775–86. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1462-2920.2010.02264.x>
14. Sobrero PM, Muzlera A, Frescura J, Jofré E, Valverde C. A matter of hierarchy: activation of orfamide production by the post-transcriptional Gac-Rsm cascade of *Pseudomonas protegens* CHA0 through expression upregulation of the two dedicated transcriptional regulators. *Environ Microbiol Rep* [Internet]. 2017 [citado el 9 de enero de 2025];9(5):599–611. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1758-2229.12566>
15. Goodman AL, Kulasekara B, Rietsch A, Boyd D, Smith RS, Lory S. A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev Cell*. noviembre de 2004;7(5):745–54.
16. Pazy Y, Wollish AC, Thomas SA, Miller PJ, Collins EJ, Bourret RB, et al. Matching Biochemical Reaction Kinetics to the Timescales of Life: Structural Determinants That Influence the Autodephosphorylation Rate of Response Regulator Proteins. *J Mol Biol* [Internet]. el 9 de octubre de 2009 [citado el 19 de septiembre de 2024];392(5):1205–20. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283609009322>
17. Brüderlin M, Böhm R, Fadel F, Hiller S, Schirmer T, Dubey BN. Structural features discriminating hybrid histidine kinase Rec domains from response regulator homologs. *Nat Commun* [Internet]. el 2 de marzo de 2023 [citado el 20 de octubre de 2024];14(1):1002. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41467-023-36597-8>
18. Hentchel KL, Thao S, Intile PJ, Escalante-Semerena JC. Deciphering the Regulatory Circuitry That Controls Reversible Lysine Acetylation in *Salmonella enterica*. *mBio* [Internet]. el 21 de julio de 2015 [citado el 19 de septiembre de 2024];6(4):10.1128/mbio.00891-15. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mbio.00891-15>

19. Lacitignola D, Saccomandi G, Sgura I. Parametric Resonance in a Mesoscopic Discrete DNA Model. *Acta Appl Math* [Internet]. el 1 de agosto de 2014 [citado el 19 de septiembre de 2024];132(1):391–404. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10440-014-9925-9>
20. Lawson MR, Ma W, Bellecourt MJ, Artsimovitch I, Martin A, Landick R, et al. Mechanism for the regulated control of bacterial transcription termination by a universal adapter protein. *Mol Cell* [Internet]. el 20 de septiembre de 2018 [citado el 10 de marzo de 2025];71(6):911-922.e4. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6151137/>
21. Lee DJ, Minchin SD, Busby SJW. Activating transcription in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2012;66:125–52.
22. Bush M, Dixon R. The Role of Bacterial Enhancer Binding Proteins as Specialized Activators of  $\sigma^{54}$ -Dependent Transcription | Microbiology and Molecular Biology Reviews. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. septiembre de 2012 [citado el 19 de septiembre de 2024];76(3):497–529. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mubr.00006-12>
23. Miller MB, Skorupski K, Lenz DH, Taylor RK, Bassler BL. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell.* el 9 de agosto de 2002;110(3):303–14.
24. Weil AA, Becker RL, Harris JB. *Vibrio cholerae* at the Intersection of Immunity and the Microbiome. *mSphere* [Internet]. el 27 de noviembre de 2019 [citado el 10 de marzo de 2025];4(6):e00597-19. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6881719/>
25. Walker LM, Haycocks JR, Van Kessel JC, Dalia TN, Dalia AB, Grainger DC. A simple mechanism for integration of quorum sensing and cAMP signalling in *Vibrio cholerae*. Casadevall A, editor. *eLife* [Internet]. el 6 de julio de 2023 [citado el 19 de septiembre de 2024];12:RP86699. Disponible en: <https://doi.org/10.7554/eLife.86699>
26. Boyaci H, Shah T, Hurley A, Kokona B, Li Z, Ventocilla C, et al. Structure, Regulation, and Inhibition of the Quorum-Sensing Signal Integrator LuxO | PLOS Biology. *PLOS Biol* [Internet]. mayo de 2016 [citado el 19 de septiembre de 2024];24(14):5. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1002464>
27. Yi L, Dong X, Grenier D, Wang K, Wang Y. Research progress of bacterial quorum sensing receptors: Classification, structure, function and characteristics. *Sci Total Environ* [Internet]. el 1 de abril de 2021 [citado el 19 de septiembre de 2024];763:143031. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004896972036561X>
28. Zimmer DP, Soupene E, Lee HL, Wendisch VF, Khodursky AB, Peter BJ, et al. Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: Scavenging as a defense against nitrogen limitation. *Proc Natl Acad Sci U A* [Internet]. diciembre de 2000

- [citado el 1 de octubre de 2024];19(97):26. Disponible en: <https://www.pnas.org/doi/epdf/10.1073/pnas.97.26.14674>
29. NtrC - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [citado el 1 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/ntrc>
  30. North H, McLaughlin M, Fiebig A, Crosson S. The *Caulobacter* NtrB-NtrC two-component system bridges nitrogen assimilation and cell development. Galperin MY, editor. J Bacteriol [Internet]. el 26 de octubre de 2023 [citado el 1 de octubre de 2024];205(10):e00181-23. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.00181-23>
  31. Kukulj C, Pedrosa FO, de Souza GA, Sumner LW, Lei Z, Sumner B, et al. Proteomic and Metabolomic Analysis of *Azospirillum brasilense* ntrC Mutant under High and Low Nitrogen Conditions. J Proteome Res. el 3 de enero de 2020;19(1):92–105.
  32. Valverde A, Okon Y, Burdman S. cDNA-AFLP reveals differentially expressed genes related to cell aggregation of *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol Lett. diciembre de 2006;265(2):186–94.
  33. Maya Malerva TF. Estudio de movilidad y quimiotaxis de la cinasa histidínica HkhB de *A. brasilense* Sp245 en vida libre y asociación al trigo [Internet]. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2019 [citado el 3 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12371/4855>
  34. Navarro Martínez C. Estudio del gen hkhC en *Azospirillum baldaniorum* Sp245 [Internet] [Tesis de Maestría]. [Puebla,Pue.]: Benemerita Universidad Autonoma de Puebla; 2022. Disponible en: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/items/ac16397f-1876-49c8-a310-3a0311de52e3>
  35. Gamboa Perez A. PARTICIPACIÓN DE PROTEÍNAS CON DOMINIOS GGDEF EN CRECIMIENTO DE *Azospirillum brasilense* [Tesis de Maestría]. [Puebla,Pue.]: Benemerita Universidad Autonoma de Puebla; 2014.
  36. Jurkevitch E, Schwartsburd B, Hampel M, Okon Y. Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. Microbiol Soc [Internet]. julio de 1998 [citado el 19 de septiembre de 2024];(144):7. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-144-7-1989>
  37. Zimmer DP, Soupene E, Lee HL, Wendisch VF, Khodursky AB, Peter BJ, et al. Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: Scavenging as a defense against nitrogen limitation. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. el 19 de diciembre de 2000 [citado el 9 de enero de 2025];97(26):14674–9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC18977/>

38. Abramson J, Adler J, Dunger J, Evans R, Green T, Pritzel A, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature* [Internet]. junio de 2024 [citado el 3 de enero de 2025];630(8016):493–500. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41586-024-07487-w>
39. Bourret RB. Receiver domain structure and function in response regulator proteins. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. abril de 2010 [citado el 7 de enero de 2025];13(2):142–9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2847656/>
40. Skerker JM, Perchuk BS, Siryaporn A, Lubin EA, Ashenberg O, Goulian M, et al. Rewiring the Specificity of Two-Component Signal Transduction Systems. *Cell* [Internet]. junio de 2008 [citado el 20 de octubre de 2024];133(6):1043–54. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867408006144>
41. Zhang X, Chaney M, Wigneshweraraj SR, Schumacher J, Bordes P, Cannon W, et al. Mechanochemical ATPases and transcriptional activation. *Mol Microbiol* [Internet]. 2002 [citado el 7 de enero de 2025];45(4):895–903. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2958.2002.03065.x>
42. Iyer LM, Leipe DD, Koonin EV, Aravind L. Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J Struct Biol*. 2004;146(1–2):11–31.
43. De Carlo S, Chen B, Hoover TR, Kondrashkina E, Nogales E, Nixon BT. The structural basis for regulated assembly and function of the transcriptional activator NtrC. *Genes Dev* [Internet]. el 1 de junio de 2006 [citado el 7 de enero de 2025];20(11):1485–95. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1475761/>
44. Rappas M, Schumacher J, Beuron F, Niwa H, Bordes P, Wigneshweraraj S, et al. Structural Insights Into the Activity of Transcriptional Enhancer-Binding Proteins. *Science* [Internet]. el 25 de marzo de 2005 [citado el 7 de enero de 2025];307(5717):1972–5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2756573/>
45. Bordes P, Wigneshweraraj SR, Schumacher J, Zhang X, Chaney M, Buck M. The ATP hydrolyzing transcription activator phage shock protein F of *Escherichia coli*: Identifying a surface that binds  $\sigma^{54}$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. el 4 de marzo de 2003 [citado el 7 de enero de 2025];100(5):2278–83. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC151331/>
46. Aravind L, Anantharaman V, Balaji S, Babu MM, Iyer LM. The many faces of the helix-turn-helix domain: Transcription regulation and beyond\*. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. el 1 de abril de 2005 [citado el 9 de enero de 2025];29(2):231–62. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fmrre.2004.12.008>
47. Walker LM, Haycocks JR, Van Kessel JC, Dalia TN, Dalia AB, Grainger DC. A simple mechanism for integration of quorum sensing and cAMP signalling in *Vibrio cholerae*. *eLife* [Internet]. el 6 de julio de 2023 [citado el 20 de octubre de 2024];12:RP86699. Disponible en: <https://elifesciences.org/articles/86699>

48. Castañón Vargas VL. Rol del gen *cheY-L* de *Azospirillum baldaniorum* en movilidad y formación de biopelícula [Internet]. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2023 [citado el 15 de enero de 2025]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12371/20320>
49. Kustu S, Santero E, Keener J, Popham D, Weiss D. Expression of sigma 54 (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism | Microbiological Reviews. *Microbiol Rev* [Internet]. septiembre de 1989 [citado el 3 de noviembre de 2024];53(3):367–76. Disponible en: [https://journals.asm.org/doi/10.1128/mr.53.3.367-376.1989?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://journals.asm.org/doi/10.1128/mr.53.3.367-376.1989?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed)
50. Yi L, Dong X, Grenier D, Wang K, Wang Y. Research progress of bacterial quorum sensing receptors: Classification, structure, function and characteristics. *Sci Total Environ* [Internet]. el 1 de abril de 2021 [citado el 4 de noviembre de 2024];763:143031. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004896972036561X>
51. Vidangos NK. Structural and biochemical studies of sigma54 transcriptional activation in *Aquifex aeolicus* [Internet]. UC Berkeley; 2010 [citado el 4 de noviembre de 2024]. Disponible en: <https://escholarship.org/uc/item/62h3j5cj>
52. The *Caulobacter* NtrB-NtrC two-component system bridges nitrogen assimilation and cell development | *Journal of Bacteriology* [Internet]. [citado el 4 de noviembre de 2024]. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.00181-23>
53. Orlandini V, Emiliani G, Fondi M, Perrin E, Fani R, Maida I. Network Analysis of Plasmidomes: The *Azospirillum brasilense* Sp245 Case. *Int J Evol Biol* [Internet]. 2014 [citado el 21 de enero de 2025]; Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25610702/>
54. Guo HB, Perminov A, Bekele S, Kedziora G, Farajollahi S, Varaljay V, et al. AlphaFold2 models indicate that protein sequence determines both structure and dynamics. *Sci Rep* [Internet]. el 23 de junio de 2022 [citado el 14 de enero de 2025];12(1):10696. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-14382-9>
55. Urbanczyk H, Ast JC, Dunlap PV. Phylogeny, genomics, and symbiosis of *Photobacterium*. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. el 1 de marzo de 2011 [citado el 3 de enero de 2025];35(2):324–42. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00250.x>
56. Sugawara H, Kawano Y, Hatakeyama T, Yamaya T, Kamiya N, Sakakibara H. Crystal structure of the histidine-containing phosphotransfer protein ZmHP2 from maize. *Protein Sci Publ Protein Soc* [Internet]. enero de 2005 [citado el 4 de noviembre de 2024];14(1):202. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2253335/>
57. Snider J, Thibault G, Houry WA. The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins. *Genome Biol* [Internet]. el 30 de abril de 2008 [citado el 14 de enero de 2025];9(4):216. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2643927/>

58. Vidangos N, Maris AE, Young A, Hong E, Pelton JG, Batchelor JD, et al. Structure, function, and tethering of DNA-binding domains in  $\sigma^{54}$  transcriptional activators. *Biopolymers*. diciembre de 2013;99(12):1082–96.
59. Terwilliger TC, Liebschner D, Croll TI, Williams CJ, McCoy AJ, Poon BK, et al. AlphaFold predictions are valuable hypotheses and accelerate but do not replace experimental structure determination. *Nat Methods* [Internet]. enero de 2024 [citado el 14 de enero de 2025];21(1):110–6. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41592-023-02087-4>
60. Surin S, Singh R, Kaur M, Choudhury GB, Sen H, Dureja C, et al. Identification of critical amino acids in the DNA binding domain of LuxO: Lessons from a constitutive active LuxO. *PLOS ONE* [Internet]. el 17 de septiembre de 2024 [citado el 15 de enero de 2025];19(9):e0310444. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11407668/>
61. Fukami J, Abrantes JLF, del Cerro P, Nogueira MA, Ollero FJ, Megías M, et al. Revealing strategies of quorum sensing in *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6. *Arch Microbiol* [Internet]. el 1 de enero de 2018 [citado el 4 de noviembre de 2024];200(1):47–56. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1422-x>
62. Vial L, Cuny C, Gluchoff-Fiasson K, Comte G, Oger PM, Faure D, et al. N-acyl-homoserine lactone-mediated quorum-sensing in *Azospirillum*: an exception rather than a rule. *FEMS Microbiol Ecol* [Internet]. el 1 de noviembre de 2006 [citado el 4 de noviembre de 2024];58(2):155–68. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00153.x>
63. Hartmann A, Klink S, Rothballer M. Importance of N-Acyl-Homoserine Lactone-Based Quorum Sensing and Quorum Quenching in Pathogen Control and Plant Growth Promotion. *Pathogens* [Internet]. el 30 de noviembre de 2021 [citado el 15 de enero de 2025];10(12):1561. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8706166/>
64. Fibach-Paldi S, Burdman S, Okon Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. el 1 de enero de 2012 [citado el 21 de enero de 2025];326(2):99–108. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02407.x>
65. Pedraza RO, Filippone MP, Fontana C, Salazar SM, Ramírez-Mata A, Sierra-Cacho D, et al. Chapter 6 - *Azospirillum*. En: Amaresan N, Senthil Kumar M, Annapurna K, Kumar K, Sankaranarayanan A, editores. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* [Internet]. Academic Press; 2020 [citado el 21 de enero de 2025]. p. 73–105. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012823414300006X>
66. Fincham JRS. Genetic complementation. *Sci Prog* 1933- [Internet]. 1968 [citado el 22 de enero de 2025];56(222):165–77. Disponible en: <https://www.jstor.org/stable/43425715>

67. Obranić S, Babić F, Maravić-Vlahoviček G. Improvement of pBBR1MCS plasmids, a very useful series of broad-host-range cloning vectors. *Plasmid* [Internet]. el 1 de septiembre de 2013 [citado el 22 de enero de 2025];70(2):263–7. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147619X1300036X>
68. Jijón-Moreno S, Baca BE, Castro-Fernández DC, Ramírez-Mata A. TyrR is involved in the transcriptional regulation of biofilm formation and D-alanine catabolism in *Azospirillum brasilense* Sp7. | *PLOS ONE*. *PLOS ONE* [Internet]. febrero de 2019 [citado el 22 de enero de 2025];14(14):2. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0211904>
69. Viruega-Góngora VI, Acatitla-Jácome IS, Zamorano-Sánchez D, Reyes-Carmona SR, Xiqui-Vázquez ML, Baca BE, et al. The GGDEF-EAL protein CdgB from *Azospirillum baldaniorum* Sp245, is a dual function enzyme with potential polar localization. *PLOS ONE* [Internet]. el 23 de noviembre de 2022 [citado el 22 de enero de 2025];17(11):e0278036. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9683572/>
70. Cruz-Pérez JF, Lara-Oueilhe R, Marcos-Jiménez C, Cuatlayotl-Olarte R, Xiqui-Vázquez ML, Reyes-Carmona SR, et al. Expression and function of the *cdgD* gene, encoding a CHASE–PAS–DGC–EAL domain protein, in *Azospirillum brasilense*. *Sci Rep* [Internet]. el 12 de enero de 2021 [citado el 22 de enero de 2025];11:520. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7804937/>
71. Davis KER, Joseph SJ, Janssen PH. Effects of Growth Medium, Inoculum Size, and Incubation Time on Culturability and Isolation of Soil Bacteria. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. febrero de 2005 [citado el 22 de enero de 2025];71(2):826–34. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC546801/>
72. Carbon Limitation | SpringerLink [Internet]. [citado el 22 de enero de 2025]. Disponible en: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-59491-5\\_2](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-59491-5_2)
73. Bible AN, Khalsa-Moyers GK, Mukherjee T, Green CS, Mishra P, Purcell A, et al. Metabolic Adaptations of *Azospirillum brasilense* to Oxygen Stress by Cell-to-Cell Clumping and Flocculation. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. diciembre de 2015 [citado el 22 de enero de 2025];81(24):8346–57. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4644645/>
74. Ramírez-Mata A, Fernández-Domínguez IJ, Nuñez-Reza KJ, Xiqui-Vázquez ML, Baca BE. Redes de señalización en la producción de biopelículas en bacterias: *quorum sensing*, di-GMPc y óxido nítrico. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. el 1 de julio de 2014 [citado el 4 de noviembre de 2024];46(3):242–55. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754114700793>
75. Kohram M, Sanderson AE, Loui A, Thompson PV, Vashistha H, Shomar A, et al. Nonlethal deleterious mutation–induced stress accelerates bacterial aging. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. el 14 de mayo de 2024 [citado el 4 de noviembre de 2024];121(10):e20240123. Disponible en: <https://doi.org/10.1073/pnas.2024012121>

- 2024];121(20):e2316271121. Disponible en:  
<https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.2316271121>
76. Sadasivan L, Neyra CA. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation. *J Bacteriol.* agosto de 1985;163(2):716–23.
77. Joe MM, Karthikeyan B, Chauhan PS, Shagol C, Islam MdR, Deiveekasundaram M, et al. Survival of *Azospirillum brasilense* flocculated cells in alginate and its inoculation effect on growth and yield of maize under water deficit conditions. *Eur J Soil Biol* [Internet]. el 1 de mayo de 2012 [citado el 21 de enero de 2025];50:198–206. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1164556312000271>
78. Bianciotto V, Andreotti S, Balestrini R, Bonfante P, Perotto S. Extracellular polysaccharides are involved in the attachment of *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* to arbuscular mycorrhizal structures. *Eur J Histochem* [Internet]. 2001 [citado el 22 de enero de 2025];45(1):39–50. Disponible en: <https://www.ejh.it/index.php/ejh/article/view/1612>
79. Viruega-Góngora VI, Acatitla-Jácome IS, Reyes-Carmona SR, Baca BE, Ramírez-Mata A. Spatio-temporal formation of biofilms and extracellular matrix analysis in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett.* el 1 de febrero de 2020;367(4):fnaa037.
80. Huang CT, Peretti SW, Bryers JD. Effects of medium carbon-to-nitrogen ratio on biofilm formation and plasmid stability. *Biotechnol Bioeng.* julio de 1994;44(3):329–36.
81. Ramos P, Honda R, Hoek EMV, Mahendra S. Carbon/nitrogen ratios determine biofilm formation and characteristics in model microbial cultures. *Chemosphere* [Internet]. el 1 de febrero de 2023 [citado el 22 de enero de 2025];313:137628. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653522041212>
82. Waters CM, Lu W, Rabinowitz JD, Bassler BL. Quorum Sensing Controls Biofilm Formation in *Vibrio cholerae* through Modulation of Cyclic Di-GMP Levels and Repression of *vpsT*. *J Bacteriol* [Internet]. abril de 2008 [citado el 10 de febrero de 2025];190(7):2527–36. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2293178/>
83. Liu Y, Lardi M, Pedrioli A, Eberl L, Pessi G. NtrC-dependent control of exopolysaccharide synthesis and motility in *Burkholderia cenocepacia* H111. *PLOS ONE* [Internet]. el 29 de junio de 2017 [citado el 10 de febrero de 2025];12(6):e0180362. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0180362>
84. Cheng AT, Zamorano-Sánchez D, Teschler JK, Wu D, Yildiz FH. NtrC Adds a New Node to the Complex Regulatory Network of Biofilm Formation and *vps* Expression in *Vibrio cholerae* | *Journal of Bacteriology*. *J Bacteriol* [Internet]. julio de 2018 [citado el 11 de febrero de 2025];10(200):15. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/jb.00025-18>

85. Bible AN, Khalsa-Moyers GK, Mukherjee T, Green CS, Mishra P, Purcell A, et al. Metabolic adaptations of *Azospirillum brasilense* to oxygen stress by cell-to-cell clumping and flocculation. *Appl Environ Microbiol.* diciembre de 2015;81(24):8346–57.
86. Goldberg I, Nadler V, Hochman A. Mechanism of nitrogenase switch-off by oxygen. *J Bacteriol* [Internet]. febrero de 1987 [citado el 24 de enero de 2025];169(2):874–9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC211860/>
87. Allen JF, Thake B, Martin WF. Nitrogenase Inhibition Limited Oxygenation of Earth's Proterozoic Atmosphere. *Trends Plant Sci* [Internet]. el 1 de noviembre de 2019 [citado el 24 de enero de 2025];24(11):1022–31. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138519301864>
88. Nixon BT, Ronson CW, Ausubel FM. Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntxB* and *ntxC*. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. octubre de 1986 [citado el 4 de noviembre de 2024];83(20):7850–4. Disponible en: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.83.20.7850>
89. Šali A. Modelling mutations and homologous proteins. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. el 1 de enero de 1995 [citado el 4 de noviembre de 2024];6(4):437–51. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0958166995800743>
90. Borland S, Oudart A, Prigent-Combaret C, Brochier-Armanet C, Wisniewski-Dyé F. Genome-wide survey of two-component signal transduction systems in the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum*. *BMC Genomics* [Internet]. el 22 de octubre de 2015 [citado el 4 de noviembre de 2024];16(1):833. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1962-x>
91. Pereg-Gerk L, Paquelin A, Gounon P, Kennedy IR, Elmerich C. A transcriptional regulator of the LuxR-UhpA family, *FlcA*, controls flocculation and wheat root surface colonization by *Azospirillum brasilense* Sp7. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI.* marzo de 1998;11(3):177–87.
94. Staudt AK, Lawrence G Wolfe, Shroud JD. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici* | Archives of Microbiology. *Arch Microbiol* [Internet]. marzo de 2012 [citado el 22 de enero de 2025];194(3):197–206. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00203-011-0742-5>
95. Castellani LG, Luchetti A, Nilsson JF, Pérez-Giménez J, Wegener C, Schlüter A, et al. Exopolysaccharide Characterization of *Rhizobium favelukesii* LPU83 and Its Role in the Symbiosis With Alfalfa. *Front Plant Sci* [Internet]. el 10 de febrero de 2021 [citado el 22 de enero de 2025];12. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2021.642576/full>
96. Skvortsov IM, Ignatov VV. Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species: properties and the possible role in interaction with plant roots. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. agosto de 1998 [citado el 11

de febrero de 2025];15(165):2. Disponible en: <https://academic.oup.com/femsle/article-abstract/165/2/223/777227>

97. Chen L, Liu Y. The Function of Root Exudates in the Root Colonization by Beneficial Soil Rhizobacteria. *Biology* [Internet]. el 2 de febrero de 2024 [citado el 24 de enero de 2025];13(2):95. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10886372/>

# 15. ANEXOS

## Anexo 1. Tabla de alineamientos usando BLAST de eubacterias.

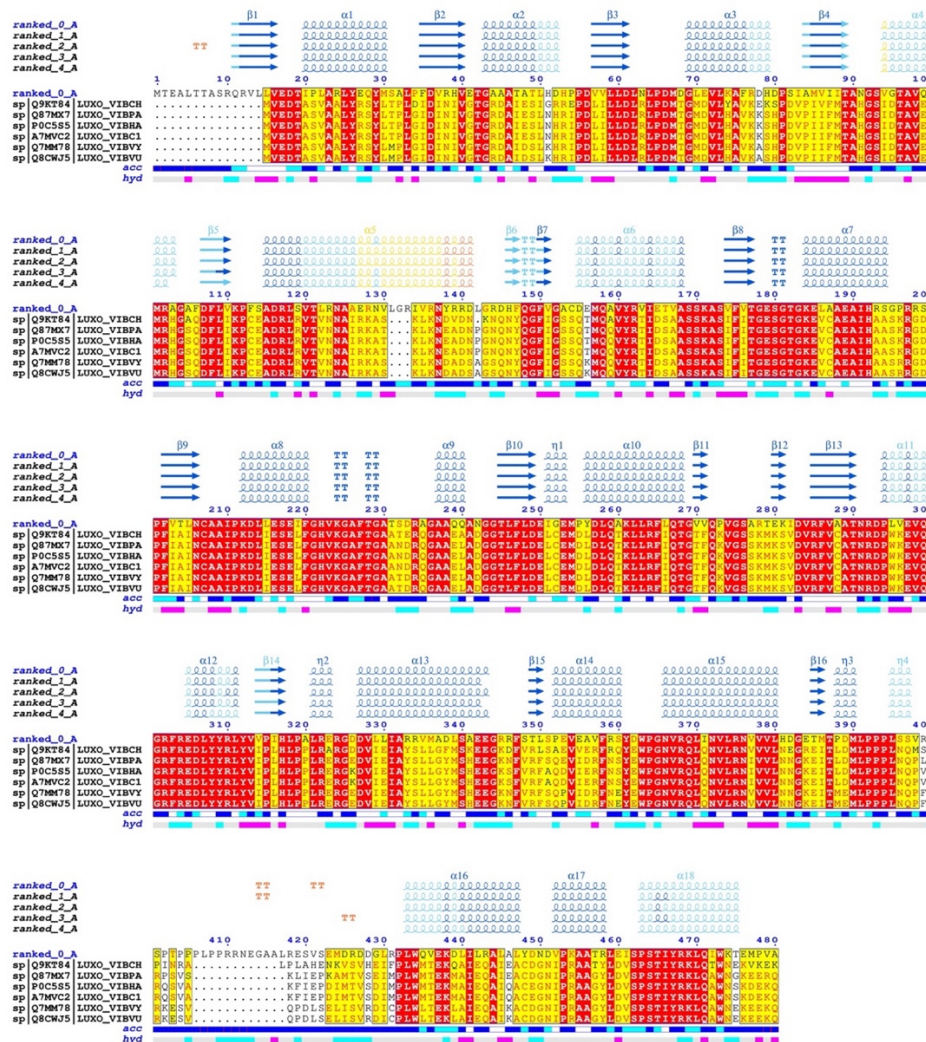
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	Evalue	Per. ident	Acc. Len	Accession
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum baldaniorum)	Azospirillum baldaniorum	675	875	99%	0	100	480	WP_014198786.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum baldaniorum)	Azospirillum baldaniorum	671	871	99%	0	99.58	480	WP_145708265.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum argentinense)	Azospirillum argentinense	777	777	99%	0	86.04	480	WP_137116691.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Xanthobacter sp. KR7-65)	Xanthobacter sp. KR7-65	621	621	98%	0	69.17	480	WP_348841745.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum rubosum)	Azospirillum rubosum	575	575	98%	0	65.88	472	WP_370881330.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum rubosum)	Azospirillum rubosum	575	575	98%	0	65.88	473	WP_307420722.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Rhodospirillaceae bacterium)	Rhodospirillaceae bacterium	562	562	98%	0	63.73	480	ME16558948.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum canadense)	Azospirillum canadense	561	561	98%	0	65.67	474	WP_264658700.1
two-component system repressor protein LuxO (Azospirillum canadense)	Azospirillum canadense	561	561	98%	0	65.67	473	MCW2240150.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Rhodospirillaceae bacterium)	Rhodospirillaceae bacterium	557	557	98%	0	64.15	480	ME17610997.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum sp.)	Azospirillum sp.	557	557	97%	0	62.13	468	WP_298376210.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Rhodospirillaceae bacterium)	Rhodospirillaceae bacterium	556	556	98%	0	62.58	486	ME8383620.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum sp. B510)	Azospirillum sp. B510	553	553	97%	0	61.76	474	WP_012978516.1
Regulatory protein LuxO (Azospirillaceae bacterium)	Azospirillaceae bacterium	553	553	98%	0	62.97	513	CAK0769082.1
TPA: sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillaceae bacterium)	Azospirillaceae bacterium	553	553	97%	0	62.98	471	HYE2085.1
sigma-54 dependent Fis family transcriptional regulator (Azospirillum dobereineriae)	Azospirillum dobereineriae	551	551	97%	0	62.82	472	RLQ69804.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum dobereineriae)	Azospirillum dobereineriae	551	551	97%	0	62.82	474	WP_244988370.1
sigma-54 interacting transcriptional regulator (Rhodocista pelegensis)	Rhodocista pelegensis	550	550	96%	0	60.21	404	WP_37758815.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum gtraum)	Azospirillum gtraum	550	550	97%	0	62.47	470	WP_126617477.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum dobereineriae)	Azospirillum dobereineriae	550	550	97%	0	62.82	474	WP_238520634.1
TPA: sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillaceae bacterium)	Azospirillaceae bacterium	547	547	98%	0	61.47	476	HYC01078.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum cavernae)	Azospirillum cavernae	546	546	97%	0	61.06	469	WP_119832776.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum agricola)	Azospirillum agricola	546	546	98%	0	61.81	474	WP_209778620.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum sp. TSH62)	Azospirillum sp. TSH62	546	546	97%	0	61.49	473	WP_10049885.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum sp. B506)	Azospirillum sp. B506	545	545	97%	0	61.01	472	WP_19900291.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum agricola)	Azospirillum agricola	544	544	98%	0	62.37	474	WP_08552685.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum humicireducens)	Azospirillum humicireducens	544	544	98%	0	60.5	473	WP_06383874.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum sp. TSH64)	Azospirillum sp. TSH64	542	542	98%	0	60.97	477	WP_100452822.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum endophyticum)	Azospirillum endophyticum	542	542	97%	0	60.43	473	WP_20019820.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum oryzae)	Azospirillum oryzae	540	540	97%	0	61.15	476	WP_08509815.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum thiophilum)	Azospirillum thiophilum	540	540	97%	0	61.78	481	WP_045584943.1
two-component system, repressor protein LuxO (Azospirillum oryzae)	Azospirillum oryzae	540	540	97%	0	61.15	483	SMF86327.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum sp. A29)	Azospirillum sp. A29	540	540	98%	0	60.42	472	WP_377807838.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Rhodospirillum centenum)	Rhodospirillum centenum	539	539	97%	0	62.34	479	WP_012567330.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum sp. B21)	Azospirillum sp. B21	538	538	97%	0	60.43	477	WP_149222638.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum sp. H139)	Azospirillum sp. H139	538	538	97%	0	61.59	481	WP_37239965.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum palastre)	Azospirillum palastre	538	538	97%	0	61.03	480	WP_098735202.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum lipoferum)	Azospirillum lipoferum	538	538	97%	0	59.79	475	WP_014250057.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum sp. TSO35-2)	Azospirillum sp. TSO35-2	537	537	97%	0	60.51	469	WP_109108996.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum melinis)	Azospirillum melinis	536	536	98%	0	60.13	477	WP_174470715.1
two-component system repressor protein LuxO (Azospirillum melinis)	Azospirillum melinis	536	536	98%	0	60.94	460	MBP230890.1
response regulator (Azospirillum sp.)	Azospirillum sp.	534	534	98%	0	60.59	479	MB125670.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum ramsamyi)	Azospirillum ramsamyi	534	534	97%	0	60.55	474	WP_110706934.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Nitrospillum amazonense)	Nitrospillum amazonense	531	531	98%	0	59.08	481	WP_145611548.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum sp.)	Azospirillum sp.	531	531	97%	0	60	489	WP_324869785.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Nitrospillum sp. BR 11164)	Nitrospillum sp. BR 11164	531	531	98%	0	60.17	479	WP_322916110.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum sp. BE72)	Azospirillum sp. BE72	530	530	97%	0	59.79	484	WP_310116521.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Nitrospillum midwest)	Nitrospillum midwest	530	530	98%	0	59.92	481	WP_068071834.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum sp. TSO43)	Azospirillum sp. TSO43	530	530	97%	0	62.13	478	WP_136702312.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Nitrospillum sp. BR 11828)	Nitrospillum sp. BR 11828	530	530	98%	0	58.67	486	WP_322483037.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Nitrospillum midis)	Nitrospillum midis	530	530	98%	0	60.29	473	WP_184796987.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Nitrospillum amazonense)	Nitrospillum amazonense	530	530	98%	0	59.08	481	WP_145617293.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum sp. A1-3)	Azospirillum sp. A1-3	530	530	97%	0	61.02	478	WP_252141943.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Unclassified Azospirillum)	Unclassified Azospirillum	529	529	97%	0	61.02	478	WP_106074254.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Unclassified Azospirillum)	Unclassified Azospirillum	529	529	97%	0	62	478	WP_29829474.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Nitrospillum amazonense)	Nitrospillum amazonense	528	528	98%	0	58.66	481	WP_326485898.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum)	Azospirillum	528	528	98%	0	62.45	484	WP_149231922.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum sp. A26)	Azospirillum sp. A26	527	527	97%	0	61.49	471	WP_378695739.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Nitrospillum amazonense)	Nitrospillum amazonense	526	526	98%	0	59.38	482	WP_145749835.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum sp. TSO5)	Azospirillum sp. TSO5	526	526	97%	0	60.81	478	WP_109151115.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum sp. B4)	Azospirillum sp. B4	526	526	98%	0	59.42	485	WP_292991918.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum sp. TSH100)	Azospirillum sp. TSH100	525	525	97%	1e-180	62.53	489	WP_100444031.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Nitrospillum amazonense)	Nitrospillum amazonense	524	524	98%	4e-180	58.06	486	WP_145729589.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Nitrospillum sp. BR 11163)	Nitrospillum sp. BR 11163	524	524	98%	4e-180	59.09	486	WP_322956417.1
TPA: sigma-54 dependent transcriptional regulator (Alphaproteobacteria bacterium)	Alphaproteobacteria bacterium	522	522	96%	2e-179	61.67	473	HXQ68374.1
sigma-54 dependent Fis family transcriptional regulator (Azospirillum sp. 412522)	Azospirillum sp. 412522	521	521	97%	4e-179	62	473	MBV6263815.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Nitrospillum sp. BR 11752)	Nitrospillum sp. BR 11752	520	520	98%	9e-179	58.06	486	WP_330498118.1
TPA: sigma-54 dependent transcriptional regulator (Alphaproteobacteria bacterium)	Alphaproteobacteria bacterium	519	519	96%	3e-178	60.17	473	HXK00486.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum sp. Sh1)	Azospirillum sp. Sh1	518	518	97%	4e-178	61.36	478	WP_149271872.1
TPA: sigma-54 dependent transcriptional regulator (Alphaproteobacteria bacterium)	Alphaproteobacteria bacterium	516	516	96%	4e-177	61.16	473	HY857169.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum oryzae)	Azospirillum oryzae	514	514	97%	1e-176	61.15	478	WP_149200549.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum picis)	Azospirillum picis	512	512	97%	2e-175	60.43	489	WP_209999916.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillaceae bacterium)	Azospirillaceae bacterium	511	511	98%	5e-175	60.21	477	MD1147396.1
TPA: sigma-54 dependent transcriptional regulator (Alphaproteobacteria bacterium)	Alphaproteobacteria bacterium	510	510	97%	7e-175	59.45	475	HU16775.1
TPA: sigma-54 dependent transcriptional regulator (Alphaproteobacteria bacterium)	Alphaproteobacteria bacterium	506	506	97%	4e-173	58.05	482	HUC60713.1
TPA: sigma-54 dependent transcriptional regulator (Alphaproteobacteria bacterium)	Alphaproteobacteria bacterium	496	496	98%	3e-169	56.88	483	HEV836157.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum himalayense)	Azospirillum himalayense	496	496	96%	3e-169	57.73	476	WP_376982233.1
sigma-54 dependent Fis family transcriptional regulator (Rhodospirillaceae bacterium)	Rhodospirillaceae bacterium	495	495	98%	6e-169	56.93	476	MBT541508.1
sigma-54 dependent Fis family transcriptional regulator (Alphaproteobacteria bacterium)	Alphaproteobacteria bacterium	494	494	96%	1e-168	56.41	479	MBN952659.1
sigma-54 dependent Fis family transcriptional regulator (Alphaproteobacteria bacterium)	Alphaproteobacteria bacterium	495	495	96%	1e-168	56.62	491	MBL693357.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum brasiliense)	Azospirillum brasiliense	493	493	96%	2e-168	57.33	474	WP_149164573.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum brasiliense)	Azospirillum brasiliense	492	492	96%	6e-168	57.69	478	WP_114860263.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum brasiliense)	Azospirillum brasiliense	492	492	96%	1e-167	57.42	475	WP_145683075.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum sp. TSH58)	Azospirillum sp. TSH58	492	492	96%	1e-167	57.48	478	WP_108072647.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Alphaproteobacteria bacterium)	Alphaproteobacteria bacterium	491	491	96%	1e-167	53.78	467	MB1274096.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum argentinense)	Azospirillum argentinense	491	491	96%	2e-167	57.48	478	WP_349592160.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum brasiliense)	Azospirillum brasiliense	491	491	96%	3e-167	57.51	476	WP_137139688.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum sp. OGB3)	Azospirillum sp. OGB3	491	491	96%	3e-167	57.73	476	WP_183177469.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum argentinense)	Azospirillum argentinense	491	491	96%	3e-167	56.87	476	WP_038525992.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum argentinense)	Azospirillum argentinense	490	490	96%	4e-167	57.51	476	WP_137115291.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum brasiliense)	Azospirillum brasiliense	491	491	96%	4e-166	55.88	480	WP_024391500.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum brasiliense)	Azospirillum brasiliense	490	490	96%	4e-167	57.2	475	WP_200480906.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum baldaniorum)	Azospirillum baldaniorum	490	490	96%	6e-167	57.05	478	WP_145701423.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum sp. TSH100)	Azospirillum sp. TSH100	489	489	96%	7e-167	57.33	473	WP_100442939.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Pseudomonadota bacterium)	Pseudomonadota bacterium	489	489	98%	1e-166	55.18	480	ME1938288.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Alphaproteobacteria bacterium)	Alphaproteobacteria bacterium	489	489	97%	1e-166	54.93	481	MDH322854.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum baldaniorum)	Azospirillum baldaniorum	489	489	96%	1e-166	57.83	478	WP_04230766.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum aestuarii)	Azospirillum aestuarii	489	489	96%	1e-166	57.26	478	WP_145623051.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum baldaniorum)	Azospirillum baldaniorum	489	489	96%	1e-166	57.05	482	WP_109138330.1
sigma-54 dependent transcriptional regulator (Azospirillum formosense)	Azospirillum formosense	489	489	96%	1e-166	57.26	478	WP_174439180.1

## Anexo 2. Tabla de alineamientos homólogos internos en *A. baldaniorum* Sp245.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	Evalue	Per. ident	Acc. Len
WP_014198786.1 sigma-54 dependent transcriptional regulator [Azospirillum baldaniorum]	972	972	100%	0	100	480
WP_109138330.1 sigma-54 dependent transcriptional regulator [Azospirillum baldaniorum]	533	533	96%	0	57.26	482
WP_014197046.1 MULTISPECIES: nitrogen regulation protein NR(I) [Azospirillum]	283	283	95%	6e-91	37.42	481
WP_041812371.1 sigma-54 dependent transcriptional regulator [Azospirillum baldaniorum]	270	270	96%	4e-86	37.06	476
WP_014198540.1 sigma-54 dependent transcriptional regulator [Azospirillum baldaniorum]	261	261	75%	1e-82	41.85	459
WP_014197047.1 MULTISPECIES: sigma-54 dependent transcriptional regulator [Azospirillum]	243	243	95%	8e-76	34.19	466
WP_014199754.1 sigma-54 dependent transcriptional regulator [Azospirillum baldaniorum]	241	241	95%	2e-75	35.57	447
WP_014198328.1 sigma-54 dependent transcriptional regulator [Azospirillum baldaniorum]	231	231	73%	1e-70	41.78	512
WP_014198551.1 sigma-54-dependent Fis family transcriptional regulator [Azospirillum baldaniorum]	224	224	67%	2e-68	43.24	478

## Anexo 3. Alineamiento y selección de predicción más adecuada entre las 5 que genera el programa AlphaFold-3 usando la base de datos del Swiss-model.

Foldscript nos genera una elección adecuada en base a datos previamente registrados de manera 3D en el Swiss-model por lo que se genera una búsqueda de estructuras homologas cristalizadas y se hace la búsqueda de homólogos estructurales y en secuencias, en color rojo con fondo blanco son secuencias con 100% de identidad, en color rojo con fondo amarillo son aminoácidos con >70% de identidad y en color negro son aminoácidos con <50%.



Anexo 4. Alineamiento del dominio AAA+ de NtrX (*Aquifex aeolicus*), NtrC1 (*Aquifex aeolicus*), FleQ (*Pseudomonas aeruginosa*), LuxO (*Vibrio spp.*), LuxO-L (*Azospirillum baldaniorum* Sp245).

A) En color rojo se encuentra encerrado el motivo GAFTGA compartido entre los organismos comparados. B) Matriz de identidad generada de los alineamientos realizados encerrado en color rojo se encuentra la identidad de la proteína LuxO (*Vibrio spp.*) comparándose con LuxO-L de *A. baldaniorum* Sp245 y en Azul la comparación con NtrC1 de *A. aeolicus*.

A)

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

A.aeoX      TNSRIMITGPSGAGKELVARAIHAQSSRANGPFVTVNAATITPERMEIELFGTEM57DG---
A.aeo       AECPLITGESGVGKEVVARLIHKSSDRSKPEFVALNVAIPRDIFEAELFGYEMGAFTG60
P.aeu       TDASVLILGESGTGKEVVARNLHYHSKRREGFPVPVNCGAIPAELLESEELFGHEMGAFTG60
V.Chol      SKATVFITGESGTGKEVCAEAIHAASPRHDKPFIALNCAAIPKDLIESELFGHVMGAFTG60
A.bal       SKASVFTGESGTGKELAAEAIHRSGPRRSGPFVTLNCAAIPKDLLESEIFGHVMGAFTG60
           :. . ::: * **.***:* * . :* . * . **:* :* .:* : :* **:* ..

A.aeoX      -SERKVGALEEAHGGILYLDEVADMPRETQNKILRVLVDQQFERVGGTKRVKVDVRIISS116
A.aeo       A/VSSKEGFFELADGGTLFLDEIGELSLEAQAKLLRVIESGKFYRLGGRKEIEVNVRIIAA120
P.aeu       ALTSRAGRFE LANGGTLFLDEIGDMPMPQVKLLRVLQERTFERVGSNKTONVDVRIIAA120
V.Chol      ASTERQGAVEMAHNGTLMLEDELCEMDLDLQSKLLRFIQGTGYQKVGSSKMSSVDVRFVCA120
A.bal       ATSDRAGAAQQANGGTLFLDEIGEMPYDLQAKLLRFILQGTGVVQPVGSARTEKIDVRFVAA120
           : * : *..* * **:* : : * **:* : : * . : : **:* : : :

A.aeoX      TAQNLEGMIAEGTFREDLFHRLSV-140
A.aeo       TNRNIKELVKEGKFREDLYYRLGV-144
P.aeu       THKNLEKMIEDGTFREDLYYRLNVF145
V.Chol      TNRNPWEVQEGRFREDLYYRLHV-144
A.bal       TNRDPLVEVQAGRREDLYYRLYV-144
           * : : : * **:* : : * *
    
```

B)

Percent Identity Matrix – created by Clustal2.1

1: A.aeoX	100.00	45.71	52.86	42.14	40.71
2: A.aeo	45.71	100.00	56.94	54.86	52.08
3: P.aeu	52.86	56.94	100.00	55.56	58.33
4: V.Chol	42.14	54.86	55.56	100.00	68.75
5: A.bal	40.71	52.08	58.33	68.75	100.00

## Anexo 5. Alineamientos entre dominio HTH de LuxO y LuxO-L.

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: A.ba1Lux0-L	100.00	59.52	57.14
2: P.augLux0	59.52	100.00	76.19
3: V.cho1Lux0	57.14	76.19	100.00

	1	10	20	30	40																																					
<b>A.ba1Lux0-L</b>	P	L	W	Q	V	E	K	D	L	I	L	R	A	L	A	L	Y	D	N	D	V	P	K	A	A	T	R	L	E	I	S	P	S	T	I	Y	R	K	L	Q	I	W
<b>P.augLux0</b>	P	L	W	V	V	E	K	R	A	I	Q	W	A	I	D	A	C	D	G	N	I	P	R	A	A	G	L	L	E	V	S	P	S	T	I	Y	R	K	L	Q	S	W
<b>V.cho1Lux0</b>	P	L	W	M	T	E	K	Q	A	I	E	Q	A	I	E	A	C	D	G	N	I	P	R	A	A	T	Y	L	D	V	S	P	S	T	I	Y	R	K	L	Q	T	W

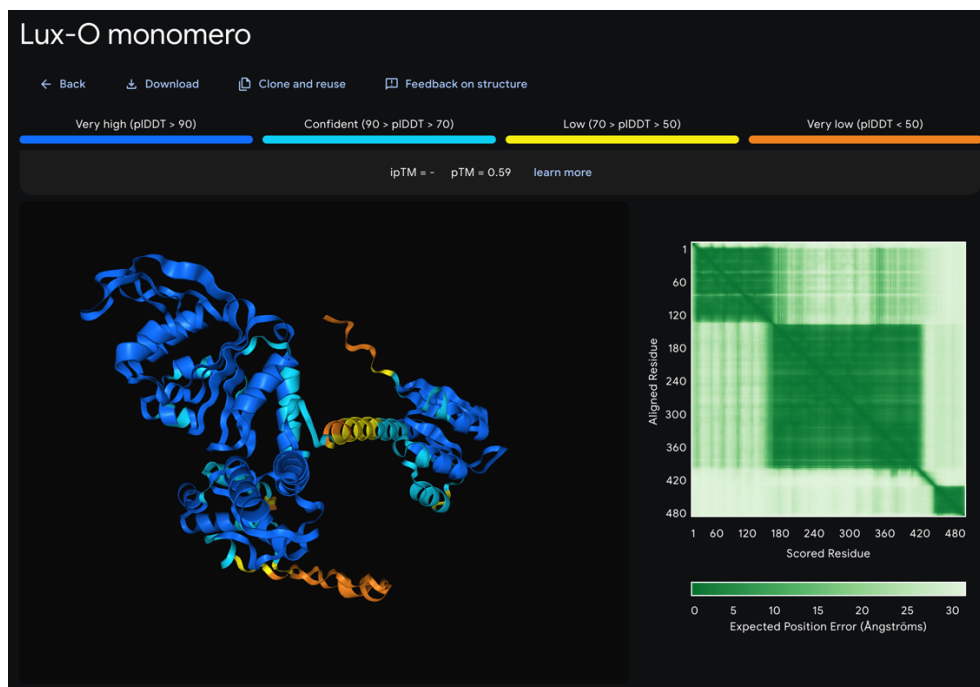
## Anexo 6. Alineamientos entre dominio HTH de NtrC1 y LuxO-L.

	1	10	20	30	40																																					
<b>A.ba1Lux0-L</b>	P	L	W	Q	V	E	K	D	L	I	L	R	A	L	A	L	Y	D	N	D	V	P	K	A	A	T	R	L	E	I	S	P	S	T	I	Y	R	K	L	Q	I	W
<b>A.aeoNtrC</b>	S	I	K	E	I	E	K	E	I	I	K	V	L	K	E	V	N	F	N	K	K	L	A	S	E	I	L	G	I	P	L	R	T	L	Y	R	R	L	K	E	Y	
<b>A.aeoNtrC4</b>	.	.	K	E	F	E	K	I	F	I	E	E	K	L	R	E	Y	D	Y	D	L	K	R	T	A	E	E	I	G	I	D	L	S	N	L	Y	R	K	I	K	S	L

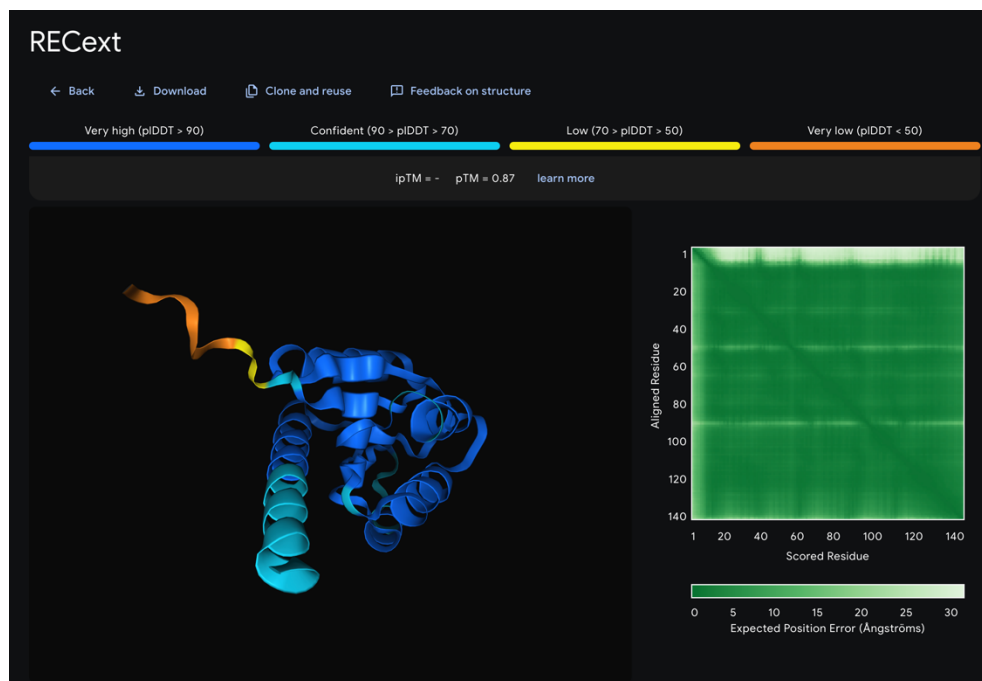
Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: A.ba1Lux0-L	100.00	26.19	32.50
2: A.aeoNtrC	26.19	100.00	40.00
3: A.aeoNtrC4	32.50	40.00	100.00

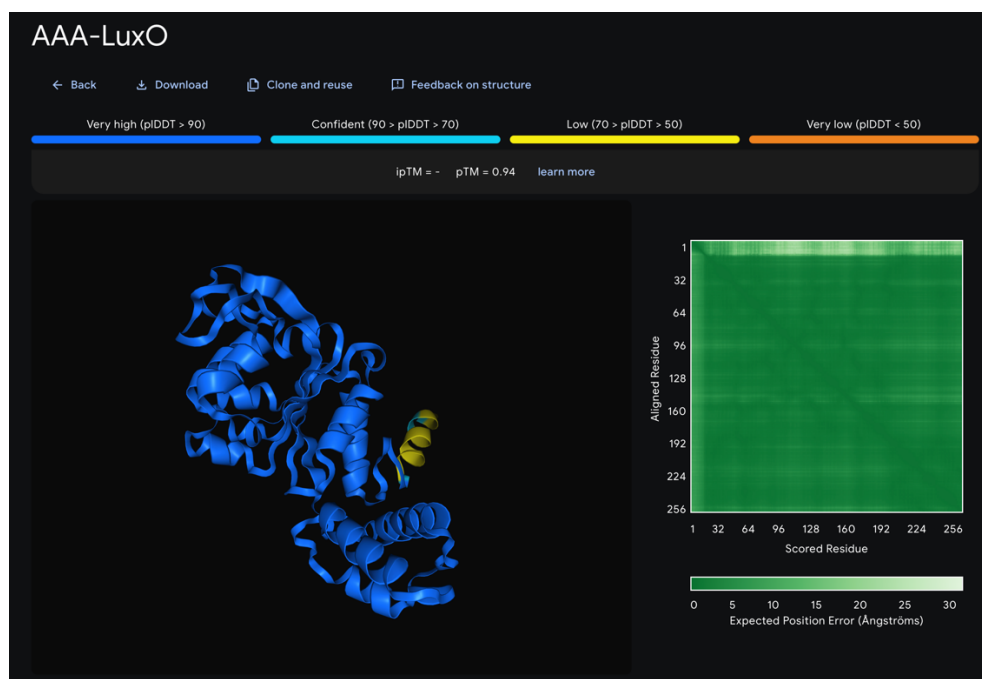
## Anexo 7. Predicción de monómero de LuxO-L.



## Anexo 8. Predicción del dominio REC



## Anexo 9. Predicción del dominio AAA+



## Anexo 10. Predicción del dominio HTH.

