



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Efecto de la limitación nutricional en la esporulación de  
*Bacillus amyloliquefaciens* 83

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Ing. Esmeralda Yazmín Soriano Peña

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Leobardo Serrano Carreón  
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Alfredo Martínez Jiménez  
Instituto de Biotecnología, UNAM  
Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos  
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Cuernavaca, Mor. Diciembre, 2016.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Leobardo Serrano Carreón.

Durante el periodo de ejecución, se contó con el apoyo de la beca de maestría otorgada por el Consejo de Ciencia y Tecnología (No. Registro 329356), del apoyo económico de la PAEP-UNAM y del financiamiento del proyecto CONACyT 240445 CB-2014-01.



*"Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la ciencia, no podrá comprender su tiranía."*

*Mary Shelley*

## DEDICATORIA

A mis padres

Mario Soriano y Juana Peña

por seguir siendo los pilares de mi vida.

A todos los profesores

que me alentaron a hacer preguntas.

A los amigos que se fueron lejos,

a los que se quedaron en casa

y a los que se forjaron en este episodio de mi vida.

A las dudas

que se han materializado en mi camino.

## AGRADECIMIENTOS

Dr. Leobardo Serrano Carreón, por la oportunidad de adentrarme en un mundo de reactores y esporas, por su sabia dirección y consejo.

Dr. Enrique Galindo y Dr. Carlos Peña, por su retroalimentación a lo largo del proyecto.

Al Comité Tutorial, por sus recomendaciones que enriquecieron este proyecto

Dr. Alfredo Martínez Jiménez

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos

Miembros del jurado

Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos

Dr. Mario Rodríguez Monroy

Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella

Dr. Luis Servín González

Al equipo de la planta piloto y del laboratorio 10:

Dra. Celia Flores, por su asesoría y apoyo en RTqPCR

M. en B. Raunel Tinoco Valencia, por su ayuda en HPLC

Ing. Verónica Albiter Hernández, por su constante consejo en el área de biorreactores

Biol. Mario Alberto Caro Bermúdez, por su apoyo en la plataforma de la planta.

Dra. Ana Laura Muñoz, por apoyarme con toda pregunta sobre *Bacillus*

Sra. Leticia Díaz Aldama

Sr. Antonio Dorantes López

Sr. Arturo Escobar Juárez.

A mis compañeros del grupo Galindo: Yesenia, Sergio, Agustín, Alehli, Karina, Berenice, Miriam, Andrés, Modesto, Salvador, Cinthia, Rocío, Rafael, Leonardo, Magda, Rita, Karen y Lee.

Y a mis amigos de generación: “los proteínos”.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	8
ÍNDICE DE TABLAS .....	10
RESUMEN .....	11
1. INTRODUCCIÓN .....	12
2. ANTECEDENTES .....	13
2.1 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 83 como agente de control biológico. ....	13
2.2 Diferenciación celular en <i>Bacillus</i> .....	14
2.2.1 Diferenciación celular en <i>B. amyloliquefaciens</i> .....	14
2.2.2 Multiplicidad celular en <i>Bacillus subtilis</i> .....	15
2.2.3 Esporulación en <i>Bacillus subtilis</i> .....	16
2.3 <i>Quorum sensing</i> .....	17
2.5 ComA regulador maestro de diferenciación a competencia .....	18
2.6 Spo0A: El regulador maestro de diferenciación celular y esporulación .....	19
2.7 Heterogeneidad de poblaciones en cultivos sumergidos: antecedentes del grupo de trabajo .....	21
3. HIPÓTESIS.....	24
4. OBJETIVOS .....	24
4.1 Objetivo general.....	24
4.2 Objetivos específicos.....	24
5. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL.....	25
6. METODOLOGÍA.....	28
6.1 Microorganismo .....	28
6.2 Medios de cultivo .....	28
6.2.1 YPG .....	28
6.2.2 Medio mineral .....	29
6.3 Conservación y activación de cepa .....	29
6.4 Preparación de inóculos.....	30
6.5 Condiciones de cultivo .....	30
6.6 Métodos analíticos.....	32
6.6.1 Cuantificación de células totales.....	32
6.6.2 Cuantificación de glucosa residual .....	33

6.6.3	Determinación de % de esporulación .....	33
6.6.4	Determinación de lipopéptidos.....	34
6.6.5	Determinación de acetoína, 2,3-butanodiol y ácido acético. ....	35
6.7	Análisis de expresión génica .....	36
6.7.1	Oligonucleótidos .....	36
6.7.2	Extracción de RNA .....	37
6.7.3	Síntesis de cDNA.....	37
6.7.4	RTqPCR .....	38
6.8	Análisis estadístico .....	39
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
7.1	Genoma de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 83.....	40
7.2	Cinéticas de crecimiento, esporulación y lisis.....	42
7.2.1	Crecimiento celular .....	46
7.2.2	Esporulación .....	47
7.2.3	Producción de lipopéptidos .....	49
7.2.4	Producción metabolitos secundarios .....	52
7.2.5	Lisis celular .....	54
7.3	Expresión génica.....	57
7.3.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 83, cepa poco competente .....	58
7.3.2	Expresión de <i>spolIA</i> .....	60
7.3.3	Diferenciación a otros tipos celulares (expresión de polímero y <i>biofilm</i> ) .....	62
7.3.4	Expresión e influencia de las cinasas.....	64
7.3.5	Expresión de moléculas de señalización .....	66
8.	CONCLUSIONES .....	69
9.	PERSPECTIVAS .....	70
10.	BIBLIOGRAFÍA .....	71
11.	ANEXOS .....	75
	Anexo1. Control de condiciones de cada cultivo .....	75
	Anexo 2. Construcción de plásmidos y estrategias de transformación .....	78
	Anexo 3. Viscosidad de los cultivos.....	81
	Anexo 4. Cuantificación de lipopéptidos y ácidos orgánicos .....	82
	Anexo 5. Expresión génica y análisis estadístico.....	83
	Anexo 6. Curvas de calibración .....	84

Anexo 7. Validación de gen de referencia.....	86
Anexo 8. Análisis estadístico .....	87
Dependent Variable: spollA.....	87
Dependent Variable: epsA.....	90
Dependent Variable: kinB.....	93
Dependent Variable: kinC.....	96
Dependent Variable: phrC.....	99
Dependent Variable: srfAA.....	102
Dependent Variable: bmyD .....	105

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producto comercial FungifreeAB.....	13
Figura 2. Tipos celulares en que se puede diferenciar Bacillus. Adaptado de López & Kolter, 2010. .....	15
Figura 3. Ciclo de vida-esporulación de Bacillus subtilis. Tomada de Errington, 2003. ....	16
Figura 4. Red general de diferenciación celular en Bacillus. Está dividida en los dos factores (limitación nutricional y densidad celular) que influyen en la esporulación, e involucra otros tipos celulares. Spo0A-P a baja concentración favorece la diferenciación a células caníbales y productoras de matriz extracelular, a alta concentración activa la transcripción de los genes de esporulación. La cascada de fosforilación inicia con 5 histidina cinasas; se ha relacionado a KinA y KinB con el estrés nutricional; y KinC y KinD con señales extracelulares. Los péptidos ComX y CSF favorecen la diferenciación; y los lipopéptidos surfactina y bacilomicina parecen estar relacionados a la cinasa KinC. ....	18
Figura 5. Cinéticas decrecimiento y esporulación (Cristiano, 2012). A la izquierda se observa un cultivo lote, donde se presenta esporulación tras la limitación nutricional. A la derecha un cultivo alimentado exponencialmente, dónde no hay limitación nutricional en las primeras 60 horas, pero presenta esporulación, probablemente atribuido a la alta densidad celular. ....	21
Figura 6. Cinética de cultivo pH-auxostato (Soriano, 2013). Arriba se observa como varía la tasa de dilución, que representa también la velocidad de crecimiento, ésta fluctúa debido a que como se observa en el grafico del centro se presenta esporulación (proceso contrario a la duplicación). En el grafico inferior se observa en azul la surfactina, cuya concentración es mayor horas antes de observar esporas (probablemente contribuya a la activación de la esporulación). ....	22
Figura 7. Diagrama general de la secuencia experimental .....	25
Figura 8. Diagrama de toma de muestras para RTqPCR. La cinética representa una simulación de un cultivo lote con 15g/L de glucosa y un inóculo de $1 \times 10^7$ cel/mL. ....	27
Figura 9. Bacillus amyloliquefaciens 83 al microscopio, 100X. ....	28
Figura 10. Biorreactor Microferm de 14 L.....	31
Figura 11. Biorreactor Dusher de 3L. ....	31

Figura 12. Representación de los cuadrantes de la cámara de Neubauer. Para la cuantificación de bacterias se usó el cuadrante 3, cuyo volumen corresponde a 0.004 mm <sup>3</sup> . .....	32
Figura 13. Tinción de esporas de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 83. En verde se aprecian las esporas y en rosa las células vegetativas. ....	34
Figura 14. Programa de PCR usado en el protocolo de RTqPCR. ....	38
Figura 15. Genoma de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 83 .....	40
Figura 16. Cinéticas de crecimiento celular, aparición de esporas y glucosa residual de los cultivos B, M y A, tienen representada la desviación estándar entre repeticiones de cultivos. Las líneas amarillas indican los momentos de toma de muestra para análisis de expresión génica. ....	44
Figura 17. Tiempo que toma la esporulación a partir del agotamiento de glucosa (tG0). En azul el tiempo que toma visualizar la primera espora (t1s) y en naranja el tiempo en que alcanza la máxima concentración de esporas (tf). El gráfico representa la desviación estándar entre repeticiones. En cada barra se encuentra el valor numérico y al análisis estadístico representado por letra. Se aplicó ANOVA y prueba de Tukey al 95% de confiabilidad. ....	45
Figura 18. Distribuciones de tipos celulares a t <sub>r</sub> . En cada fracción del gráfico se encuentra el análisis estadístico representado por una letra, que indica el grupo al que pertenece, en el caso del % de esporas no hay diferencias significativas entre ningún cultivo (ANOVA, con prueba de Tukey al 95% de confiabilidad). ....	48
Figura 19. Cuantificación de surfactina en sobrenadante de caldo de cultivo (izquierda) y concentración específica (derecha). ....	50
Figura 20. Cuantificación de bacilomicina en sobrenadante de caldos de cultivo (izquierda) y concentración específica (derecha). ....	51
Figura 21. 2,3-butanodiol, acetoina y ácido acético en sobrenadante. ....	53
Figura 22. Red de diferenciación celular de <i>Bacillus</i> . Rodeados en óvalos rojos se encuentran los genes cuya expresión se analizó. ....	57
Figura 23. Modelo de señalización en el que se inicia el estado competente en <i>Bacillus subtilis</i> . ComX desencadena la transcripción de ComS, que se une a MecA, desreprimiendo a ComK, que es responsable de la transcripción de genes involucrados en competencia. Tomado de Leistner et al, 2008. ....	59
Figura 24. Expresión de <i>spolIA</i> . Sobre las columnas se encuentran una letra que representa el conjunto al que pertenece según la prueba estadística (ANOVA de dos factores, prueba de Tukey, 95% de confianza-Anexo 8). ....	60
Figura 25. Expresión de <i>epsA</i> . *incluye la muestra afectada por limitación de oxígeno, que presentó una mayor expresión y variabilidad, lo que impide ver diferencias significativas. Sobre las columnas se encuentran una letra que representa el conjunto al que pertenece según la prueba estadística (ANOVA de dos factores, prueba de Tukey, 95% de confianza- Anexo 8). ....	62
Figura 26. Expresión de <i>kinB</i> . Sobre las columnas se encuentran una letra que representa el conjunto al que pertenece según la prueba estadística (ANOVA de dos factores, prueba de Tukey, 95% de confianza-Anexo 8). ....	64
Figura 27. Expresión de <i>kinC</i> . Sobre las columnas se encuentran una letra que representa el conjunto al que pertenece según la prueba estadística (ANOVA de dos factores, prueba de Tukey, 95% de confianza-Anexo 8). ....	65

Figura 28. Expresión de phrC. Sobre las columnas se encuentran una letra que representa el conjunto al que pertenece según la prueba estadística (ANOVA de dos factores, prueba de Tukey, 95% de confianza-Anexo 8).	66
Figura 29. Expresión de srfaA. Sobre las columnas se encuentran una letra que representa el conjunto al que pertenece según la prueba estadística (ANOVA de dos factores, prueba de Tukey, 95% de confianza-Anexo 8).	67
Figura 30. Expresión de bmyD. Sobre las columnas se encuentran una letra que representa el conjunto al que pertenece según la prueba estadística (ANOVA de dos factores, prueba de Tukey, 95% de confianza-Anexo 8).	68
Figura 31. Control de cultivos B.	75
Figura 32. Control de cultivos M.	76
Figura 33. Control de cultivos A.	77
Figura 34 Mapa del plásmido pJET2-FAComAFB-LoxPsp, y gel de agarosa comprobando fragmento individuales y en el último pozo la suma de los anteriores	78
Figura 35. Mapa del plásmido pJET2-FAphrCFB-LoxPsp, y gel de agarosa comprobando fragmento individuales y en el primer pozo la suma de los anteriores	79
Figura 36. Curva de calibración de surfactina.	84
Figura 37. Curva de calibración de bacilomicina D.	84
<i>Figura 38. Curvas de calibración de 2,3-butanodiol, acetoina y ácido acético.</i>	85
Figura 39. Valores de estabilidad génica obtenidos del algoritmo NormFinder. La mejor opción para gen de referencia es aquel cuyo valor de estabilidad sea más bajo (comX).	86
Figura 40. Valores de M obtenidos del algoritmo de geNORM; comK, hupA y comX resultaron los genes con menor variabilidad de expresión, obteniendo el menor valor comX.	86

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones iniciales de los cultivos a evaluar	26
Tabla 2. Composición del medio YPG	28
Tabla 3. Composición del medio mineral	29
Tabla 4. Oligonucleótidos usados en RTqPCR	36
Tabla 5. Identidad de genes involucrados en la señalización y diferenciación de Bacillus subtilis y Bacillus amyloliquefaciens. Realizada en BLAST.	41
Tabla 6. Resumen de condiciones y parámetros cinéticos de cultivos B, M y A.	47
Tabla 7. Comparación de velocidad exponencial de esporulación y velocidad de decaimiento celular (K)	55
Tabla 8. Resumen de métodos de transformación probados	80
Tabla 9. Viscosidad, a $100 \text{ s}^{-1}$ , en cP. Muestras 2 y 3 de cultivos M muestran un aumento de viscosidad, la cual disminuye hacia el final de la fermentación, sugiriendo un consumo del agente responsable del aumento de la viscosidad	81
Tabla 10. Concentraciones de lipopéptidos en sobrenadantes de caldo de cultivo	82
Tabla 11. Concentraciones de ácidos orgánicos en sobrenadantes de caldo de cultivo	82
Tabla 12. Expresión génica y análisis estadístico	83

## RESUMEN

Las esporas de *Bacillus amyloliquefaciens* 83 son el ingrediente activo del *Fungifree AB*, agente de control biológico comercializado para el control de antracnosis, cenicilla y moho gris. Las esporas son estructuras altamente especializadas resistentes al calor, sequedad, estrés nutricional, luz UV y agentes químicos, características idóneas para un formulado estable.

En el grupo de investigación, se implementaron estrategias de cultivo lote y lote alimentado para la producción de esporas, y en el camino se encontró que la esporulación no sólo responde a la limitación nutricional, sino también al efecto de moléculas de *quorum sensing*, este fenómeno no ha sido estudiado en *B. amyloliquefaciens*. En el modelo de estudio, *Bacillus subtilis*, se han caracterizado moléculas que favorecen la diferenciación celular, a alta densidad celular, pero no se ha diferenciado claramente entre el efecto de la limitación nutricional y el de la densidad celular.

El presente trabajo buscó delimitar la influencia de la limitación nutricional, para lo que se establecieron condiciones de cultivo lote que disminuyeran el efecto de la densidad celular y/o las moléculas de señalización producidas a alta densidad celular, en las que se evaluó la esporulación.

Se encontró que la limitación nutricional es el factor más relevante para la diferenciación a esporas; y que la esporulación se agiliza en condiciones en las que se acumulan moléculas de señalización (incluidas surfactina y bacilomicina-previo no relacionada a esporulación); además el proceso requiere de fuentes alternativas de energía que pueden ser metabolitos de reserva (ácidos orgánicos y polímeros) producidos en la fase de crecimiento y/o los productos de la lisis de células hermanas.

# Efecto de la limitación nutricional en la esporulación de *Bacillus amyloliquefaciens* 83.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Bacillus amyloliquefaciens* 83 es un microorganismo de interés industrial por su uso como agente de control biológico, actualmente comercializado como *Fungifree*. La investigación en esta cepa se ha dirigido a mejorar la eficiencia de la producción de esporas, obteniéndose en distintos trabajos concentraciones finales de:  $1 \times 10^9$  esporas/ml en cultivos en lote,  $5 \times 10^9$  esporas/mL en cultivos alimentados por pulsos, y de hasta  $1.4 \times 10^{10}$  esporas/mL en cultivos alimentados exponencialmente (Rodríguez, 2005; Morales, 2007; Cristiano, 2012).

Actualmente se sabe que la esporulación depende de la limitación nutricional (condiciones del medio), y de la densidad celular (*quorum sensing*) (Grossman & Losick, 1998, Lazazzera et al, 2000; Higgins & Dworkin, 2012). Entre las moléculas de *quorum sensing* de *B. amyloliquefaciens* 83 se han identificado a los péptidos ComX y CSF (factor de esporulación y competencia), y los lipopéptidos surfactina y bacilomicina D, que participan directa o indirectamente en la activación de Spo0A, regulador maestro de esporulación. (Solomon et al, 2006; Lanigan-Gerdes et al, 2007; Xu et al, 2013; López et al, 2009).

En las últimas décadas se ha estudiado a profundidad la esporulación de *Bacillus subtilis*, pero hasta la fecha no se ha determinado el efecto independiente de la limitación nutricional y del *quorum sensing* en la diferenciación celular a esporas. Así que el presente trabajo busca estudiar el papel de la limitación nutricional en la esporulación de *B. amyloliquefaciens* 83, para lo que se plantean condiciones en las que se disminuirá el efecto del *quorum sensing*, en la medida de lo posible, a través de la manipulación de las concentraciones iniciales de células y sustrato limitante.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *Bacillus amyloliquefaciens* 83 como agente de control biológico.

Se conoce como control biológico al uso de organismos (de sus metabolitos o subproductos) que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas o sus productos (Serrano & Galindo, 2007).



Figura 1. Producto comercial FungifreeAB

En la búsqueda y selección de microorganismos como agentes de biocontrol, el género *Bacillus* ha resultado eficaz, siendo los más representativos *Bacillus thuringiensis* contra diversos insectos y *Bacillus subtilis* en el control de fitopatógenos. *Bacillus subtilis* es considerado un buen agente de control biológico por las siguientes características: se distribuye ampliamente en la naturaleza, posee una reconocida actividad antimicrobiana (antibióticos peptídicos), no es considerado patógeno o toxigénico de humanos, animales o plantas, y se diferencia a esporas, que son estructuras altamente estables y resistentes a los efectos letales del calor, sequedad, congelación, entre otros (Errington, 2003; Stein, 2005).

En el grupo de investigación del Dr. Enrique Galindo y el Dr. Leobardo Serrano, se identificó la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* 83, la cual fue aislada del follaje de mango por el CIAD Culiacán.

*Bacillus amyloliquefaciens* 83 presenta la capacidad de sintetizar compuestos, como la bacilomicina D, con actividad antagonista frente a hongos fitopatógenos como *Colletotrichum gloeosporioides*, causante de la antracnosis en mango. Además, ésta cepa tiene la capacidad de formar esporas que le confiere características idóneas para la formulación de un producto estable, con larga vida de anaquel (Galindo et al, 2005; Solís, 2010).

Desde el 2012, tras un esfuerzo inter institucional y multidisciplinario, fue introducido al mercado mexicano *Fungifree AB*<sup>®</sup> (Figura 1), cuya formulación es a base de esporas de *Bacillus amyloliquefaciens* 83. Actualmente *Fungifree AB*<sup>®</sup> es un producto aprobado para el control de antracnosis, cenicilla y moho gris en cultivos de mango, papaya, aguacate, cítricos y frutos rojos; recientemente ingresó a la lista del Instituto de Evaluación de Materiales Orgánicos (registro OMRI) que le confiere la posibilidad de entrar al mercado de los cultivos orgánicos. (Galindo et al, 2013).

## 2.2 Diferenciación celular en *Bacillus*

### 2.2.1 Diferenciación celular en *B. amyloliquefaciens*

La diferenciación celular de *Bacillus* ha sido ampliamente estudiada en *Bacillus subtilis*, cuya red de señalización se ha asumido para especies cercanas, como lo son *B. lichenimorfis* y *B. amyloliquefaciens* (Zhao et al, 2014), pues se conoce que los genes involucrados en la esporulación están altamente conservados, incluso entre géneros (Traag et al, 2012).

Los esfuerzos de investigación relacionados a *Bacillus amyloliquefaciens* se han dirigido, principalmente, al estudio de su papel como agente de control biológico y promotor de crecimiento (Koumoutsi et al, 2004; Xu et al, 2012), pero se carece de estudios específicos sobre su red de diferenciación, o que señalen si existen o no diferencias en la señalización para la esporulación.

El avance tecnológico ha permitido la secuenciación y análisis de los genomas de las cepas: *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42, *B. amyloliquefaciens* SQR9 y *B. amyloliquefaciens* Subsp. *plantarum* UCMB5113 (Chen et al, 2007; Zhang et al, 2015; Niazi et al, 2014). Gracias a ello se han comparado las vías de señalización con respecto a *B. subtilis*, donde se han encontrado todos los genes involucrados en la diferenciación celular, excepto los genes de canibalismo (*sdpABC*), para los que se han propuesto tres genes como ortólogos del operón *sdp*, que probablemente estén involucrados en la diferenciación a células caníbales (Niazi et al, 2014).

La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* 83 originalmente fue relacionada con *B. subtilis*, ya que Aragón en el 2012 encontró que el gen ribosomal 16S de la cepa *Bacillus* sp. 83 (*Bacillus amyloliquefaciens* 83 previo a su identificación) tenía una identidad del 99% con *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 168. Actualmente, se cuenta con los resultados de la secuenciación masiva del genoma de nuestro modelo de estudio y se ha identificado como *Bacillus amyloliquefaciens* 83 (ver Sección 7.1).

Dado que no se cuenta con estudios precedentes en la diferenciación a esporas de *Bacillus amyloliquefaciens*, se ha tomado la información procedente del modelo de diferenciación basado en *B. subtilis*; el que parece concordar con lo conocido hasta ahora, pero que debe ser tomado con

precaución, ya que no se conoce si otros antibióticos o metabolitos secundarios, específicos de esta especie, contribuyen en el proceso de diferenciación celular.

### 2.2.2 Multiplicidad celular en *Bacillus subtilis*

*B. subtilis* es capaz de diferenciarse en tipos o subpoblaciones celulares (Figura 2), fenotípicamente distintas pero genéticamente iguales, que le permiten reaccionar ante diversas condiciones ambientales (Shank & Kolter, 2011; López & Kolter, 2010).

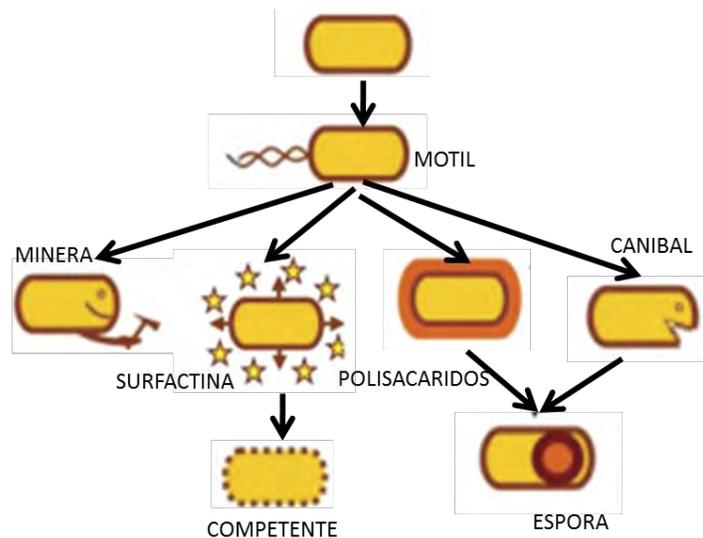


Figura 2. Tipos celulares en que se puede diferenciar *Bacillus*. Adaptado de López & Kolter, 2010.

Entre los tipos celulares de *B. subtilis* se encuentran: a) células vegetativas; b) células motiles, diferenciación que se presenta durante el crecimiento celular y da lugar a otros tipos celulares; c) células “mineras” o productoras de proteasas y/o antibióticos; d) células productoras de surfactina; e) células competentes, las cuales son capaces de incorporar DNA exógeno y con ello la posibilidad de adquirir características ventajosas en condiciones de estrés; f) células productoras de matriz polimérica (exopolisacáridos) relacionadas directamente con la formación de biopelículas; g) células caníbales, que secretan péptidos capaces de lisar a otras células y que retrasan la diferenciación a esporas; h) células que están en proceso de esporulación o esporas maduras, que representan una forma de conservación al resistir los efectos letales de calor, sequedad, congelación, radiación y químicos tóxicos, y que pueden germinar a su forma vegetativa cuando el ambiente es propicio para el crecimiento celular (Vlamakis et al, 2008; Shank & Kolter, 2011; López & Kolter, 2010).

Existen tres reguladores principales que controlan la diferenciación a los múltiples tipos celulares: Spo0A, DegU y ComA, cuya activación y regulación coordinada, en cada célula, propicia la población heterogénea de *Bacillus*. La activación de dichos sistemas se debe a la detección de señales extracelulares que propician cadenas de fosforilación específicas (Koumoutsis et al, 2007; Nakano et al, 1991; López & Kolter, 2010; Shank & Kolter, 2011).

### 2.2.3 Esporulación en *Bacillus subtilis*

Las esporas son células cuya estructura le permite conservarse ante diversas condiciones ambientales. La diferenciación de una célula vegetativa a una espora es un proceso fisiológico complejo, que generalmente inicia en la fase estacionaria y se divide en siete estadios (Figura 3), basados en los principales cambios citológicos (Errington, 2003).

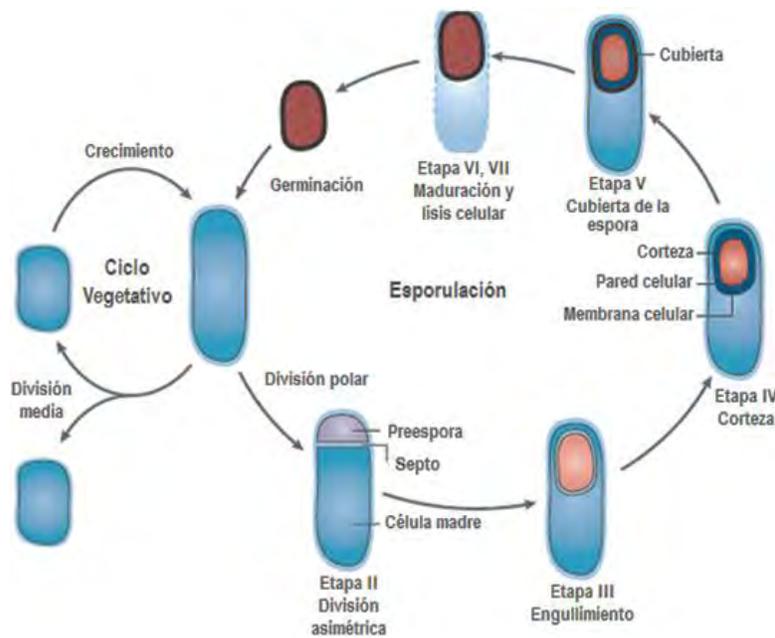


Figura 3. Ciclo de vida-esporulación de *Bacillus subtilis*. Tomada de Errington, 2003.

En resumen, tras iniciar el proceso de esporulación se da la formación del septo de la célula, seguido del engullimiento, la formación de la corteza y la cubierta, finalmente la maduración y lisis de la célula madre, mientras, que en condiciones de no limitación nutricional, la espora da lugar a una célula vegetativa que continua con el ciclo de vida de *Bacillus* (Errington, 2003; Tan & Ramamurthi, 2015).

A pesar de que *Bacillus* ha sido un género ampliamente estudiado, durante mucho tiempo se pensó que la inducción al proceso de esporulación se debía únicamente a la limitación nutricional; sin embargo, se ha observado que la esporulación se favorece en condiciones de alta densidad celular (Grossman & Losick, 1998; Cristiano, 2012). Esto último se explica como una respuesta del microorganismo a la mayor acumulación de moléculas de señalización extracelulares, producidas en función a su densidad celular, en un proceso que es conocido como *quorum sensing*.

### 2.3 *Quorum sensing*

*Quorum sensing* es el término en inglés, que se designa para referirse al mecanismo de regulación de la expresión genética en respuesta a la densidad de población celular. Las células involucradas producen y excretan moléculas, que sirven como señal química para inducir la expresión genética colectiva (Miller & Bassler, 2001).

La primera evidencia de que la esporulación de *B. subtilis* 168 dependía de factores extracelulares fue la adición de decoyina (inhibidor de la GMP sintetasa, con un efecto análogo al de la limitación nutricional), la cual sólo inducía la esporulación en escenarios de alta densidad celular. Además la adición de medio de cultivo gastado (filtrado estéril de caldo de cultivo de células cultivadas a alta densidad celular) fue capaz de promover la esporulación de cultivos a bajas densidades celulares en condiciones de limitación nutricional (Grossman & Losick, 1988). Estudios de estos caldos sobrenadantes permitieron la caracterización de las feromonas ComX y CSF, cuya adición exógena a cultivos de *B. subtilis* con baja densidad celular, inducidos con decoyina, incrementan el porcentaje de esporulación. Además, en una mutante no productora de ComX ( $\Delta comQ$ ), inducida a esporular mediante la adición de decoyina, la frecuencia de esporulación fue 66 veces menor comparada con la cepa silvestre cultivada en condiciones similares (Magnuson et al, 1994; Solomon et al, 1996).

Entre las moléculas de *quorum sensing* de *Bacillus subtilis* se han caracterizado a los péptidos o feromonas ComX y CSF y el lipopéptido surfactina; además de la bacilomicina en *B. amyloliquefaciens* (Lazazzera, 2000; Nakano et al, 1991; Xu et al, 2012).

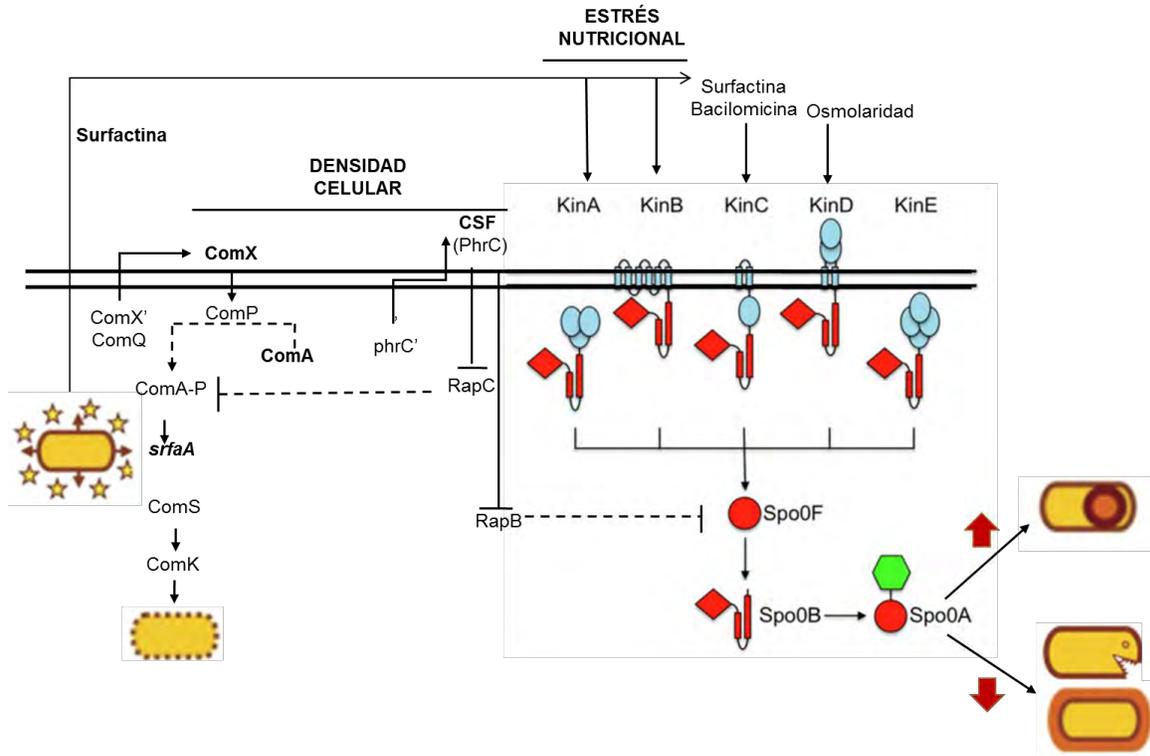


Figura 4. Red general de diferenciación celular en *Bacillus*. Está dividida en los dos factores (limitación nutricional y densidad celular) que influyen en la esporulación, e involucra otros tipos celulares. Spo0A-P a baja concentración favorece la diferenciación a células caníbales y productoras de matriz extracelular, a alta concentración activa la transcripción de los genes de esporulación. La cascada de fosforilación inicia con 5 histidina cinasas; se ha relacionado a KinA y KinB con el estrés nutricional; y KinC y KinD con señales extracelulares. Los péptidos ComX y CSF favorecen la diferenciación; y los lipopéptidos surfactina y bacilomicina parecen estar relacionados a la cinasa KinC. Adaptado de Cristiano 2016 (Tesis en progreso), a su vez tomado y adaptado de López et al, (2008). (Schultz et al, 2009; Romero 2013; Xu et al, 2012).

## 2.5 ComA regulador maestro de diferenciación a competencia

La diferenciación a competencia genética en *Bacillus subtilis* está regulada por un sistema de *quorum sensing*. ComP-ComA es un sistema de transducción de dos componentes, cuya activación depende de la presencia de las feromonas ComX y CSF (Bacon-Schneider et al, 2002).

ComX está codificado por el gen *comX*, localizado en el operón *comQXPA*, su traducción resulta en un precursor de 55 aminoácidos el cual es procesado y modificado por la proteína ComQ resultando un péptido de 9-10 aminoácidos con un grupo isoprenoide en su residuo triptófano (Magnuson et al, 1994). La presencia de ComX es sensada por ComP, que se autofosforila y transfiere el grupo fosfato al regulador ComA, ComA-P a su vez activa a ComS y consecuentemente

a ComK, lo que da lugar al estadio de competencia (Figura 4) (Bacon-Schneider et al, 2002; López & Kolter, 2010; Higgins & Dworkin, 2012).

CSF está involucrado en el control de la competencia y esporulación en *Bacillus subtilis*, y es un péptido de cinco aminoácidos (ERGMT), altamente conservado entre especies de *Bacillus*, y codificado en los 5 últimos codones del precursor *phrC* de 40 codones (Solomon et al, 1996). Este regula la competencia al inhibir a la activación de la fosfatasa RapC, la cual a su vez inhibe la acumulación de ComA fosforilado. También favorece la esporulación al inhibir a la fosfatasa RapB, que es un regulador negativo de la cascada de fosforilación de Spo0A (Pottatil et al, 2008; Perego, 1997).

Además, ComA fosforilado regula la transcripción del operón *srfaA*, requerido para la producción y excreción del lipopéptido surfactina (Nakano et al, 1991), también se ha reportado que actúa indirectamente como un regulador positivo en la síntesis de la bacilomicina D, molécula de naturaleza lipopeptídica, mediante la regulación positiva de la proteína DegQ, que promueve la unión del regulador transcripcional DegU-P a la región promotora del operón de bacilomicina. (Koumoutsi et al, 2007).

## 2.6 Spo0A: El regulador maestro de diferenciación celular y esporulación

La regulación de la esporulación depende del regulador maestro Spo0A, cuya acción depende de su acumulación en forma activa o fosforilada. Esta proteína es activada mediante una cascada de fosforilación, que inicia con la acción de una o más de cinco histidinas cinasas (KinA, KinB, KinC, KinD y KinE) que se activan en respuesta a diferentes señales e inducen la fosforilación de otras proteínas intermedias Spo0F y Spo0B (Figura 4), que finalmente transfieren el grupo fosfato a Spo0A (Jiang et al, 2000; Higgins & Dworkin, 2012).

KinA y KinB son consideradas las principales cinasas involucradas en el proceso de esporulación. En el caso de la cinasa KinA no se conoce con exactitud la señal que reconoce, se piensa que se expresa activada bajo la regulación positiva del factor sigma H, y cuya regulación es en función de la concentración de esta proteína. A pesar de la incertidumbre del mecanismo, sí se sabe que está relacionada a la limitación nutricional. Por otro lado KinB esta reprimida por CodY que sensa los

niveles de nucleótidos de Guanina, por lo que ante una disminución de GTP se expresa, así que se induce en ausencia de nutrientes (Eswaramoorthy et al, 2009; Tojo et al, 2013).

Se ha reportado que KinC y KinD se activan en presencia de moléculas extracelulares o de cambios ambientales y que están involucradas con la formación de biopelículas, sin embargo, poco se conoce acerca de su papel en la esporulación. KinC es activada en presencia de moléculas que generan la fuga de potasio intracelular, dentro de las cuales se encuentra la surfactina, molécula lipopeptídica producida por *Bacillus* (López et al, 2009); también se ha reportado, en la cepa *B. amyloliquefaciens sub amyloliquefaciens plantarum* FZB42, que la inactivación del gen *bmyD* (involucrado en la síntesis de bacilomicina D, cuya naturaleza lipopeptídica es similar a la surfactina) tiene un efecto negativo en la transcripción de la *kinC* (Xu et al, 2012). Con respecto a KinD se sabe que funciona como osmosensor, cuya actividad cinasa es estimulada por el incremento de la presión osmótica, causada por la presencia de exopolisacáridos en las biopelículas (Rubinstein et al, 2012). La actividad de KinD también es estimulada por compuestos de exudados de plantas, relacionados con el ácido L-málico, cuya presencia estimula la formación de biopelícula en las raíces de las plantas (Chen et al, 2012); pero no se han podido caracterizar con exactitud qué tipo de moléculas inducen ésta actividad.

Spo0A-P regula a dos niveles (Figura 4), según su acumulación. Cuando se encuentra en una concentración “baja” inhibe la expresión de *abrB* (repressor de genes involucrados en diferentes tipos celulares, activo durante crecimiento vegetativo) y estimula la producción de Spo0E (regula a Spo0A defosforilándolo) promoviendo en este caso la diferenciación a células productoras de exopolisacáridos y caníbales. Mientras a una “alta” acumulación reprime la competencia vía ComK, induciendo así la transcripción de genes necesarios para la esporulación (Schultz et al, 2009; Fujita et al, 2005).

Los niveles de Spo0A-P además de estar definidos por la activación de la cinasas antes descritas, también se regulan mediante la acción de varias fosfatasas, llamadas proteínas Rap, que desfosforilan a las proteínas Spo0F y Spo0B, disminuyendo la disponibilidad de fosfato para Spo0A (Venning et al, 2005). La expresión de los genes que codifican a las proteínas Rap es activada por medio del regulador maestro ComA. Éstas fosfatasas son a su vez son inhibidas por péptidos Phr excretados por la célula al medio de cultivo durante su crecimiento a altas densidades celulares, activados por SigH (Lanigan-Gerdes et al, 2007; López et al, 2009). Estos mecanismos de control

permiten a la célula un estado intermedio, en el que elige retomar el crecimiento vegetativo o iniciar el proceso de esporulación.

## 2.7 Heterogeneidad de poblaciones en cultivos sumergidos: antecedentes del grupo de trabajo

*Bacillus amyloliquefaciens* 83 ha sido estudiada en cultivos en lote y lote alimentado en medio mineral suplementado con glucosa y sulfato de amonio. El cultivo lote se divide en dos etapas, la primera de crecimiento vegetativo que abarca hasta el agotamiento de un sustrato limitante, y la segunda de esporulación durante la fase estacionaria (Figura 5); mientras que en cultivos lote alimentado, que son diseñados para extender la primera etapa de crecimiento vegetativo, se presenta una esporulación temprana, previa a la limitación nutricional (Morales, 2007; Cristiano, 2012).

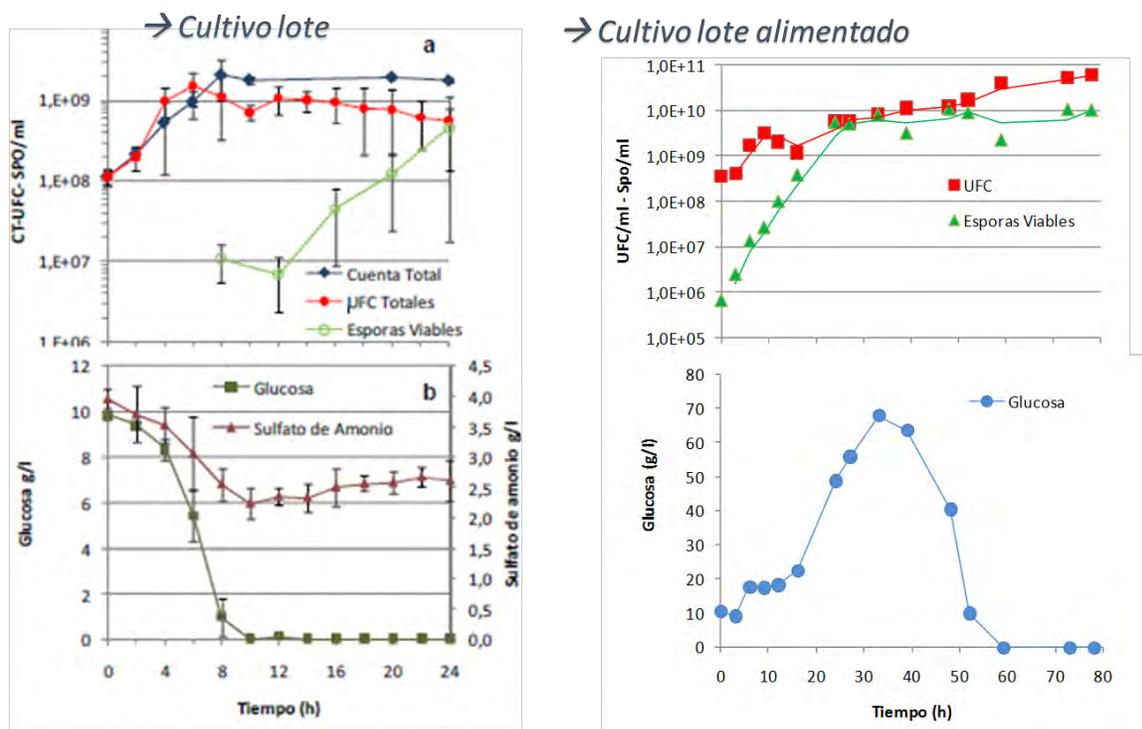


Figura 5. Cinéticas de crecimiento y esporulación (Cristiano, 2012). A la izquierda se observa un cultivo lote, donde se presenta esporulación tras la limitación nutricional. A la derecha un cultivo alimentado exponencialmente, donde no hay limitación nutricional en las primeras 60 horas, pero presenta esporulación, probablemente atribuido a la alta densidad celular.

Cristiano, en el 2012, evaluó diferentes estrategias de cultivo alimentado con objeto de aumentar la productividad de esporas. En el cultivo alimentado exponencialmente, a la derecha de la Figura 5, la glucosa residual no disminuye de 10 g/L en las primeras 60 horas, sin embargo la bacteria esporula, por lo que se establecen 4 fases: crecimiento vegetativo, transición y primera esporulación, reanudación de crecimiento vegetativo y esporulación final. Hasta el momento no existen reportes que señalen este comportamiento, aunque se conoce que las moléculas de *quorum sensing* influyen en la diferenciación celular, no se ha observado que por sí mismas, en condiciones de no limitación nutricional, propicien la esporulación (Cristiano, 2012).

En el grupo de investigación se ha encontrado una relación entre la esporulación y la concentración de surfactina, que ha sido estudiada en cultivos continuos tipo pH-auxostato (Figura 6) y quimiostato. Un cultivo continuo se caracteriza por mantener un equilibrio, donde el contenido del sistema no varía, sin embargo, en éste modelo celular no se alcanza un estadio estacionario, lo que se ha atribuido a las fluctuaciones de concentración de moléculas involucradas en la señalización, como lo es la surfactina. En la figura 6 se observa que la concentración de

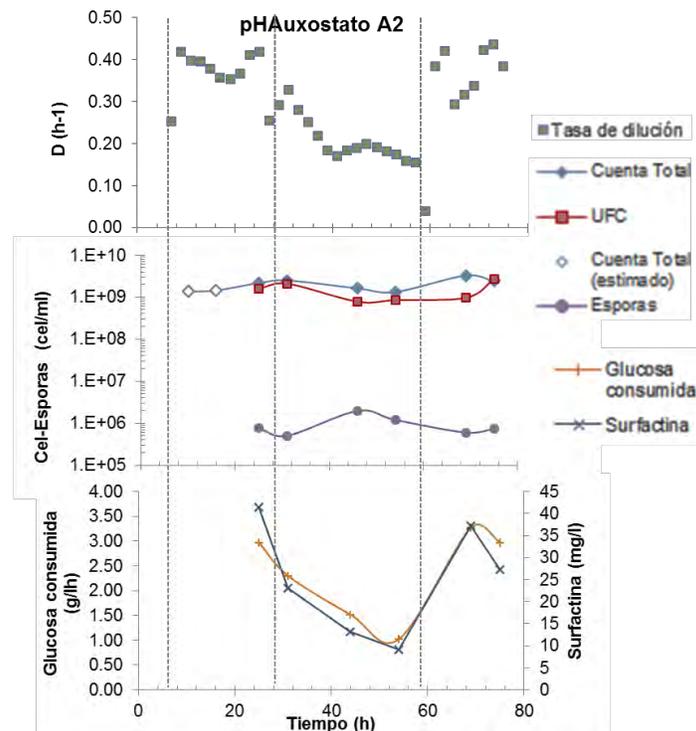


Figura 6. Cinética de cultivo pH-auxostato (Soriano, 2013). Arriba se observa como varía la tasa de dilución, que representa también la velocidad de crecimiento, ésta fluctúa debido a que como se observa en el grafico del centro se presenta esporulación (proceso contrario a la duplicación). En el grafico inferior se observa en azul la surfactina, cuya concentración es mayor horas antes de observar esporas (probablemente contribuya a la activación de la esporulación).

esporas aumenta horas después de un incremento en la concentración de surfactina, lo que sugiere que la esporulación en condiciones de no limitación nutricional se deba a la señalización de moléculas como la surfactina (Soriano, 2013; Cristiano, 2016). Además, en el genoma de *B. amyloliquefaciens* 83 se han identificado los genes responsables de las moléculas ComX, CSF, surfactina y bacilomicina (Aragón, 2012); también, se han identificado dichas moléculas en el sobrenadante de caldo de cultivo (Solís, 2010; Cristiano, 2012; Luna, 2015).

Ya que se han observado diferentes patrones de esporulación, el grupo de investigación está interesado en discernir entre el efecto de la limitación y del *quorum sensing* en la esporulación de *B. amyloliquefaciens* 83. El presente trabajo busca disminuir el efecto del *quorum sensing*, aplicando diferentes condiciones en cultivo lote, y así evaluar de manera más delimitada la influencia de la limitación nutricional en la esporulación.

### 3. HIPÓTESIS

La limitación nutricional, y no la densidad celular, es el factor de mayor relevancia en la esporulación de *Bacillus amyloliquefaciens* 83.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

Contribuir a la comprensión del papel de la limitación nutricional en la esporulación de *Bacillus amyloliquefaciens* 83, a través del análisis de la esporulación bajo diferentes condiciones de limitación nutricional y de densidad celular (concentración de sustrato limitante y densidad celular iniciales), en cultivos lote.

#### 4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la pertinencia del modelo de diferenciación celular de *B. subtilis*, aplicado a *B. amyloliquefaciens* 83.
- Para delimitar el efecto de la limitación nutricional, establecer condiciones de cultivo lote que permitan disminuir el efecto del *quorum sensing*.
- Evaluar la influencia de la limitación nutricional en la esporulación de *B. amyloliquefaciens* 83; comparando la eficiencia, velocidad exponencial y velocidad específica de esporulación, producción de lipopéptidos, y patrones de expresión de genes involucrados en la diferenciación; bajo condiciones de limitación nutricional y de limitación-alta densidad celular.

## 5. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL

Originalmente se contempló la construcción de cepas mutantes que tuviesen silenciados los genes *phrC* y *comA*, con objetivo de disminuir el efecto de las moléculas de *quorum sensing*, ya que estos genes responden a la síntesis o recepción de CSF y ComX, pero, tras múltiples intentos de transformación (Anexo 2) no se obtuvieron las cepas buscadas, por lo que se optó por replantear el trabajo y elegir condiciones de cultivo lote que permitiesen evaluar la limitación nutricional delimita mediante la disminución del efecto de las moléculas del *quorum sensing*.

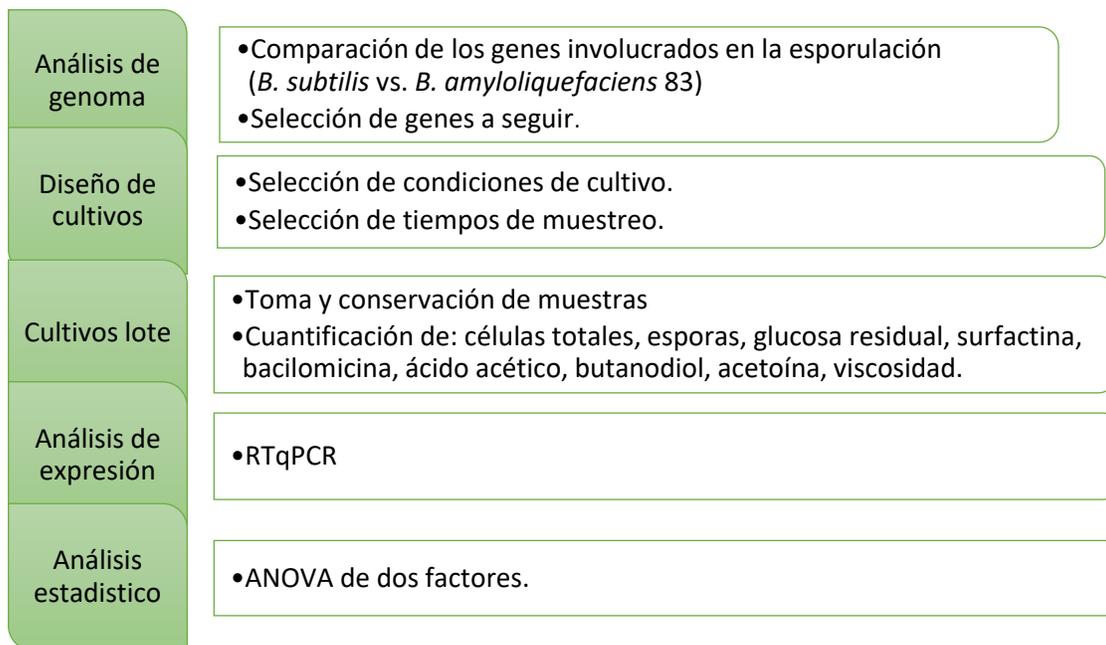


Figura 7. Diagrama general de la secuencia experimental

Se partió del análisis de la vía de señalización reportada en *Bacillus subtilis*, por lo que se inició con un análisis de genoma de *B. amyloliquefaciens* 83 y la comparación de los genes involucrados en la diferenciación a esporas entre ambas cepas.

Se eligieron dos condiciones donde se viese disminuido el efecto de la densidad celular y una condición donde ambos factores estuviesen involucrados, para permitir la comparación, cuyas condiciones iniciales se ven resumidas en la Tabla 1.

El primer cultivo se planteó a baja densidad celular y baja concentración de glucosa (Cultivo B); la densidad celular inicial se basó en el trabajo de Grossman & Losick de 1988, donde observan una meseta en la influencia de la densidad celular por arriba de  $1 \times 10^8$  cel/mL, ante esto y pruebas preliminares, se eligió analizar el cultivo en el orden de magnitud de células de  $1 \times 10^7$  cel/mL, por lo que el inóculo correspondió a  $5 \times 10^6$  cel/mL con 0.15 g/L de glucosa inicial, lo que alcanzó un máximo de  $5-6 \times 10^7$  cel/mL (Grossman & Losick, 1988). Al final de este cultivo se esperaba que prevaleciera el efecto de la limitación nutricional sobre el de la densidad celular en la esporulación de *B. amyloliquefaciens*.

En la segunda condición, se buscó incrementar el efecto de la densidad celular mediante una inducción de limitación nutricional temprana a alta densidad celular (Cultivo A), es decir un cultivo que iniciase a alta densidad celular y con muy poca fuente de carbono, que se viese mermado en su producción de metabolitos secundarios, incluidas las moléculas de señalización celular. Para lograrlo se partió de un inóculo a alta densidad celular ( $1-2 \times 10^9$  cel/mL), al que se le retiró el sobrenadante y con ello la mayoría de moléculas de *quorum sensing*, y con sólo 0.15 g/L de glucosa, condición en la que se alcanzó la limitación previo a los 20 minutos de la fermentación.

La última condición se identifica con un cultivo lote “común” para la producción de esporas de *B. amyloliquefaciens* 83, donde se presenta la limitación nutricional y alta densidad celular (Cultivo M). En este cultivo se alcanza alta densidad celular y tras el agotamiento de la glucosa se presenta la limitación nutricional. Para ello se inició con un inóculo de  $5 \times 10^6$  cel/mL y 15 g/L de glucosa (células máximas alcanzadas de  $6 \times 10^9$  cel/mL).

Tabla 1. Condiciones iniciales de los cultivos a evaluar

Cultivo	[So] <sup>a</sup>	[Xo] <sup>b</sup>	Factores involucrados en la esporulación	
			En fase exponencial	En fase estacionaria
B	0.15	$5.0 \times 10^6$	-	Limitación nutricional
M	15.00	$5.0 \times 10^6$	-	Limitación nutricional
				Densidad celular
				Metabolitos producidos en fase exponencial
A	0.15	$1.5 \times 10^9$	Densidad celular	Limitación nutricional
				Densidad celular

<sup>a</sup> Sustrato-Glucosa inicial en g/L

<sup>b</sup> Densidad celular inicial en cel/mL

Se siguió el crecimiento celular, la esporulación y la producción de lipopéptidos (surfactina y bacilomicina); además, se planteó un análisis de expresión génica de los principales genes involucrados en la esporulación, para lo que se eligieron tres momentos de muestreo o “momentos metabólicos” (Figura 8) de cada condición de cultivo:

- Muestra 1: a la mitad de fase exponencial, en el caso del cultivo A inmediatamente después de inocular.
- Muestra 2: una hora después de agotada la glucosa, momento crucial en el que se presenta la limitación nutricional.
- Muestra 3: cuando el cultivo presentase 30% de esporas, garantizando la existencia de células en las primeras etapas de esporulación.

Finalmente se recurrió a la estadística para discernir entre efectos significativos.

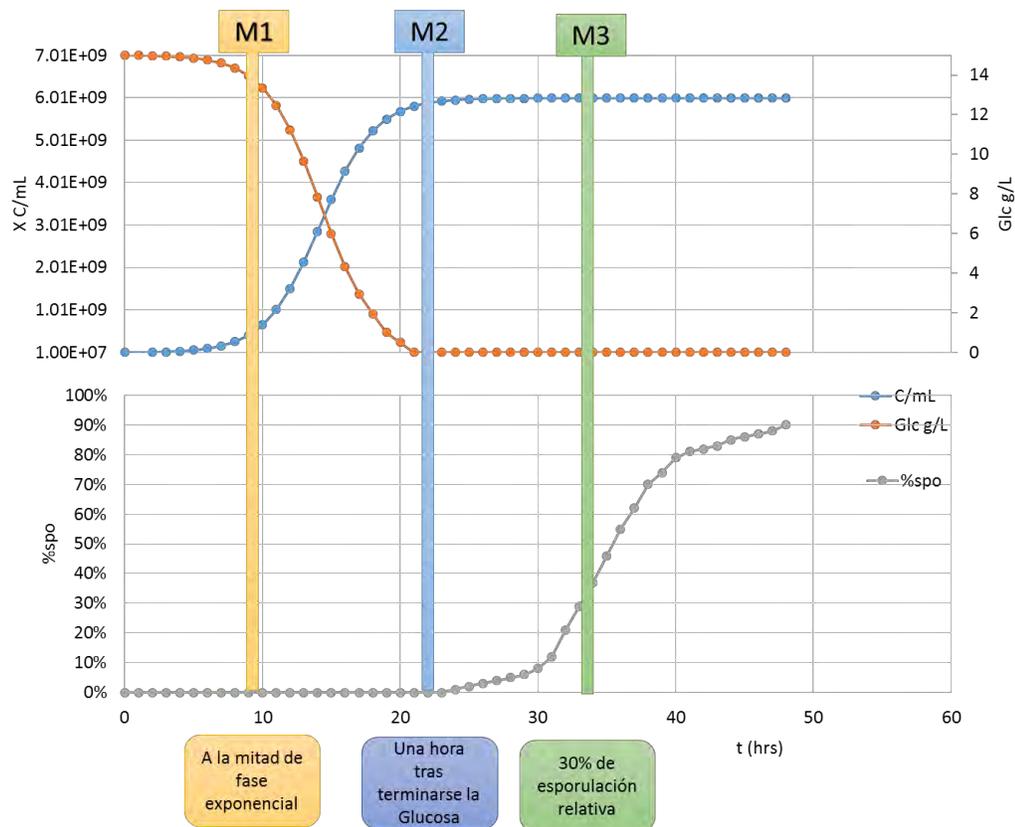


Figura 8. Diagrama de toma de muestras para RTqPCR. La cinética representa una simulación de un cultivo lote con 15g/L de glucosa y un inóculo de  $1 \times 10^7$  cel/mL.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Microorganismo

La cepa de interés es *Bacillus amyloliquefaciens* 83 (Figura 9). Originalmente aislada de la filosfera de plantas de mango por el Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo A. C. (Unidad Culiacán).

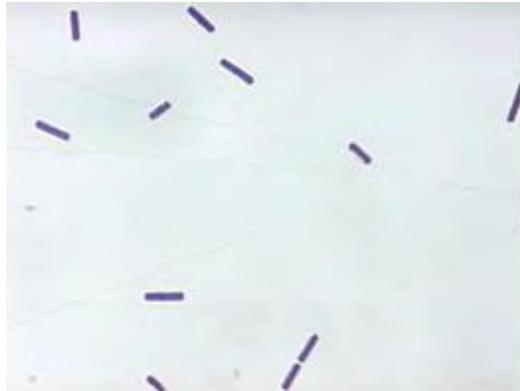


Figura 9. *Bacillus amyloliquefaciens* 83 al microscopio, 100X.

### 6.2 Medios de cultivo

#### 6.2.1 YPG

El medio YPG (Tabla 2), se utilizó en la reactivación de la cepa (de glicerol 40%) y para la generación de inóculos. En este medio no se ajustó el pH.

Tabla 2. Composición del medio YPG

Componente	Concentración (g/L)
Extracto de levadura	10
Peptona	10
Dextrosa	10
Agar (YPG Sólido)	15

### 6.2.2 Medio mineral

Se utilizó el medio mineral (Cristiano, 2012) en la conservación de cepa y en los cultivo lote.

Para la elaboración del medio se preparó una solución con el sulfato de amonio y los fosfatos de potasio, pH ajustado a 7.2 con NaOH 2N. Las sales y la glucosa se esterizaron individualmente, y se añadieron bajo condiciones estériles.

La esterilización de cada solución se realizó en autoclave a 121°C por 20 min.

Tabla 3. Composición del medio mineral

Componente	Concentración (g/L)
<b>Glucosa</b>	[0.15 – 15]
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	6.290
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	2.660
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	3.200
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	0.635
<b>MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O</b>	0.032
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0.170
<b>FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	0.080

### 6.3 Conservación y activación de cepa

La cepa se conservó en glicerol al 40%, en forma de esporas. Para lo que se cultivó en medio mineral (48h, 30°C, 200 rpm) y, en condiciones de esterilidad, se adicionaron a un vial criogénico 0.5 mL de cultivo y 0.5 mL de glicerol (80% estéril), tras lo que se congeló en hielo seco y almacenó a -20°C.

Para la reactivación de la cepa, en condiciones estériles, se estrió una asada de la cepa conservada en glicerol sobre medio YPG, la cual se incubó por 12h a 30°C.

#### 6.4 Preparación de inóculos

A partir de la cepa reactivada en medio sólido, se inocularon 50 mL de YPG (matraz de 500 mL). Se incubó por 12 h, a 30°C y 200 rpm. Para obtener las células lavadas, se colocó en tubos falcón de 50 mL y centrifugó (10 minutos, 6000 rpm), se re suspendió en la mitad de volumen (25 mL) de medio mineral estéril. Se cuantificó mediante cuenta total en cámara de Neubauer y se calculó el volumen necesario para el inóculo preestablecido (Tabla 1).

Para los cultivos A, se partió de 3 inóculos como los descritos previamente sin lavar, con los que se sembraron 1.5 L (volumen igual al de trabajo) de YPG, distribuidos en 3 matraces Fernbach que contenían 0.5 L de medio cada uno, se incubaron a 30°C, 200rpm por 12 h. EL volumen total se lavó e inoculó sin cuantificar (la densidad alcanzada se halló entre  $1.6-1.8 \times 10^9$  cel/mL)

#### 6.5 Condiciones de cultivo

Los cultivos B y M se llevaron a cabo en biorreactores de 14 L de volumen nominal y 10 L de volumen de trabajo (*Brunswick Scientific*, modelos *Labroferm* y *Microferm*, Figura 10). Estos reactores cuentan con 3 turbinas *Rushton* de 6 paletas ( $D/T=0.5$ ) y diámetro de 0.105 m.

El cultivo B se mantuvo una agitación de 109 rpm, lo que permitió que la tensión de oxígeno disuelto (TOD) estuviese por encima del 15%. Mientras que el cultivo M se controló de manera manual entre 109 y 600 rpm, con objeto de evitar la disminución de TOD (>15%); a pesar de ello, el sistema no permitió el control fino de esta variable, ya que el rango de agitación no permite superar las 600 rpm y no se contó con un sistema de inyección de oxígeno. (Anexo 1)



Figura 10. Biorreactor Microferm de 14 L.

Mientras que los cultivos A se realizaron en biorreactores de 3 L de volumen nominal (*Dusher*, Figura 11). Dicho reactor cuenta con 3 turbinas *Rushton* de 6 paletas ( $D/T=0.33$ ) y diámetro de 0.05 m. La agitación se controló de manera manual entre 200 y 400 rpm, evitando la disminución de TOD ( $> 15\%$ ). (Anexo 1).

En todos los cultivos aplicó una aireación de 1vvm y se contó con control automático de pH por adición de NaOH a 2N y de antiespumante (30% p/v). Cada condición se llevó a cabo por triplicado.



Figura 11. Biorreactor Dusher de 3L.

## 6.6 Métodos analíticos

### 6.6.1 Cuantificación de células totales

La cuantificación de células totales (sin distinción de tipos celulares, ni viabilidad) se llevó a cabo mediante conteo directo al microscopio, utilizando una cámara de Neubauer, la cual permite una cuenta directa con respecto a un volumen constante.

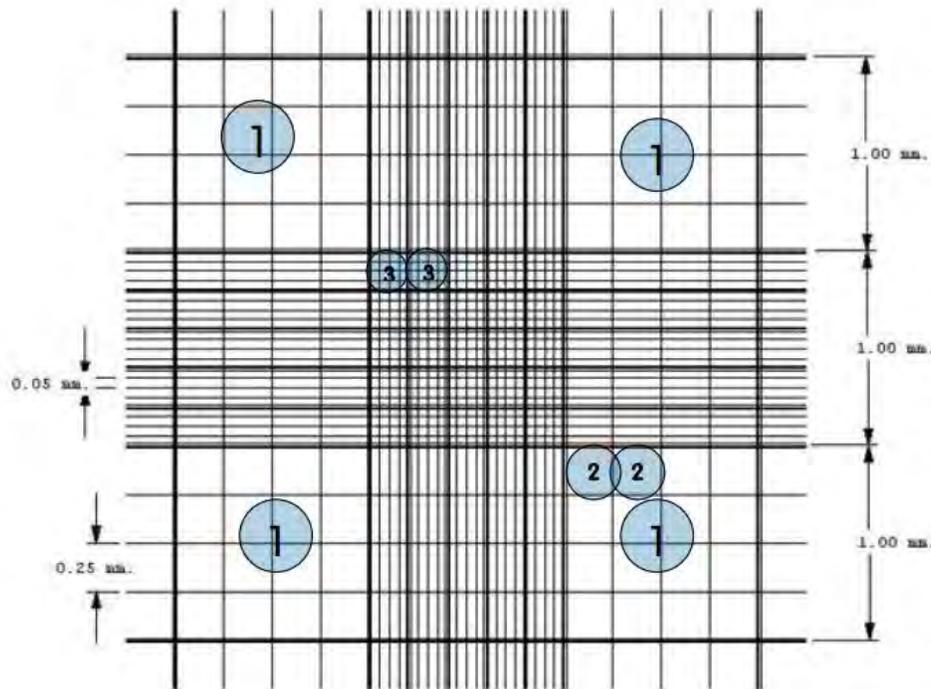


Figura 12. Representación de los cuadrantes de la cámara de Neubauer. Para la cuantificación de bacterias se usó el cuadrante 3, cuyo volumen corresponde a  $0.004 \text{ mm}^3$ .

La muestra homogénea (se realizaron diluciones en caso de ser necesarias) se colocó en el centro de la cámara y se cubrió con el cubre objetos, tras lo que se dejó reposar unos minutos. Se ubicó la cámara de Neubauer sobre el microscopio y se enfocó con el objetivo de 40X, localizando el cuadro central de la rejilla (en la figura 12 se representa por el número 3 y contiene 25 cuadrantes de  $0.004 \text{ mm}^3$ ), se realizó un acoplamiento a un sistema de cómputo y adquisición de imágenes, el cual permite amplificar y digitalizar la imagen de la cámara de *Neubauer*, con el software *Image Pro Plus 4.1 Media Cybernetics, MS, U.S.* Finalmente se realizó el conteo celular (4 cuadrantes) y la concentración celular se calculó mediante la Ecuación 1.

Ecuación 1

$$\frac{\text{cel}}{\text{ml}} = \frac{\text{Promedio de células por cuadrante}}{0.004\text{mm}^3/1000} \times \text{Factor de dilución}$$

### 6.6.2 Cuantificación de glucosa residual

Las células se separaron del caldo de cultivo mediante centrifugación (12000 rpm, 3 min.). En el sobrenadante se determinó la glucosa residual en un analizador *Yellow Spring Instruments* (YSI). El método YSI se basa en la oxidación de la glucosa mediante la enzima glucosa-oxidasa, que se encuentra inmovilizada en una membrana en el sensor y cuyo producto de reacción, peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), es cuantificado y es proporcional a la concentración de glucosa.

### 6.6.3 Determinación de % de esporulación

Las endoesporas al ser formas de resistencia altamente deshidratadas y con cubiertas poco permeables son difíciles de teñir, excepto si se calienta la preparación para permearlas. Este es el principio en el que se basa la tinción de Schaeffer y Fulton, la cual emplea verde de malaquita como colorante primario y como colorante de contraste safranina. Para el análisis de las muestras se usó una variación de la tinción de Schaeffer y Fulton, en la cual se sustituyó la safranina por fucsina fenicada diluida (0.1%), la cual demostró permitir un mayor contraste célula-espora (Soriano, 2013).

Dependiendo de la concentración celular se usaron diluciones ( $DO < 0.3$ ), se lavaron las células con solución salina 2 veces. En un portaobjetos se colocaron 40  $\mu$ l de la muestra, y se fijó sobre una parrilla eléctrica a 55°C. Posteriormente, la muestra se cubrió con verde de malaquita al 5% (solución filtrada a 0.45  $\mu$ m) y se colocó sobre un baño de vapores de agua durante 15 minutos, cuidando que el colorante no se secase ni hirviese. El portaobjetos se dejó enfriar por un par de minutos, posteriormente se enjuagó con abundante agua destilada. Se secó y se añadió fucsina fenicada durante 5 minutos. Se enjuagó con agua y se secó. (Soriano, 2013).

Finalmente se adquirieron 15 fotografías con el software *Image Pro Plus 4.1 Media Cybernetics, MS, U.*, que esta acoplado a un microscopio óptico (aumento 100X).

Se cuantificaron manualmente, difiriendo entre esporas-verdes y células vegetativas-rosas (Figura 13). A partir de dichos valores se calcula el %<sub>relativo</sub> de esporas (Ecuación 2).

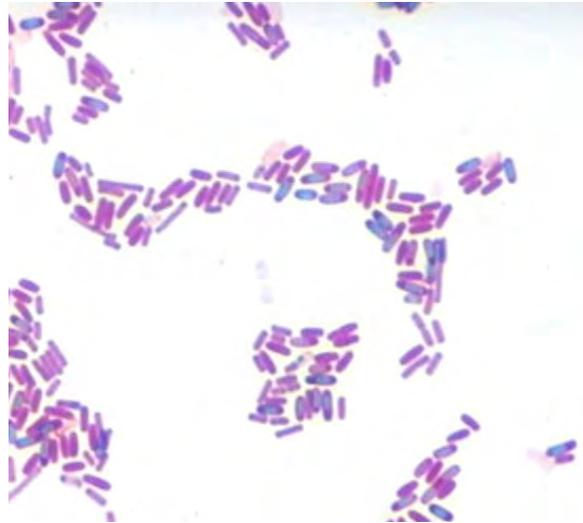


Figura 13. Tinción de esporas de *Bacillus amyloliquefaciens* 83. En verde se aprecian las esporas y en rosa las células vegetativas.

Ecuación 2

$$\%_{\text{relativo}} \text{ esporas} = \frac{\text{esporas(células verdes)}}{\text{esporas} + \text{celulas vegetativas(células rosas)}}$$

Mediante el producto del % relativo de esporas y la cuenta total de células se obtuvo el número de esporas y células en cada punto de la fermentación. Finalmente, al tiempo en que se alcanzó la máxima concentración de esporas (tf), se calcularon los % tipos celulares según las Ecuaciones 3-5.

Ecuación 3

$$\%C_{\text{esporas}} = \%_{\text{relativo}} \text{ de esporas} \times \text{Células totales}_{tf}$$

Ecuación 4

$$\%C_{\text{lisadas}} = \frac{\text{células máximas} - \text{células totales}_{tf}}{\text{células máximas}}$$

Ecuación 5

$$\%C_{\text{vegetativas}} = 100 - \%C_{\text{lisadas}} - \%C_{\text{esporas}}$$

#### 6.6.4 Determinación de lipopéptidos

Los lipopéptidos se cuantificaron mediante HPLC. Previo a la inyección de muestras fue necesario un paso de purificación, para lo que se partió de 20 a 100 mL de caldo de cultivo (dependiendo de la densidad celular), mediante centrifugación (15 min., 6000rpm) se descartó la biomasa. Del

sobrenadante se realizó una precipitación ácida a pH 2 con HCl 3N, la cual se favoreció en refrigeración por 48 h, tras lo que se centrifugó (20 min., 6000rpm, 4°C) y a partir del precipitado se realizaron extracciones con metanol (3 veces: 0.05 volúmenes por volumen inicial, 4 h., 4°C). (Cristiano, 2016).

La surfactina se cuantificó usando una columna AXILENT-ZORBAX RXC8 (4.6x115mm) a 30°C. Como fase móvil se usó mezcla 15:85 v/v de agua (1% de ácido trifluoroacético) y acetonitrilo (1% de ácido trifluoroacético), a un flujo de 0.5 mL/min. La absorbancia se monitoreó a 200 nm y la muestra inyectada correspondió a 50 µL. Como estándar se usó un estándar comercial de surfactina de Sigma (Anexo 6) (Cristiano, 2016; Luna, 2015).

Por otro lado la bacilomicina se cuantificó con la columna MACHEREY-NAGEL Nucleosil C18 (250x4mm) a 30°C. Como fase móvil se usó mezcla 55:45 v/v de agua (1% de ácido fórmico) y acetonitrilo (1% de ácido fórmico), a un flujo de 1 mL/min. La absorbancia se monitoreó a 200 nm y la muestra inyectada corresponde a 20 µL. Como estándar se usó un bacilomicina D purificada (C14- 1044 Da) de *Bacillus amyloliquefaciens* 83 (Anexo 6) (Luna, 2015).

#### 6.6.5 Determinación de acetoína, 2,3-butanodiol y ácido acético.

Estos metabolitos se cuantificaron en el sobrenadante de caldo de cultivo, para lo cual únicamente se eliminó la biomasa de 1 mL de caldo de cultivo en una micro centrifuga (3 min., 12000 rpm).

La detección se realizó mediante HPLC con una columna de ácidos orgánicos AMINEX HPX-87H empacada con una resina de estireno-divinilbenceno (7.8x300nm) a 40°C. Como fase móvil se usó ácido sulfúrico 5mM. La absorbancia se monitoreó a 210 nm con un detector de índice de refracción marca Waters serie 2414. La muestra inyectada correspondió a 20µL. Como estándar se usaron concentraciones conocidas de estándares comerciales (Anexo 6).

## 6.7 Análisis de expresión génica

Actualmente es posible cuantificar la expresión génica mediante técnicas de PCR cuantitativa en tiempo real. El presente proyecto consideró el análisis de la expresión de genes involucrados en la diferenciación celular bajo diferentes condiciones fisiológicas.

Para los cultivos M y A se tomaron 10 mL de muestra, mientras que para los cultivos B se tomaron 100 (Muestra 2 y 3) y 150 mL (Muestra 1). Para la conservación de las muestras se adicionó 1 mL de *RNA later* (Ambion, Cat. No. AM7024), homogeneizó, centrifugó y conservó la pastilla a -70°C.

### 6.7.1 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron diseñados con el programa *Primer Express* (Applied Biosystems, Foster City, CA), sobre las secuencias del genoma de *B. amyloliquefaciens* 83. La longitud de los oligos está entre 19 y 25 pb y fueron diseñados para amplicones de 69 pb.

Los oligonucleótidos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Tabla 4. Oligonucleótidos usados en RTqPCR

Oligo RTqPCR	Secuencia 5---> 3'	Oligo RTqPCR	Secuencia 5---> 3'
comXBaa	GGAGTTAGCCAGGATCAAACAGA	bmyDBaa	AAGATGGACGGAATCGATGC
comXBab	GCCGAAAGAAATAACATCTATACCCT	bmyDBab	TTCGGACCCATTTTCGATGAC
phrCBaa	TGGTTTGTATTGTTTAGCAGCC	kinABaa	ATGCCTTGACCTTTCGTCT
phrCBab	AGCCTGATCTGTCTGGCCTG	kinABab	AATTTCCACACCCGCTTCAA
srfAABaa	GGCCACTCGTTAGCGGG	kinBBaa	TTTTTCAAGTCAGCGCCCTT
srfAABab	TTAAGGTAAGCTGCACGCCG	kinBBab	GCATGGACGCATTCTCATCA
hupABaa	AATCCAACCTGATCGTTTCGG	kinCBaa	AGCTGAAGGACAGCGAGCAG
hupABab	TGCGGGTTACGTCCTTTACG	kinCBab	GCAGATTGTCCATGATCCGG
spolIABaa	CGTCACATCGTGCTGAACCT	kinDBaa	GTCAAAGGAAAAAGGCACCG
spolIABab	CCCTAAAATCACGCCGAGG	kinDBab	GAACCGCCGTACATCAGCAT
epsABsa	GTCTGAGGCAAAGCATCGG	kinEBaa	CGATTAAGCTTGACAGCGGC
epsABsb	AAGCCATCACGATATTCCG	kinEBab	AATCCTCCCAATTCCGTCT
comKBsa	CCAGAAAACACACGCCCT	pgsABsa	AGCAATGTGATGCGCGGAG
comKBsb	TCCTCAGGCAAACAGCGAT	pgsABsb	ATTCGATCGGTTCCAGCAC
spoABsa	GAATCCTCGGCAGCATCAC	spoABsb	GCTTGCGGTCGTGTTGAATT

La última letra en el nombre del oligo determina su direccionalidad, a=directo, b=reverso

### 6.7.2 Extracción de RNA

La extracción de RNA total se llevó a cabo mediante el método de fenol caliente equilibrado con agua (Flores et al, 2005). Para llevarlo a cabo: se re suspendió la muestra en 1 mL de Buffer I (0.3 M sacarosa, 0.1 M acetato de sodio y 15 mg/mL de lisozima) e incubó 16 minutos a temperatura ambiente. Tras lo que se adicionaron 2 mL de Buffer II (0.01 M acetato de sodio, 2% de SDS), se homogenizó e incubó por 3 minutos a 70°C. Se adicionaron 2 mL de fenol caliente e incubó 3 minutos a 70°C, después se transfirió a hielo por 5 minutos, tras lo que se centrifugó (4500 rpm, 15 min.) y se recuperó la fase acuosa. Se realizaron extracciones orgánicas consecutivas, una con fenol caliente, una con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y dos más con cloroformo, donde se adicionan 2 mL de fenol/cloroformo/mezcla, se homogenizó, centrifugó (4500 rpm, 15 min.) y recuperó la fase acuosa. Luego se precipitó el RNA, adicionando acetato de sodio 3M y etanol (0.1 y 2.5 volúmenes de la fase acuosa recuperada, respectivamente), se centrifugó (4500 rpm, 15 min.) y descartó el sobrenadante. Finalmente se re suspendió en agua libre de nucleasas y conservó a -70°C.

Se corroboró la integridad del RNA mediante electroforesis, en un gel de agarosa (1.2%) en Buffer MAE (MOPS 0.2M, EDTA 0.01M y acetato de sodio 0.05M), y se cuantificó mediante espectrofotometría en un Nanodrop (*Thermo Scientific*).

### 6.7.3 Síntesis de cDNA

Tras la extracción, se eliminó el DNA, para lo cual se usó *TURBO DNA-free™ Kit (Ambion, Cat. No. AM1907)*, se siguieron las instrucciones del fabricante en muestras de 4-5 µg de RNA total.

La síntesis de cDNA se llevó a cabo por el método de la síntesis de la primera cadena de DNA a partir de la muestra obtenida del paso previo, y una mezcla de 10 pmol/µL de los oligonucleótidos reversos de la Tabla 4, para ello se siguieron las instrucciones del fabricante del *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Cat., No. K1631)*. Durante el proceso se realizó un control de la ausencia de DNA, reacción que no incluyó la reverso transcriptasa. El cDNA se conservó a -20°C, y se usó como templado para los ensayos de RTqPCR.

#### 6.7.4 RTqPCR

Los ensayos de RTqPCR se realizaron en multicámaras de 96 pozos en un termociclador *C1000 Thermal Cycler CFX96 Real Time System (Bio-Rad)*.

Cada reacción de 10  $\mu$ L se llevó a cabo por duplicado (variación < 0.3), con 10 pmol de cada oligo y aproximadamente 50 ng de cDNA. Se usó *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, Cat. No. K0221)*. En cada experimento, por cada gen analizado se sometieron al mismo procedimiento controles negativos sin templado de DNA para excluir o detectar cualquier posible contaminación.

Las condiciones de PCR (Figura 14) fueron: 95°C por 3 min.; seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 seg. y 55°C por 1 min.; 65°C por 5 seg. y 95°C por 15 seg. La adquisición de datos se realizó mediante el programa *CFX MANAGER Software 3.0 (Bio-Rad)*.

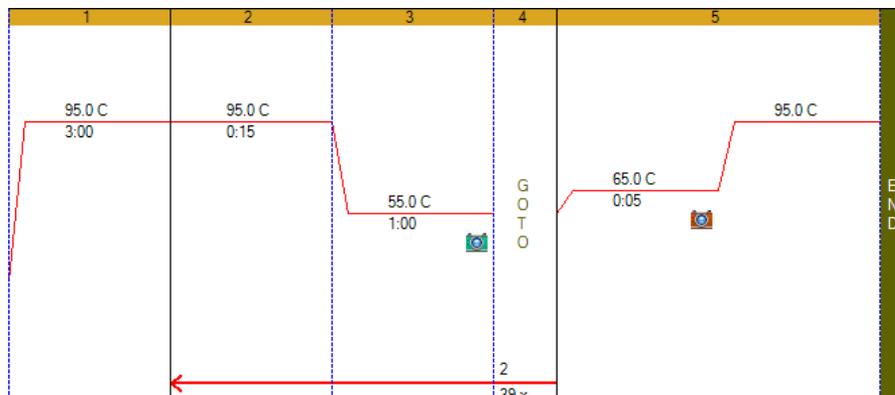


Figura 14. Programa de PCR usado en el protocolo de RTqPCR.

Para analizar los datos, mediante los Ct (Ciclo umbral-*threshold cycle*), se utilizó el método  $2^{-ddCt}$ . (Ecuación 6) (Livak & Smittgen, 2001).

Ecuación 6

$$ddCt = (Ct_{genX} - Ct_{gen\ de\ referencia})_{condición\ A} - (Ct_{genX} - Ct_{gen\ de\ referencia})_{condición\ control}$$

## 6.8 Análisis estadístico

Para discernir diferencias significativas, se recurrió al análisis estadístico, bajo el soporte del programa *Sigma Plot V. 12.1, Systat Software Inc.* En todo análisis se consideró un nivel de confianza del 95% ( $\alpha=0.05$ ).

Para las variables cinéticas se aplicó un análisis ANOVA unifactorial, con una prueba de Tukey para discernir entre muestras. En caso de ser únicamente dos variables se optó por una prueba de t-student. Mientras que para el análisis de expresión génica se eligió un ANOVA de dos factores con la prueba de Tukey, que sigue el modelo de la Ecuación 7, el cual incluye: el efecto del factor A (condiciones de cultivo), el efecto del factor B (“momento metabólico” de la toma de muestra), el efecto de la interacción de los factores y el error aleatorio (Toutenburg & Shalabh, 2009; Box et al, 1978).

*Ecuación 7*

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk},$$

$(i = 1, \dots, a, j = 1, \dots, b, k = 1, \dots, r).$



cuya influencia en el proceso de esporulación no ha sido estudiada a fondo, pero se sabe está relacionada a cinasa KinC (Xu et al, 2012).

Tabla 5. Identidad de genes involucrados en la señalización y diferenciación de *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*. Realizada en BLAST.

Gen-Proteína BLAST	Ba 83 vs Ba FZB42 <sup>a</sup>		Ba 83 vs Ba SQR9 <sup>b</sup>		Ba 83 vs Bs 168 <sup>c</sup>	
	%N <sup>d</sup>	%P <sup>e</sup>	%N	%P	%N	%P
phrC	100.0	97.0	98.3	97.0	73.2	70.0
comA	99.0	99.0	99.0	99.0	79.8	86.0
kinA	97.0	97.0	99.3	99.0	76.5	81.0
kinB	99.5	99.0	98.6	98.0	52.5	63.0
kinC	99.0	99.0	98.8	99.0	31.7	74.0
kinD	99.6	99.0	99.1	99.0	65.2	76.0
kinE	98.8	99.0	99.1	99.0	69.3	80.0
spo0F	99.7	100.0	99.4	100.0	82.1	96.0
spo0B	99.6	99.0	99.3	99.0	80.4	79.0
spo0A	98.8	99.0	99.5	99.0	83.1	95.0
comX	45.4	40.0	98.8	100.0	30.0	27.2
comP	56.5	69.0	98.6	99.0	47.1	54.0
comQ	42.8	37.0	99.0	99.0	46.8	43.0
srfaA	98.0	99.0	98.0	99.0	75.0	76.0
comK	99.4	99.0	99.8	100.0	77.7	82.0
abrB	99.6	100.0	99.3	100.0	90.0	99.0
rapC	99.5	99.0	99.2	99.0	77.5	82.0
spolIIA	99.4	100.0	99.7	100.0	79.6	91.0
degU	99.2	99.0	98.9	99.0	86.2	99.0
epsA	98.6	98.0	99.0	99.0	69.6	65.0

a Comparación entre los genes/proteínas de *B. amyloliquefaciens* 83 y *B. amyloliquefaciens* FZB42

b Comparación entre los genes/proteínas de *B. amyloliquefaciens* 83 y *B. amyloliquefaciens* SQR9

c Comparación entre los genes/proteínas de *B. amyloliquefaciens* 83 y *B. subtilis* 168

d % de identidad nucleotídica

e % e identidad proteica

En la Tabla 5, está representada la identidad nucleotídica y proteica de los genes/proteínas que participan en la señalización de diferenciación a esporas. La identidad esta presentada entre las cepas más estudiadas de *B. amyloliquefaciens* y con el modelo celular *B. subtilis* 168. La mayor diferencia, en los alineamientos con *B. subtilis* 168, es del operón *comXQ*, que se ha reportado difiere entre especies (Perego et al, 1997), el resto de los genes/proteínas tienen una alta identidad (65-96%).

## 7.2 Cinéticas de crecimiento, esporulación y lisis

El cultivo M sigue el principio de un cultivo “estándar” de *B. amyloliquefaciens* 83, donde se presenta una fase de crecimiento (producción de células vegetativas) y una fase estacionaria (tras agotarse la glucosa las células se diferencian en esporas), cultivo donde la esporulación se ve influenciada por la alta densidad celular y la limitación nutricional; pero con dos diferencias: la primera contempló la disminución de la concentración celular inicial, para lo que se inoculó con dos órdenes de magnitudes menos de células:  $5 \times 10^6$  cel/mL, el restablecimiento del inóculo permitiría compararlo con el cultivo B que inicia a la misma densidad celular; y la segunda, probablemente la más importante, consistió en el uso de células lavadas para inocular los biorreactores, ésta consideración se aplicó (para éste y el resto de los experimentos) ya que en el grupo de investigación se ha observado que la eliminación del sobrenadante del pre cultivo permite la reproducibilidad entre cultivos, probablemente se relacione con los metabolitos que se encuentren en el caldo de cultivo de un medio rico, fenómeno que aún no se ha estudiado. Cabe destacar que el trabajo de Cristiano, en el 2012, usaba inóculos a mayor densidad ( $>1 \times 10^8$  cel/mL) y no eran lavados, por lo que no se descarta que lo observado se deba a la influencia del inóculo.

El cultivo B se planteó con objeto de evaluar la esporulación en una condición donde no interviniese la densidad celular; para ello, de manera preliminar se planteó alcanzar una densidad máxima celular de  $1 \times 10^8$  cel/mL, con condiciones iniciales  $1 \times 10^7$  cel/mL y 0.5 g/L de glucosa, los resultados expusieron que no se presentaban diferencias significativas en la esporulación con respecto al cultivo M, por lo que consideramos que a partir de esta densidad celular se tiene un efecto de la densidad celular en la esporulación de *B. amyloliquefaciens* 83 (datos no reportados en el presente trabajo). Por lo que se eligió disminuir el inóculo y la concentración inicial de sustrato limitante a  $[X_0]=5 \times 10^6$  cel/mL y  $[S_0]=0.15$  g/L, condiciones en las que la máxima concentración celular alcanza  $5-6 \times 10^7$  cel/mL, a esa densidad celular se observó un patrón diferente de esporulación. La Figura 16 muestra que la aparición de esporas se retrasó 10 horas con respecto al cultivo M, tras agotada la fuente de carbono; este cultivo se siguió por 65 horas, para garantizar que no hubiese cambios en la esporulación, pero la máxima concentración de esporas se alcanzó alrededor de las 48 horas.

Tras observar los patrones de esporulación de los cultivos M y B, surgió la idea de diferenciar entre una alta densidad celular alcanzada tras una fase de crecimiento y una alta densidad que no presentase una fase de crecimiento (expuesta a limitación nutricional de manera casi inmediata); con ello podríamos separar el efecto de la alta densidad celular y de las moléculas producidas a alta densidad celular, ya que al introducir una limitación inmediata por fuente de carbono, la generación de metabolitos se vería muy limitada. Para ello, se propuso una densidad inicial de  $1 \cdot 2 \times 10^9$  cel/mL y 0.15 g/L de glucosa.

En la figura 16, podemos observar las cinéticas de concentración celular, aparición de esporas y consumo de glucosa de los cultivos B, M y A. Las densidades celulares alcanzadas de cada cultivo son diferentes ( $6.5 \times 10^7$ ,  $6.7 \times 10^9$  y  $1.7 \times 10^9$  cel/mL respectivamente), también lo son la duración de la fase de crecimiento en cada condición, que para el caso del cultivo a baja densidad celular (B) toma 10 horas, para el cultivo estándar (M) alrededor de 20 horas, y para el de alta densidad celular (A) no hay aumento en la concentración celular y el sustrato se agota en menos de veinte minutos.

Uno de los fenómenos observados en los tres cultivos es el decaimiento de la cuenta celular, que sin importar la condición, se presenta tras agotada la glucosa, lo cual se ha reportado también para cultivos lote de *Bacillus subtilis* (Siebring et al, 2014); aparentemente el decaimiento celular se presenta más rápido a alta densidad celular.

Con respecto a la esporulación, en la figura 16, se observan dos hechos: no se visualizan esporas previo al agotamiento de glucosa, aunque dicho comportamiento solo podía esperarse en el cultivo estándar, además la primera espora se visualiza al menos 8 horas después de agotada la fuente de carbono (en el cultivo estándar-M), que concuerda con lo reportado en la bibliografía, que menciona que el proceso en que se alcanza una espora madura toma entre 6 y 8 horas (Errington, 2003), por lo que asumimos que el proceso de señalización no se presentó previo a la limitación nutricional; además la aparición de esporas se presentó de forma exponencial, aunque con pendientes diferentes, en las tres condiciones estudiadas.

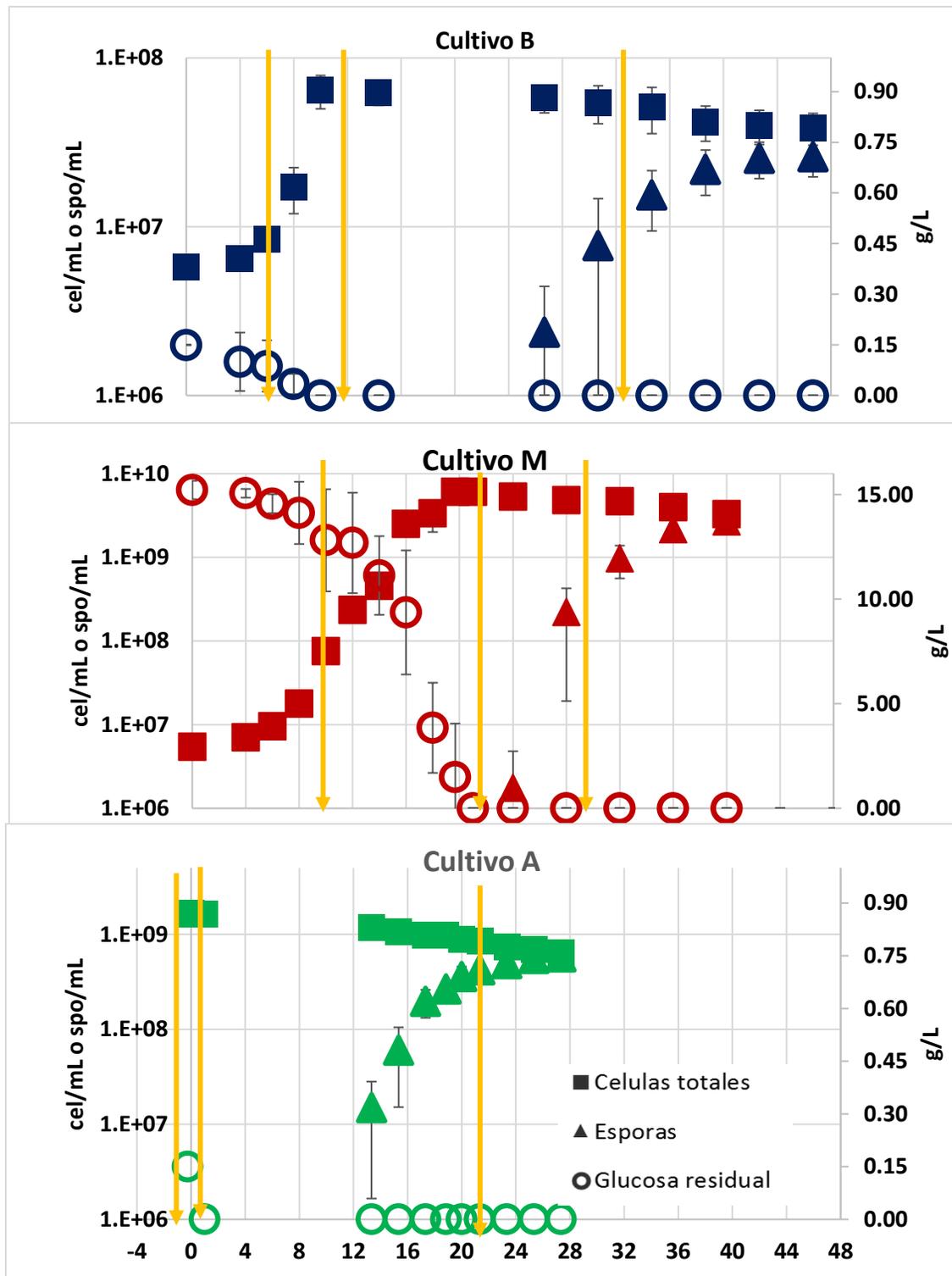


Figura 16. Cinéticas de crecimiento celular, aparición de esporas y glucosa residual de los cultivos B, M y A, tienen representada la desviación estándar entre repeticiones de cultivos. Las líneas amarillas indican los momentos de toma de nuestra para análisis de expresión génica.

En la Figura 17 es posible analizar el tiempo que toma la esporulación en cada condición de cultivo, a partir del momento en que se agotó la glucosa; periodo que se dividió en dos: el tiempo que se presenta la fase exponencial de aparición de esporas (representado en barras anaranjadas) que concluye al tiempo en que se alcanza la máxima concentración de esporas ( $t_f$ ) e inicia al visualizar las primeras esporas; y el tiempo que tarda en visualizarse la primera espora (en barras azules) tras agotado la glucosa ( $t_{G0}$ ).

El cultivo estándar y el que inicia a alta densidad celular (M y A), alcanzaron concentraciones celulares del mismo orden de magnitud ( $1-6 \times 10^9$  cel/mL), y entre ambos no existen diferencias significativas en el tiempo que comprende la aparición exponencial de esporas (alrededor de 11 horas), representado en barras naranjas; mientras que para dos órdenes de magnitud por debajo de células ( $6 \times 10^7$  cel/mL en el cultivo B) éste periodo se extiende por 20 horas; por lo que los datos sugieren que el periodo de aparición exponencial de esporas dependería de la densidad celular del cultivo.

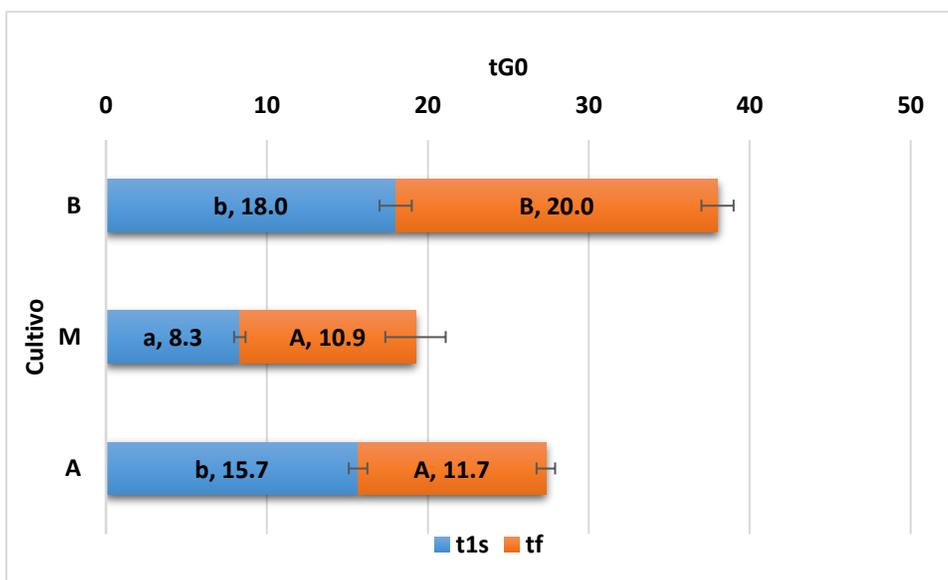


Figura 17. Tiempo que toma la esporulación a partir del agotamiento de glucosa ( $t_{G0}$ ). En azul el tiempo que toma visualizar la primera espora ( $t_{1s}$ ) y en naranja el tiempo en que alcanza la máxima concentración de esporas ( $t_f$ ). El grafico representa la desviación estándar entre repeticiones. En cada barra se encuentra el valor numerico y al analisis estadistico representado por letra. Se aplicó ANOVA y prueba de Tukey al 95% de confiabilidad.

Por otro lado, en cultivo estándar (M), el tiempo que toma visualizar la primera espora (barras azules) requiere la mitad o menos del tiempo que las otras dos condiciones, lo que podría estar relacionado a la acumulación de moléculas de señalización producidas cuando el sistema aún

cuenta con glucosa. En los otros dos casos: a alta densidad celular (A) se esperaría una mínima o nula producción de moléculas de señalización y a baja densidad celular (B) se esperaría que la producción de estas moléculas fuese despreciable. Asumiendo que se cumpliera la premisa de que existiese una mínima influencia por parte de las moléculas de señalización en ambos cultivos, se demostraría que la densidad celular por sí misma no tiene efecto en el tiempo de decisión de la célula a diferenciarse a espora, a diferencia de lo reportado (Grosman & Losick, 1988), y serían las moléculas de señalización producidas a alta densidad celular en condiciones de no limitación nutricional, y no la densidad celular, las responsables de la disminución del tiempo que toma la esporulación.

### 7.2.1 Crecimiento celular

La Tabla 6 resume los parámetros evaluados en cada condición de cultivo y su análisis estadístico. Cada cultivo presentó diferentes concentraciones máximas de células y esporas, aunque los cultivos estándar y de alta densidad celular se encuentran en el mismo orden de magnitud.

Con respecto a la velocidad de crecimiento (Ecuación 8), para los cultivos estándar (M) corresponde a  $0.47 \text{ h}^{-1}$ , valor que concuerda con lo reportado para *B. amyloliquefaciens* 83 (Morales, 2007; Cristiano, 2012; Soriano, 2013). En el cultivo a baja densidad celular (B), el  $\mu$  es de  $0.36 \text{ h}^{-1}$ , valor estadísticamente menor, fenómeno que no se había observado en trabajos previos, y parece estar relacionado con las condiciones iniciales de cultivo. Finalmente, para los cultivos A, la glucosa se agotó 20 minutos después de inocular, por lo cual no se presentó ni un ciclo de duplicación, y probablemente la glucosa en el sistema fue usada como energía de mantenimiento.

Ecuación 8

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu t + c$$

Además, el rendimiento de células con respecto a glucosa ( $Y_{x/s}$ ) (Ecuación 9), está alrededor de  $4 \times 10^8 \text{ cel/g}$ ; valor que concuerda con lo reportado para el medio mineral (Cristiano, 2012). En el cultivo A, éste dato no está reportado debido a que no se observó un aumento en el número de células. Que no existan diferencias entre el rendimiento del cultivo a baja densidad celular y del cultivo estándar (Tabla 6), sugiere que la fase de crecimiento de ambos cultivos no presentan diferencias, y por lo tanto a baja densidad celular también podrían haberse acumulado

metabolitos y moléculas de señalización, aunque su concentración sería representativamente menor.

Ecuación 9

$$Y_{x/s} = \frac{\text{celulas generadas}}{\text{gr. de Glucosa consumida}}$$

Tabla 6. Resumen de condiciones y parámetros cinéticos de cultivos B, M y A.

Cultivo/Parámetro	B			M			A		
$[X]_{\max}^a$	$6.5 \times 10^7 \pm 1.4 \times 10^7$	A <sup>h</sup>	$6.7 \times 10^9 \pm 2.6 \times 10^8$	C	$1.7 \times 10^9 \pm 2.5 \times 10^8$	B			
$[Spo]_{\max}^b$	$2.6 \times 10^7 \pm 6.3 \times 10^6$	A	$2.7 \times 10^9 \pm 2.5 \times 10^8$	C	$5.8 \times 10^8 \pm 2.6 \times 10^7$	B			
$Y_{x/s}^c$	$4.0 \times 10^8 \pm 9.0 \times 10^7$	A	$4.4 \times 10^8 \pm 2.2 \times 10^7$	A	NA <sup>g</sup>				
$\mu^d$	$0.36 \pm 0.02$	A	$0.47 \pm 0.02$	B	NA				
$\mu_{spo}^e$	$0.10 \pm 0.02$	A	$0.34 \pm 0.05$	B	$0.36 \pm 0.09$	B			
$q_{spo}^f$	$0.011 \pm 0.001$	A	$0.022 \pm 0.004$	B	$0.013 \pm 0.002$	A			

<sup>a</sup> Concentración celular máxima alcanzada en cel/mL.

<sup>b</sup> Máxima concentración de esporas en spo/mL.

<sup>c</sup> Rendimiento de células con respecto a sustrato (gr. de glucosa) en cel/g (Ecuación 9)

<sup>d</sup> Velocidad de crecimiento en h<sup>-1</sup> (Ecuación 8)

<sup>e</sup> Velocidad exponencial de esporulación, en h<sup>-1</sup> (Ecuación 10)

<sup>f</sup> Velocidad específica de esporulación, en cel/spo\*h (Ecuación 11)

<sup>g</sup> NA=No Aplica, debido a que no se observó aumento en la cantidad de células.

<sup>h</sup> En esta posición se ubica el análisis estadístico, cuyas comparaciones se realizaron entre los datos distribuidos en forma horizontal (filas), las letras representan el grupo al que pertenecen; de esta manera A, C y B, en la concentración celular máxima, representa que los tres datos son diferentes estadísticamente entre sí. Se aplicó ANOVA con prueba de Tukey al 95% de confiabilidad.

## 7.2.2 Esporulación

La esporulación es la medida directa en la que buscamos observar diferencias para discernir entre los efectos de la limitación nutricional, densidad celular y moléculas de señalización.

En la literatura, es común encontrar las diferencias de esporulación como proporciones de esporas alcanzadas con respecto al control a un mismo tiempo, ya sea que el efecto de la adición exógena de moléculas (ComX, surfactina o CSF) o en mutantes con sobreexpresión o silenciamiento de algún(os) gen(es) involucrado(s) en la diferenciación (Magnuson et al, 1994; Solomon et al, 1996; Eswaramoorthy et al, 2009; Tojo et al, 2013). En este trabajo, se consideró que una concentración de esporas a un tiempo determinado no es el mejor parámetro para comparar los efectos de los diferentes factores en el proceso de esporulación, pues, como se observa en las Figuras 16 y 17, los cultivos alcanzan diferentes densidades celulares, cada fermentación tiene cinéticas diferentes,

y presenta periodos más cortos o largos en los que se alcanza la esporulación; por lo que, para el análisis de la esporulación, se recurrió a definir los siguientes parámetros: eficiencia de esporulación (esporas máximas con respecto a células vegetativas máximas-Ecuación 3); velocidad exponencial de esporulación (Ecuación 10), que se ajusta únicamente a la aparición exponencial de esporas; y velocidad específica de esporulación (Ecuación 11), que nos permite correlacionar la eficiencia de esporulación con el tiempo que toma el proceso desde la limitación nutricional.

Ecuación 10

$$\ln[spo] = \mu_{spo}t + c$$

Ecuación 11

$$q_{spo} = \frac{\text{esporas maximas}}{\text{Células maximas} \times (t_f - t_{GO})}$$

La Figura 18 muestra los % de distribución de células (esporas, células vegetativas y células lisadas-Ecuaciones 3-5) al último tiempo evaluado de cada fermentación ( $t_f$ ). El porcentaje de células que se diferenciaron a esporas para las tres condiciones se encuentran entre 35 y 41%, valores entre los que no se presentan diferencias significativas. En trabajos previos, éste parámetro se ha reportado entre en 28 y 29 %; la diferencia radica en los métodos usadas en cada trabajo, pues para el presente la metodología empleada no mide la viabilidad de las esporas, si no las esporas que son permeables a un colorante en condiciones de calor (Morales, 2007; Cristiano, 2012).

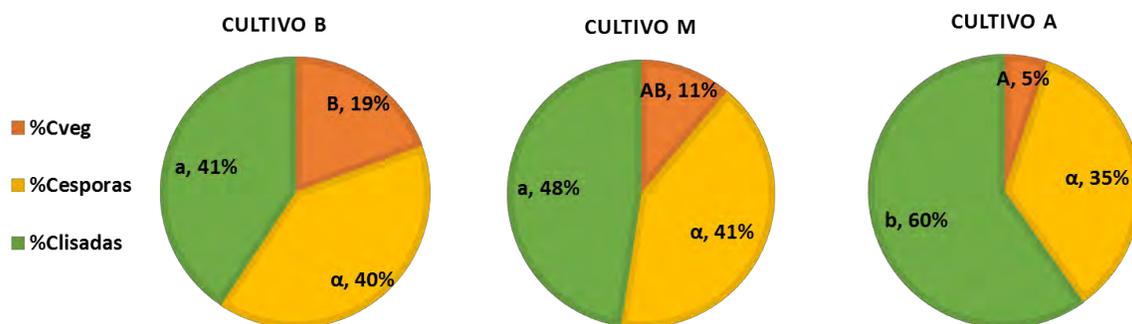


Figura 18. Distribuciones de tipos celulares a  $t_f$ . En cada fracción del grafico se encuentra el análisis estadístico representado por una letra, que indica el grupo al que pertenece, en el caso del % de esporas no hay diferencias significativas entre ningún cultivo (ANOVA, con prueba de Tukey al 95% de confiabilidad).

En un principio se esperaba ver disminuida la proporción de células que se diferenciaban a esporas en las condiciones donde se disminuyese el efecto de la densidad celular y/o de la producción de las moléculas de señalización, pero, ya que el % de esporas no varía en las tres condiciones

evaluadas, parece que la eficiencia de esporulación es independiente de la densidad celular (en las condiciones evaluadas).

La velocidad exponencial de esporulación ( $\mu_{spo}$ ) no difiere entre el cultivo estándar y el de alta densidad celular (M y A), 0.34 y 0.36  $h^{-1}$  respectivamente, pero para el cultivo de baja densidad celular,  $\mu_{spo}$  es mucho más baja: 0.10  $h^{-1}$ , por lo que la  $\mu_{spo}$  parece ser dependiente de la densidad celular; además se encontró una relación entre la velocidad exponencial de esporulación y la velocidad de decaimiento celular (lisis), discusión en la que se profundiza más adelante.

La velocidad específica de esporulación ( $q_{spo}$ ), que considera el tiempo desde la limitación nutricional ( $t_{G0}$ ) hasta que se alcanza la máxima concentración de esporas ( $t_f$ ), y presentó diferencias entre el cultivo estándar (0.022 spo/cel\*h) y los otros dos (B=0.011 y A= 0.013 spo/cel\*h, estadísticamente iguales); por lo que a diferencia de la velocidad exponencial de esporulación,  $q_{spo}$  no parece depender de la densidad celular, y probablemente esté relacionado a la respuesta ante las moléculas de señalización celular, razón por la que se evaluaron las concentraciones de los lipopéptidos surfactina y bacilomicina.

### 7.2.3 Producción de lipopéptidos

Se analizaron las concentraciones de surfactina y bacilomicina D en sobrenadante de caldos de cultivo a los mismos tiempos en que se analizó la expresión génica (M1-a la mitad de la fase exponencial, M2-una hora después de agotada la glucosa, y M3-al 30% de esporas), y una muestra al final del cultivo (MF= $t_f$ ). En las Figuras 19 y 20 se reportan las concentraciones de lipopéptidos en sobrenadante (Anexo 4) y la concentración específica, que nos permite conocer la concentración de la molécula a la que está expuesta la célula en el momento de la toma de muestra.

Con respecto a la surfactina, se encontró una diferencia de concentración al menos un orden de magnitud menor en los cultivos de alta y baja densidad celular contra la del cultivo estándar (Figura 19), lo que corrobora la menor y probablemente despreciable influencia de esta molécula en las condiciones de los cultivos A y B. También se observa que la concentración de surfactina en el cultivo estándar no incrementa tras el agotamiento de la fuente de carbono (M2), pero, la

concentración específica aumenta a lo largo de la fase estacionaria, debido a la caída de la cuenta celular.

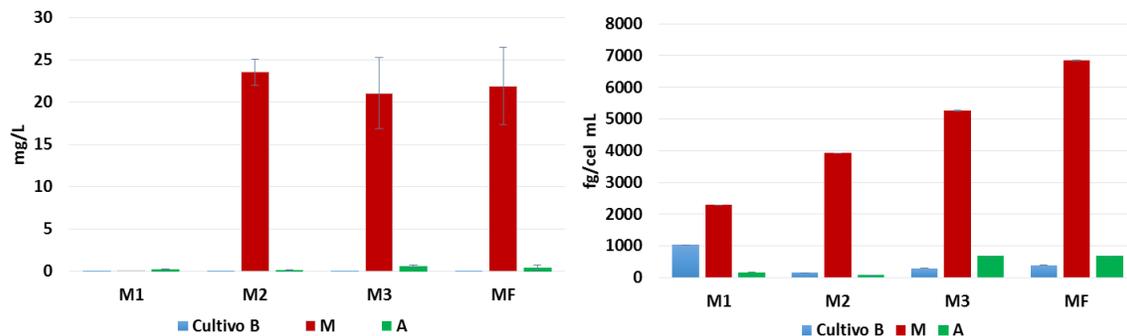


Figura 19. Cuantificación de surfactina en sobrenadante de caldo de cultivo (izquierda) y concentración específica (derecha).

Existen estudios en *B. subtilis* que reportan que la surfactina está involucrada en la fosforilación de la cinasa KinC, al causar un diferencial de concentración de iones potasio, pero su influencia se ha relacionado principalmente con la diferenciación a células productoras de matriz polimérica (López et al, 2009). Recientemente en el grupo de investigación, en cultivos quimiostato y pH-auxostato se ha encontrado relación entre la esporulación y las fluctuaciones en la concentración de surfactina en el medio, lo que sugiere que esta molécula está involucrada en la señalización del inicio de la esporulación en *B. amyloliquefaciens* 83 (Cristiano, 2016; Soriano, 2013).

Debido a que las muestras se concentran previo a la cuantificación, fue posible detectar concentraciones muy bajas de ambos lipopéptidos, sin embargo, no fue posible detectar bacilomicina D en las primeras muestras de los cultivos B y A, y para las últimas muestras son valores órdenes de magnitud por debajo de las encontradas en el cultivo estándar; probablemente la influencia de la bacilomicina en la diferenciación también sea despreciable en las condiciones de cultivo A y B; mientras que en el cultivo M (donde influyen la densidad celular y la limitación nutricional), se alcanzan concentraciones de bacilomicina D por arriba de 30 mg/L.

A diferencia de la surfactina, en los cultivos estándar (M), hay producción de bacilomicina D durante la fase estacionaria, y cuya concentración específica aumenta en tiempos tardíos de la esporulación. A pesar de que están al menos en un orden de magnitud menor, es detectable la bacilomicina D en tiempos tardíos del cultivo que inicia a alta densidad y en la muestra final del cultivo a baja densidad, por lo que si bien se disminuyó el efecto de moléculas de *quorum sensing*, no se erradicó por completo.

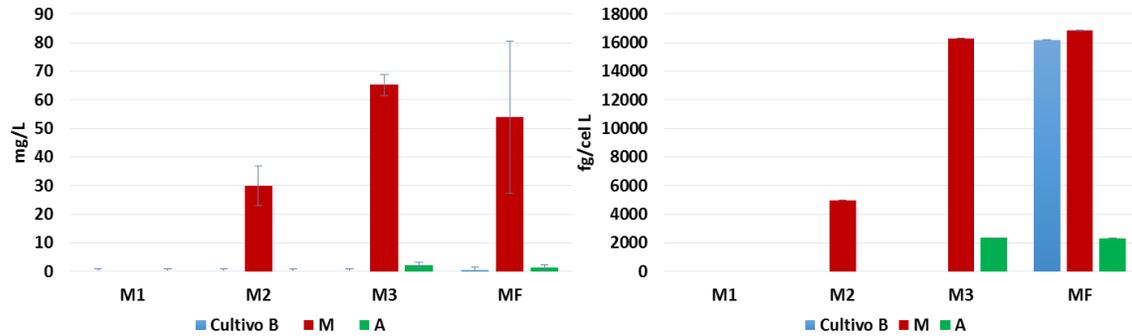


Figura 20. Cuantificación de bacilomicina en sobrenadante de caldos de cultivo (izquierda) y concentración específica (derecha).

Hay un par de reportes en cepas de *B. amyloliquefaciens* que sugieren que la bacilomicina está involucrada en la vía de diferenciación celular, pues al silenciar el gen *comA* se disminuye la producción de este lipopéptido, mientras que al silenciar la producción de bacilomicina la expresión de *kinC* también disminuye (Koumoutsis et al, 2007; Xu et al, 2012).

La bacilomicina y la surfactina, son los principales lipopéptidos estudiados en *B. amyloliquefaciens* 83 (Solís, 2010; Luna, 2015), debido al interés en su actividad antibiótica o sinérgica que presentan frente a hongos fitopatógenos, pero en los últimos estudios, incluido el presente trabajo, se ha encontrado que la surfactina y la bacilomicina D podrían estar involucradas en la señalización celular que desencadena la esporulación, y no sólo en la diferenciación a células productoras de matriz polimérica.

Se conoce que la diferenciación en *Bacillus* está regulada por la acumulación de Spo0A fosforilado, donde a un umbral alto se inicia la esporulación y a niveles menores se favorecen los las células caníbales y productoras de matriz polimérica (Fujita et al, 2005). También hay investigaciones que respaldan que moléculas como la surfactina favorecen la activación de la cinasa KinC, que está al principio de la cascada de fosforilación de Spo0A (López et al, 2009), por lo que en condiciones donde se acumulan moléculas como la surfactina y la bacilomicina (cultivo estándar-M), y tras el agotamiento de fuente de carbono, la acumulación de Spo0A-P probablemente se vea aumentada tanto por la limitación nutricional como por las señales extracelulares, y con ello el umbral de Spo0A se alcance antes y así se observan esporas en tiempos más temprano; mientras que en condiciones donde no se favoreció la acumulación de moléculas de señalización (cultivos A y B), tras la limitación nutricional, la acumulación de Spo0A-P probablemente es baja y/o paulatina,

favoreciendo a los otros tipos celulares y retrasando el tiempo en que es posible observar las primeras esporas.

La cuantificación de lipopéptidos permitió hacer una clara distinción entre el efecto de la densidad celular y de las moléculas de señalización (*quorum sensing*); pues, la velocidad específica de esporulación no difiere entre los cultivos a baja y a alta densidad celular (B:  $6 \times 10^7$  cel/mL y A:  $1.5 \times 10^9$  cel/mL), condiciones en las que la influencia de ambos lipopéptidos es baja, pero dicha velocidad sí es mayor en las condiciones estándar (alta densidad celular y acumulación de lipopéptidos).

#### 7.2.4 Producción metabolitos secundarios

En la literatura se menciona que el proceso de esporulación es muy costoso energéticamente (Siebring et al, 2014), hecho que se respalda en su compleja red de diferenciación, la cual incluye múltiples puntos de control con objeto de no iniciar un proceso exhaustivo si no es estrictamente necesario; sin embargo, el gasto energético específico no se ha reportado.

Dado que se observa esporulación hasta varias horas después de agotado el sustrato limitante, surge la pregunta de dónde se obtiene la energía necesaria para la esporulación. Una de las teorías planteadas es la producción de metabolitos de reserva durante la fase de crecimiento. Bajo el anterior razonamiento, se evaluó la concentración de acetoína y butanodiol, metabolitos que ya había identificado como fuente de reserva energética y producidos en condiciones de sobre flujo de carbono (Cristiano, 2012), además del ácido acético, que es un subproducto del metabolismo de los anteriores. Los tiempos de muestreo corresponden a los mismos en los que se cuantificaron los lipopéptidos.

Ya que el cultivo A inicia a alta densidad celular y no tiene sustrato suficiente para producir metabolitos, y que el cultivo B alcanza baja concentración celular y cuenta con poca cantidad de sustrato, se esperaba que ambos cultivos presentasen una mínima o nula producción de éstos metabolitos. En la Figura 21 (Anexo 4) se observa que fue indetectable la concentración de los tres metabolitos en los cultivos A y B; mientras que para el cultivo estándar se detectaron los tres metabolitos en concentraciones de gramos por litro. Como se observa en la Figura 21 la acetoína y el 2,3-butanodiol alcanzan su máxima concentración al inicio de la fase estacionaria (M2) y

conforme avanza el cultivo tiende a disminuir, lo que sugiere que ambos metabolitos son usados por la bacteria como fuente de energía; probablemente en funciones de mantenimiento y diferenciación celular.

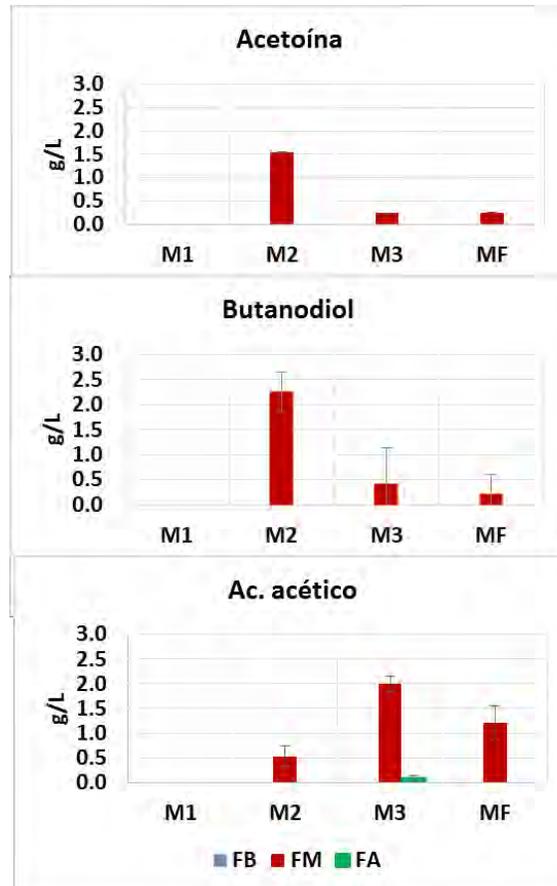


Figura 21. 2,3-butanodiol, acetoina y ácido acético en sobrenadante.

Otro factor, en el que poco se ha profundizado, es la producción de polímeros y su influencia en la esporulación. Gracias a la secuenciación de la cepa, se corroboró la presencia del operón *pgs*, responsable de la producción de ácido-gama-poli glutámico, además de la maquinaria de degradación del polímero. En cultivos lote de *B. amyloliquefaciens* 83, hacia finales de la fase de crecimiento exponencial, se ha observado dificultad para separar la biomasa del sobrenadante, y en tiempos más tardíos esta dificultad se ve reducida (Soriano, 2013), lo que sugiere que el metabolito responsable de ese comportamiento reológico se consume en la fase estacionaria, y por lo tanto también fungiría como fuente de reserva energética.

Recientemente se ha reportado, en *B. licheniformis*, la producción del ácido poli-gama-glutámico cuando se usa amonio como fuente de nitrógeno, además de verse favorecida en condiciones de

limitación de oxígeno. Estos autores correlacionan la producción del polímero con el aumento de la viscosidad (Meissner et al, 2015), así que se eligió evaluar la viscosidad del sobrenadante (Anexo 3). En los cultivos a baja y a alta densidad celular no se presentan variaciones de viscosidad con respecto al agua; pero, en el cultivo estándar, las muestras de la fase estacionaria temprana y tardía presentan valores un orden de magnitud mayor de viscosidad que el agua, y dichos valores tienden a disminuir hacia el final del cultivo, lo que concuerda con lo encontrado en la literatura (Meissner et al, 2015). Si consideramos que la viscosidad es función de la concentración del polímero, la caída de viscosidad sugiere que el polímero se consume en la fase estacionaria, y por lo tanto también representa una fuente alternativa de energía (Stanley & Lazazzera, 2005).

Una de las variaciones que se presentaron respecto a esta fenómeno, es en el cultivo estándar, en la primera repetición (M1-Anexo 1), se presentan dos periodos donde la tensión de oxígeno disuelto se encuentra cercana a cero, para la fase estacionaria temprana de este cultivo la viscosidad fue dos órdenes de magnitud mayores que en cultivo B o el agua y mayor a las repeticiones del cultivo donde no se alcanzó limitación por oxígeno; esto también se ve en la sobre expresión de una serie de genes, lo cual se discute más adelante, pero cuya muestra causa grandes dispersiones. En cuanto a la esporulación esta se ve adelantada entre 1 y 2 horas con respecto a las repeticiones de condiciones, variaciones que suelen presentarse en este tipo de cultivos, pero que hasta la fecha no se han relacionado con el cambio de viscosidad o con la producción de polímeros por parte de *Bacillus amyloliquefaciens* 83, representando un área de oportunidad a estudiar.

#### 7.2.5 Lisis celular

En el apartado anterior, se vislumbró la presencia de metabolitos que representan una fuente alterna de recursos en el cultivo estándar, que probablemente sean usados para el proceso de esporulación. Sin embargo, para las otras dos condiciones de cultivo, la acumulación de metabolitos es mínima e indetectable, y aun así, la eficiencia de esporulación no difiere entre cultivos, por lo que la pregunta es de dónde proviene la energía utilizada para la diferenciación a esporas en los cultivos B y A.

Como se mencionó desde un principio, en las tres condiciones de cultivo, tras el agotamiento de la fuente de carbono, la cuenta celular disminuyó. Este fenómeno se ha observado en cultivos lote

de *B. subtilis* y en nuestro modelo de estudio (Siebring et al, 2014; Cristiano et al, 2012). Por lo que se propone que en cultivos lote, parte de la energía requerida para mantenimiento celular y diferenciación celular proviene de los productos de lisis celular. Debido a ello se evaluó el decaimiento celular, que se representa mediante la velocidad a la que disminuye la cuenta de células totales. Además, la lisis celular se correlaciona con la esporulación, mediante la diferenciación a células caníbales, tipo celular que representan un estado intermedio a la espora, y se caracteriza por expresar un factor tóxico (Skf) para las células hermanas que no lo producen y un factor de retardo de la esporulación (Sdp) (González-Pastor, 2010).

Para describir el fenómeno de lisis celular se cuenta con la constante de decaimiento celular “K” (Ecuación 12), que considera la desaparición de células y hace referencia únicamente a las células lisadas no involucradas en esporulación. Para el cultivo a baja densidad celular (B), K es mucho más baja (0.049 h<sup>-1</sup>) que para los cultivos a alta densidad y estándar (0.102 y 0.104 h<sup>-1</sup>). Probablemente la lisis celular se vea favorecida a altas densidades celulares, donde el requerimiento nutricional es mucho mayor.

*Ecuación 12*

$$\ln \frac{(x - spo)}{x_{max}} = -Kt + c$$

Un hecho interesante es que  $\mu_{spo}$  (velocidad exponencial de esporulación) y K parecen relacionarse bajo las condiciones estudiadas (Tabla 7). Estos valores sugieren que la lisis de las células que no se diferencian es la fuente de nutrientes usada por las células que inician el proceso de esporulación.

*Tabla 7. Comparación de velocidad exponencial de esporulación y velocidad de decaimiento celular (K)*

Cultivo	B		M		A	
Parámetro						
$\mu_{spo}^a$	0.101 ± 0.025	A <sup>c</sup>	0.341 ± 0.059	B	0.368 ± 0.091	B
K <sup>b</sup>	0.049 ± 0.001	A	0.102 ± 0.002	B	0.104 ± 0.003	B

<sup>a</sup> Velocidad exponencial de esporulación en h<sup>-1</sup>

<sup>b</sup> Constante de decaimiento celular en h<sup>-1</sup>, se calculó desde t<sub>GO</sub> a t<sub>f</sub>

<sup>c</sup> Análisis estadístico, la letra representa al grupo que pertenece, comparación realizada de manera horizontal (ANOVA con prueba de Tukey al 95% de confiabilidad).

Por lo tanto,  $\mu_{spo}$  es menor en el cultivo a baja densidad (B), donde la K es menor, ya que probablemente la disponibilidad de nutrientes se dé de forma más esporádica, pues la demanda energética es menor. Por otro lado, para los cultivos que alcanzan alta densidad celular y tienen

mayor demanda energética (A y M), tanto  $\mu_{spo}$  como K son mayores, así, que la velocidad exponencial de esporulación parece estar relacionada a la disponibilidad de recursos, que según lo observado, provienen de la lisis de células que no se diferencian. Además, tras el análisis estadístico, se determinó que el % de células lisadas (Figura 18) es mayor en el cultivo que inicia a alta densidad celular y con baja concentración de glucosa (A), ya que en ninguno de los tres cultivos disminuye la eficiencia de esporulación, y el cultivo A no contó con una fase de crecimiento donde se producen metabolitos de reserva energética, el aumento en la proporción de células lisadas que no forman esporas podría ser una forma de compensar el déficit energético.

Hasta el momento, la lisis de células que no esporulan, probablemente por efecto de las células caníbales, se ha relacionado con un retraso en la esporulación, ya que una fuente energética alterna favorece el crecimiento celular (González-Pastor, 2011), sin embargo, los datos obtenidos sugieren que la lisis es necesaria para completar el proceso de esporulación, ya que parece ser la fuente que provee la energía que sustenta la diferenciación de la bacteria, aun en el caso de que se acumulen metabolitos de reserva.

En resumen, el proceso de esporulación requiere de la limitación nutricional y es independientemente de la densidad celular, pero, se agiliza en condiciones donde se acumula mayormente moléculas de señalización (como los lipopéptidos: surfactina y bacilomicina). Además el proceso requiere de fuentes alternativas de energía, que pueden ser metabolitos de reserva producidos en la fase de crecimiento (ácidos orgánicos y polímeros) y/o los productos desprendidos de la lisis de células hermanas que no se diferencian.

### 7.3 Expresión génica

Con objeto de evaluar las diferencias en la señalización, bajo las condiciones propuestas, se analizó el nivel de expresión génica de los principales genes involucrados en la diferenciación celular y que representan los diferentes tipos celulares (rodeados en rojo en la Figura 22).

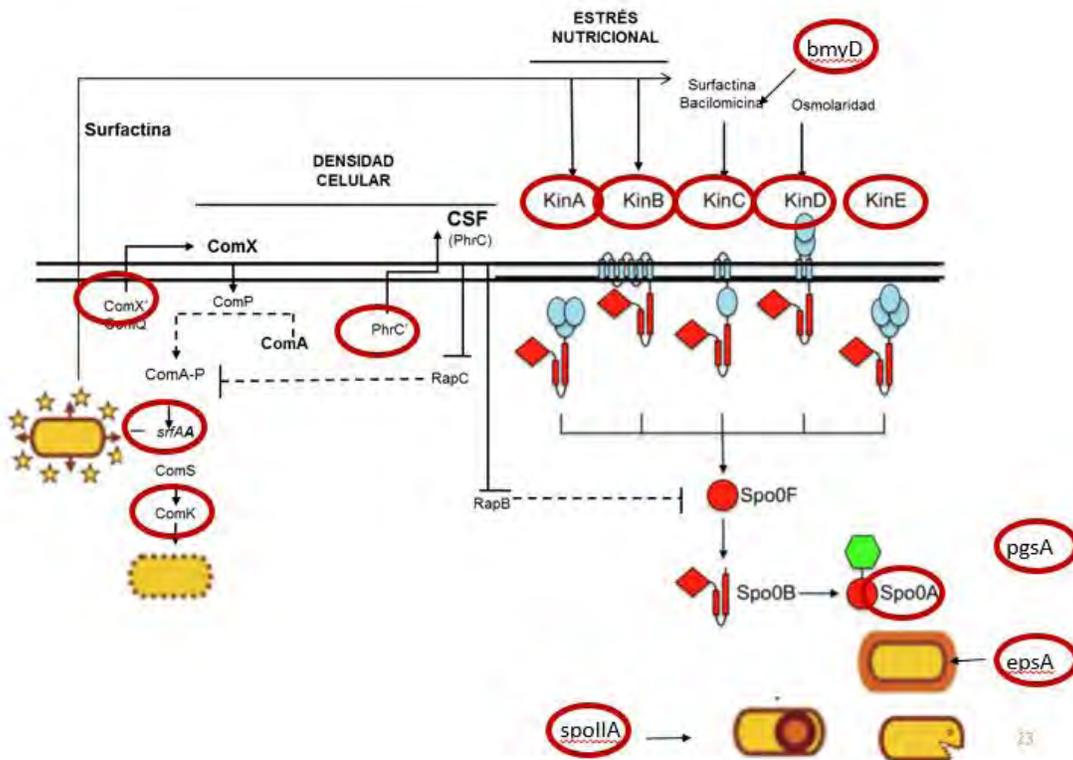


Figura 22. Red de diferenciación celular de *Bacillus*. Rodeados en óvalos rojos se encuentran los genes cuya expresión se analizó.

Originalmente se planteó usar *hupA* como gen de referencia, gen que ya había sido validado (Cristiano, 2016). Sin embargo, se encontró que bajo las condiciones establecidas en el presente trabajo [los momentos metabólicos en los que se tomaron las muestras: fase exponencial o tras inocular (M1), fase estacionaria temprana (1 hora tras agotada la fuente de carbono, M2) y fase estacionaria tardía (30% de esporulación, M3)] la expresión de *hupA* no es constante. Cristiano no observó diferencias de expresión en algunos de los genes que estudió, por lo que se optó por buscar un gen de referencia entre los genes ya establecidos para el experimento. Se realizó una validación mediante los algoritmos de NormFinder y geNORM, que están a la disposición de todo usuario por sus autores, y se pueden usar como un complemento de análisis en Excel. (Lindbjerg et al, 2004; Kozera & Rapacz, 2013). La validación se realizó con valores de Cq de 15 genes, de 12

muestras diferentes, con las que se contaba en ese momento; los resultados (Ver Anexo 7) postularon, en ambos algoritmos, la expresión de *comX* como la más estable, la cual corresponde un valor de estabilidad 0.004 y de  $M= 1.25$ , aunado a ello, los experimentos en el grupo de investigación, como la literatura de los últimos años, sugieren que la expresión de *comX* es constante, y que el efecto de la molécula se debe a su acumulación en su forma modificada y a la capacidad de las células de sensorla en el medio (Bacon-Schneider et al, 2002); por lo que se eligió *comX* como gen de referencia.

Para la aplicación del método  $2^{-ddCT}$ , se eligió como condición control la muestra 1 (fase exponencial) del cultivo a baja densidad celular (B), muestra en la que no hay limitación nutricional y el efecto de la densidad celular es mínimo ( $8 \times 10^6$  cel/mL).

Los datos fueron evaluados estadísticamente mediante un ANOVA de dos factores, lo que permitió diferenciar entre el efecto del momento en que fue tomada la muestra (“momento metabólico”) y las condiciones iniciales de cada cultivo. Los resultados de la expresión están condensados en el Anexo 5 y el análisis estadístico en el Anexo 8.

### 7.3.1 *Bacillus amyloliquefaciens* 83, cepa poco competente

El género *Bacillus* es capaz de diferenciarse en células competentes de manera natural, característica que le permite integrar DNA lineal exógeno a su genoma (Xin et al, 2008; Magnuson et al, 1994). También se sabe que sólo una pequeña parte de la población puede llegar a desarrollar un estado competente; en *Bacillus subtilis* 168, cepa que ha tenido una presión selectiva por aumentar su población competente bajo condiciones de laboratorio, se ha observado hasta un 10% de la población diferenciada a este fenotipo (Stanley & Lazazera, 2005), mientras que para otras cepas esta proporción es menor al 1% (López et al, 2009), cepas aisladas recientemente, de interés industrial, son recalcitrantes a la adquisición de DNA exógeno, aunado a la baja tasa de recombinación en este modelo celular, realza la necesidad de implementar estrategias de manipulación genética (Zhang et al, 2015).

La diferenciación a células competentes está controlada por el regulador maestro ComA que en su forma fosforilada, tras sensor ComX, permite la transcripción de ComS se une a MecA, desreprimiendo a ComK, proteína que se autorregula positivamente. ComK es una proteína de

unión a DNA responsable de la expresión de alrededor de 100 genes, incluidas las proteínas responsables del transporte de DNA exógeno (Leistner et al, 2008, Guan et al, 2015).

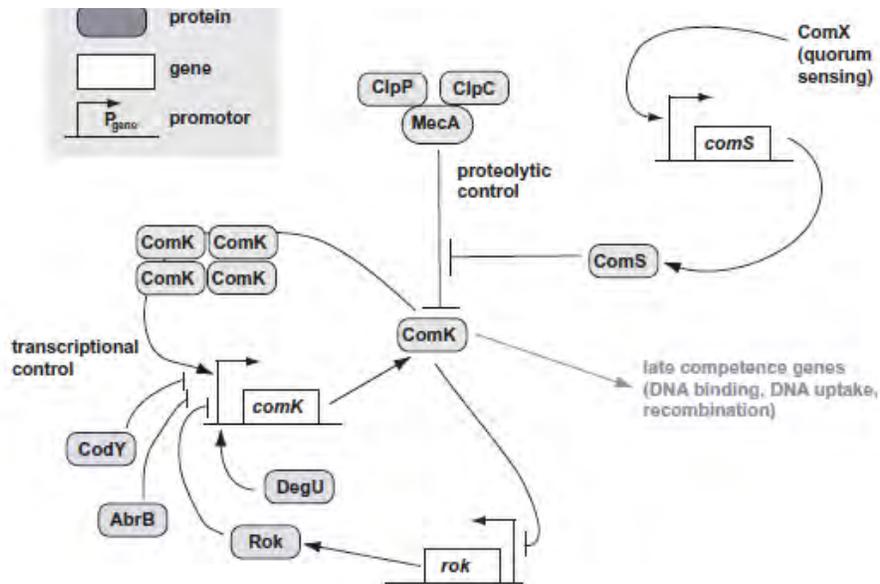


Figura 23. Modelo de señalización en el que se inicia el estado competente en *Bacillus subtilis*. ComX desencadena la transcripción de ComS, que se une a MecA, desreprimiendo a ComK, que es responsable de la transcripción de genes involucrados en competencia. Tomado de Leistner et al, 2008.

En el inicio del proyecto se buscó el silenciamiento de genes estratégicos para separar el efecto de la densidad celular del de la limitación nutricional, pero la transformación de *B. amyloliquefaciens* 83 fue limitante en dicho planteamiento (Anexo 2).

Al igual que los genes involucrados en esporulación, la expresión del gen *comK* fue evaluada en las condiciones antes planteadas. Debido a que la diferenciación a células competentes ha sido asociada a la fase estacionaria tardía (Leistner et al, 2008) se esperaba observar un aumento de expresión en dicha fase (muestras 2 y 3); por el contrario, no se halló diferencia en la expresión de *comK* en las condiciones evaluadas (Anexo 5). Probablemente la población de *Bacillus amyloliquefaciens* 83 que se diferencia a células competentes es muy baja para observar un aumento de expresión de *comK*, lo que dificulta la transformación por competencia natural; ante lo que es necesario buscar alternativas que no involucren la competencia natural para la manipulación genética de *B. amyloliquefaciens* 83.

### 7.3.2 Expresión de *spolIA*

El gen *spolIA* se expresa durante la segunda fase de la esporulación de *Bacillus*. Fue seleccionado ya que a partir de ésta fase se considera un proceso irreversible (Errington, 2003).

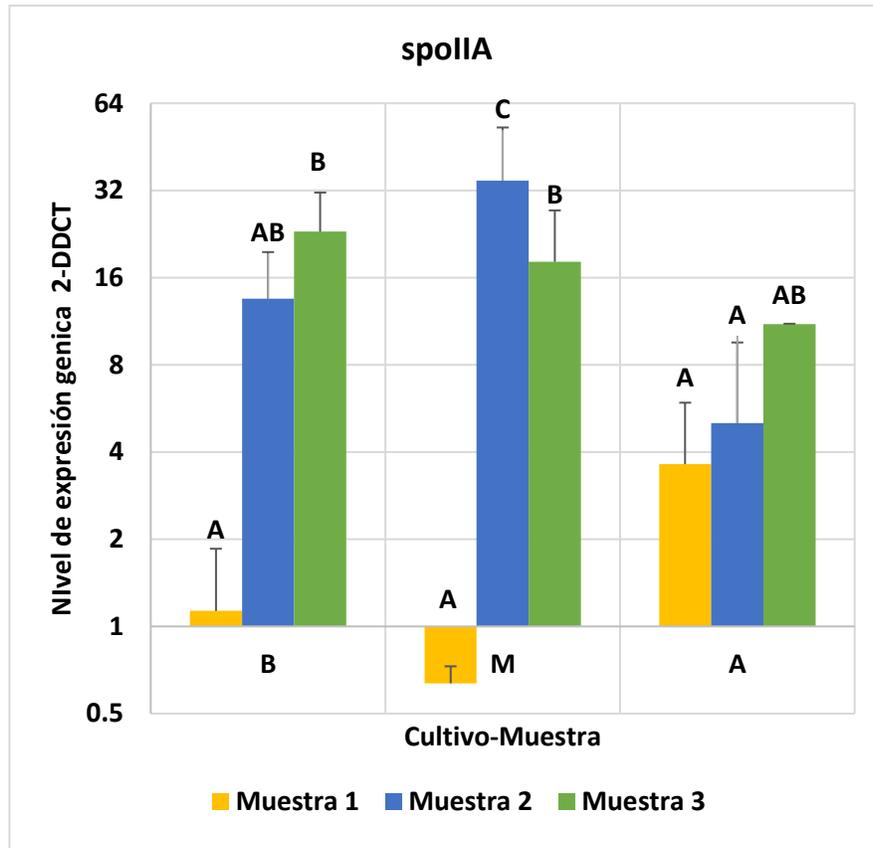


Figura 24. Expresión de *spolIA*. Sobre las columnas se encuentran una letra que representa el conjunto al que pertenece según la prueba estadística (ANOVA de dos factores, prueba de Tukey, 95% de confianza-Anexo 8).

La Figura 23 muestra dos patrones diferenciados de expresión de *spolIA*. En el cultivo estándar (M) la expresión de *spolIA* aumenta justo después de que se presenta la limitación, momento en que además cuenta con acumulación de moléculas de señalización y metabolitos de reserva, también se sobre expresa en la fase estacionaria tardía, aunque es menor que en la fase estacionaria temprana, lo que sugiere que una mayor proporción de celular inicia la esporulación cuando se presentan ambos factores: limitación nutricional y moléculas de *quorum sensing*; mientras que en los cultivos a baja y alta densidad celular (cuya concentración de lipopéptidos y metabolitos de reserva se encuentran al menos un orden de magnitud por debajo que la del cultivo estándar), la expresión tiende a aumentar hacia el final de los cultivos.

Mediante que con el análisis de la eficiencia, velocidad exponencial y velocidad específica de esporulación se llegó a la conclusión de que la densidad celular, por si sola, parece influenciar únicamente en la velocidad exponencial de aparición de esporas (probablemente relacionado a la disponibilidad de recursos, relacionado a la constante de decaimiento celular). En la muestra 1 (fase exponencial y/o sin limitación nutricional), cada condición de cultivo presenta una densidad celular diferente (B:  $8 \times 10^6$  cel/mL, M:  $1.2 \times 10^7$  cel/mL, y A:  $1.6 \times 10^9$  cel/mL) y la expresión de *spolIA* no se altera significativamente; dato que respalda la postulación de que la densidad celular no influye en la señalización a diferenciación a espora.

El efecto conjunto de la limitación nutricional y acumulación de moléculas de señalización se observa en la muestra 2 del cultivo estándar (M), a la que se atribuye la máxima expresión de *spolIA*; en el mismo “momento metabólico”, la expresión de los otros dos cultivos es estadísticamente igual a la de su fase de crecimiento exponencial, por lo que la señalización por efecto de limitación nutricional no es suficiente tras una hora en condiciones de glucosa agotada. Recordando que la diferenciación se regula por el umbral de acumulación de Spo0A fosforilado (Fujita et al, 2005), probablemente sean las moléculas de señalización (incluidas surfactina y bacilomicina D) las que desencadenen un aumento en el flujo de fosforilación con lo que se disminuye el tiempo en que se alcanza el umbral de Spo0A-P (que activa la transcripción de genes involucrados en la esporulación- *spolIA*-no cuantificado en el presente trabajo); mientras, que en ausencia de éstas moléculas, tras una hora de limitación probablemente aún no se supera el umbral de acumulación de Spo0A-P.

La expresión de *spolIA* en los cultivos a alta densidad celular (A), no se ve significativamente aumentada en las muestras evaluadas, probablemente la esporulación se retrasó hasta la disponibilidad de recursos provenientes de la lisis de células hermanas, ya que en este cultivo se presentan las condiciones con menor disponibilidad de recursos energéticos; cabe mencionar que se presentó una mayor variación en el cultivo A, que podría deberse a un efecto residual de una limitación temporal, presente durante el lavado del inóculo. Por otro lado, en el cultivo a baja densidad celular (B), la expresión de *spolIA* aumenta significativamente hasta la fase estacionaria tardía, probablemente se deba a una lisis celular (K) y una acumulación de Spo0A-P más paulatinas.

### 7.3.3 Diferenciación a otros tipos celulares (expresión de polímero y *biofilm*)

En línea con la distribución de poblaciones, se evaluó el gen *epsA*, que está involucrado en la diferenciación a células productoras de matriz polimérica, también conocida como *biofilm* (Branda et al, 2006). Ya que no se sabe con certeza si el ácido poli-gama-glutámico está asociado las células productoras de biofilm, también se siguió el gen *pgsA* (Stanley & Lazazzera, 2005). A pesar de que no se siguió la diferenciación a células caníbales, ya que no se han validado la función de los genes propuestos como responsables de este fenómeno en *Bacillus amyloliquefaciens* (Niazi et al, 2014), se sabe que el canibalismo y la producción de matriz polimérica no son tipos celulares excluyentes, y que probablemente las células que produzcan biofilm sean también las conocidas como caníbales (López et al en el 2009), por lo que se infirió un comportamiento similar en la expresión del operón *sdp* (que no fue evaluado) con respecto a *epsA*.

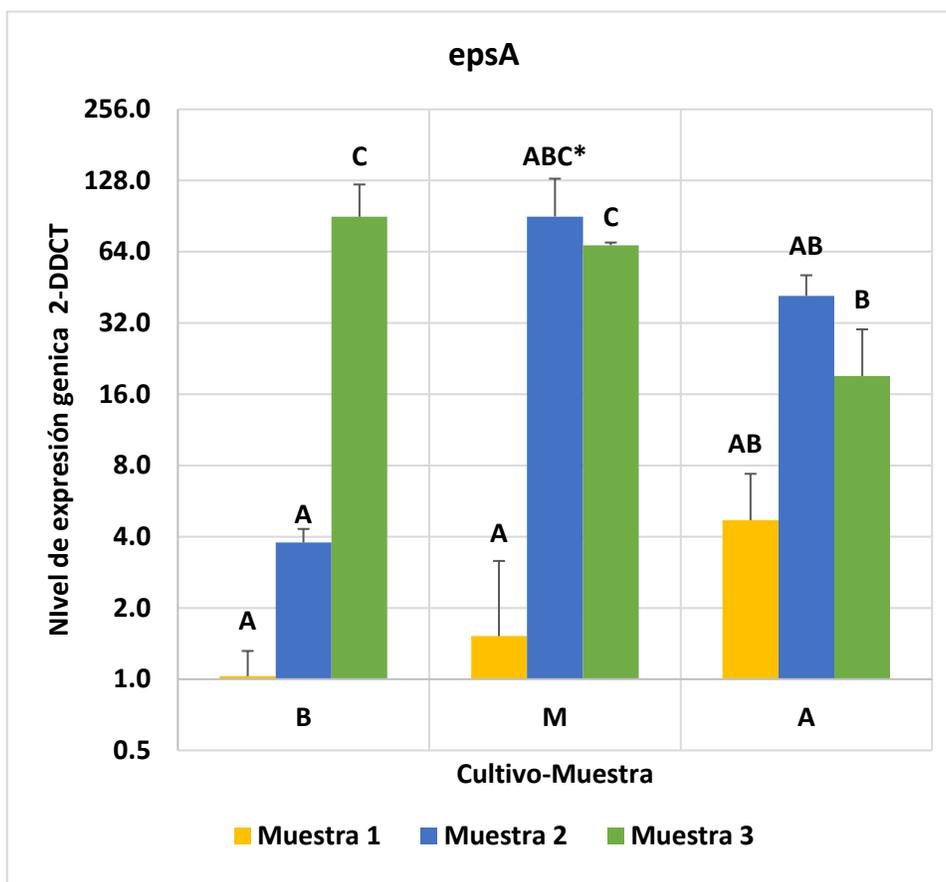


Figura 25. Expresión de *epsA*. \*incluye la muestra afectada por limitación de oxígeno, que presentó una mayor expresión y variabilidad, lo que impide ver diferencias significativas. Sobre las columnas se encuentran una letra que representa el conjunto al que pertenece según la prueba estadística (ANOVA de dos factores, prueba de Tukey, 95% de confianza- Anexo 8).

La primera repetición del cultivo estándar (M) se limitó por oxígeno en periodos cortos durante la fase exponencial (Anexo 1), lo que probablemente favoreció la producción del ácido poli-gama-glutámico (Meissner et al, 2015). Para este cultivo en específico, se observó una sobre expresión más marcada en *epsA* en la fase estacionaria temprana y *pgsA* se sobre expresó 144 veces (Anexo 5) en esta muestra (las otras dos repeticiones del cultivo M y el resto de condiciones no prestaron diferencias). Lo anterior sugiere la posibilidad de una relación entre la limitación por oxígeno y la diferenciación a células productoras de biofilm, además de la producción de ácido poli-gama-glutámico.

La expresión del gen *epsA* (Figura 25), en las tres condiciones de cultivo, se incrementó en la fase estacionaria tardía, lo que sugiere que la diferenciación a células productoras de matriz extracelular y caníbales se presenta hasta ya entrada la fase estacionaria. La constante de decaimiento celular K sugiere que se presenta mayor proporción de células caníbales en el principio de la fase estacionaria de los cultivos que alcanzan alta densidad, ya que bajo esas condiciones la lisis ocurre más rápido, sin embargo, las diferencias en la expresión de *epsA* no lo respaldan, ya que la tendencia indica un aumento de expresión que es opacado por la alta variabilidad.

Probablemente, *B. amyloliquefaciens* 83 requiere de los otros tipos celulares (caníbales-productoras de biofilm) para completar el proceso de diferenciación a espora, por lo que la multiplicidad celular se favorece a lo largo de la fase estacionaria, correspondiendo a la sobreexpresión de los genes *epsA* y *spoIIA*.

El hecho de no observar sobreexpresión de *epsA* en la fase estacionaria temprana, y sí una notable sobreexpresión en la fase estacionaria tardía pone en duda que se favorezcan los otros tipos celulares en un bajo umbral de Spo0A-P, y que exista la posibilidad de un modelo donde las células productoras de matriz polimérica no necesariamente sean las que se diferenciarán a espora; es decir, que las células destinadas a ser esporas sólo se diferencian a espora, sin pasar por estadios intermedios, hasta que reciban la señal final de acumulación de Spo0A-P. Para confirmar o rechazar esta propuesta sería necesario elegir otra estrategia que permita el seguimiento individual de una célula.

### 7.3.4 Expresión e influencia de las cinasas

Se han relacionado a las cinasas KinA y KinB con la respuesta a limitación nutricional, y las cinasas KinC y KinD a diferentes moléculas de señalización, mientras que de la cinasa KinE poco se conoce. (Eswaramoorthy et al, 2009; Tojo et al, 2013; Jiang et al, 2000)

La expresión de la cinasa KinB (Figura 26) aumentó en la fase exponencial tardía. Esto se puede deber a una respuesta a una limitación por fuente de nitrógeno, ya que se ha reportado que se activa ante la ausencia de GTP (Tojo et al, 2013; Grau et al, 2015). Esta diferencia parece ser independiente de las condiciones de cultivo y depender únicamente del momento en la evolución del cultivo lote. Además correlaciona con la sobre expresión de *spollA* en ese momento “metabólico”.

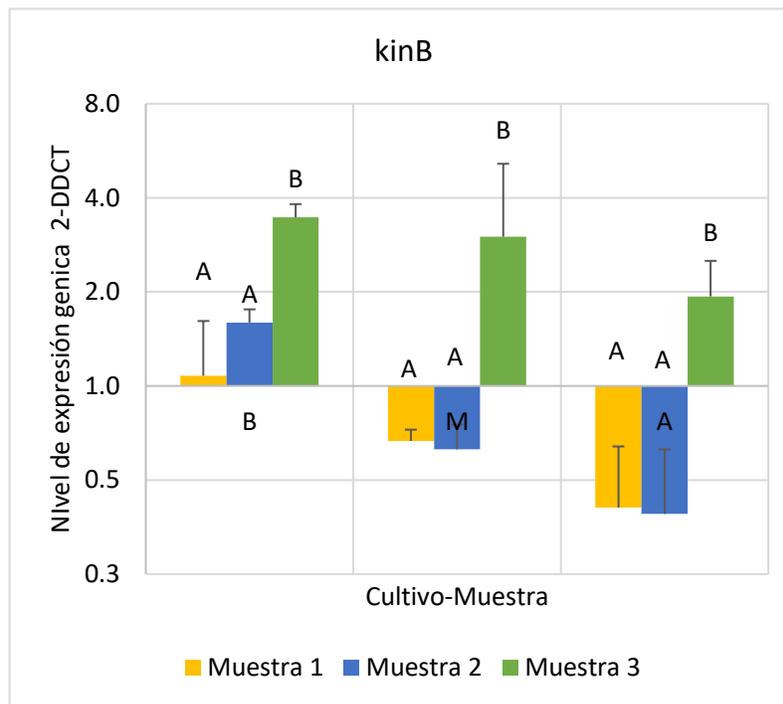


Figura 26. Expresión de *kinB*. Sobre las columnas se encuentran una letra que representa el conjunto al que pertenece según la prueba estadística (ANOVA de dos factores, prueba de Tukey, 95% de confianza-Anexo 8).

La cinasa KinC se ha relacionado con la respuesta a los lipopéptidos surfactina y bacilomicina, sin embargo, en este trabajo no fue posible relacionar la expresión de este conjunto de genes, o la respuesta ante los metabolitos en el medio, como se ha visto en otros reportes (Xu et al, 2012). Como se observa en la Figura 27, *kinC* se sobre expresó en las primeras dos muestras del cultivo a alta densidad celular (A), mientras que la sobre expresión de los lipopéptidos (Figuras 29 y 30) se observa en al menos cuatro muestras; además la concentración de los lipopéptidos es representativa únicamente en la fase estacionaria de las condiciones de cultivo estándar (M), donde no hay diferencia de expresión de *kinC*.

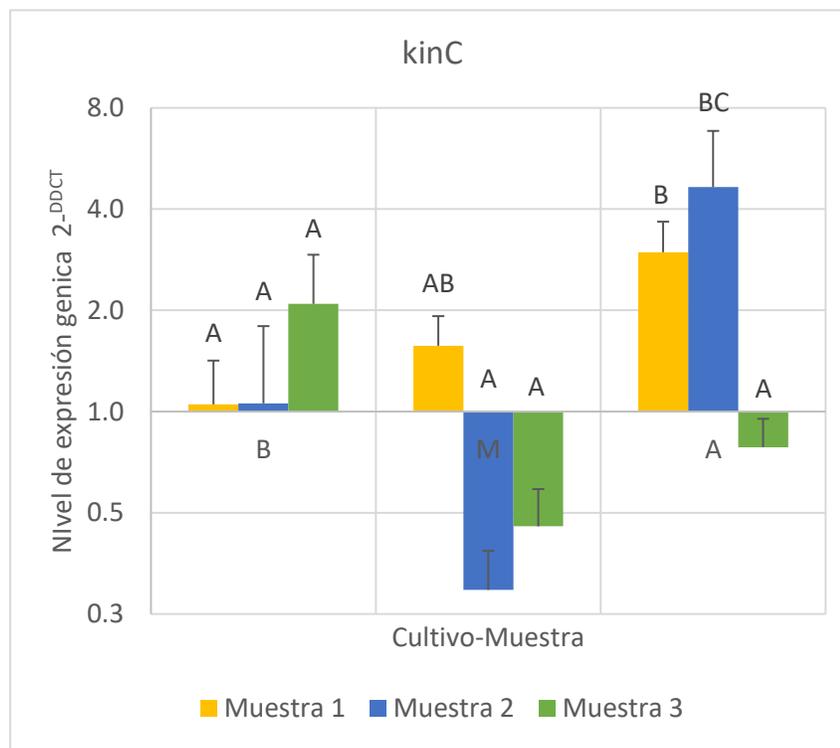


Figura 27. Expresión de *kinC*. Sobre las columnas se encuentran una letra que representa el conjunto al que pertenece según la prueba estadística (ANOVA de dos factores, prueba de Tukey, 95% de confianza-Anexo 8).

Al igual que para el regulador maestro Spo0A, es difícil evaluar la influencia individual de las cinasas en la cadena de fosforilación (Figura 4) sin contar con cepas que tengan silenciadas las vías, ya que su influencia se refleja en su capacidad de transferir grupos fosfatos ante alguna señal, y no directamente con su transcripción. A pesar de ello, existen reportes que han encontrado diferencias de expresión en las cinasas ante una respuesta extracelular (Xu et al, 2012). Finalmente, en el presente estudio, no se encontraron diferencias entre la expresión de las cinasas KinA, KinD ni KinE, tampoco en el regulador Spo0A.

### 7.3.5 Expresión de moléculas de señalización

También se analizó la expresión de los genes involucrados en la producción de tres moléculas de señalización (*quorum sensing*): surfactina (*srfaA*), bacilomicina (*bmyD*) y CSF (*phrC*).

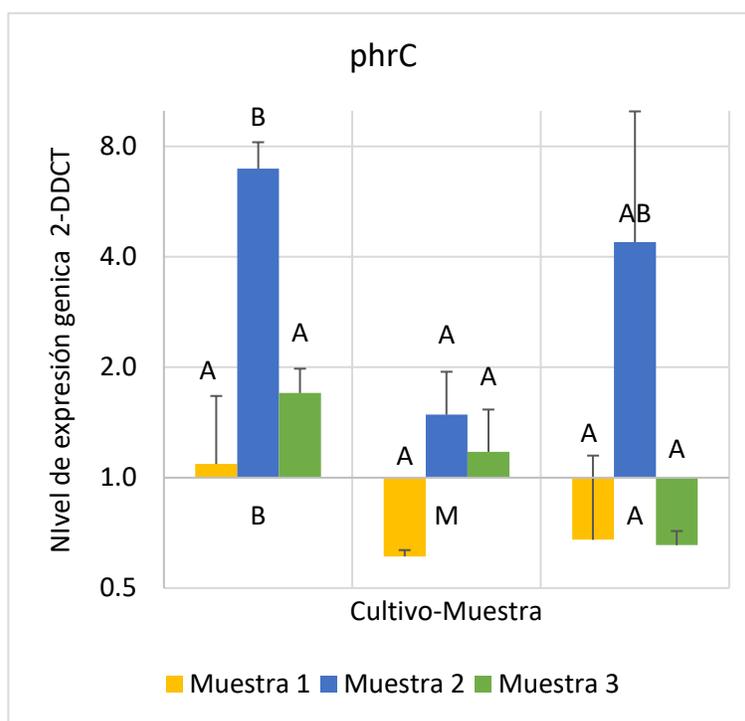


Figura 28. Expresión de *phrC*. Sobre las columnas se encuentran una letra que representa el conjunto al que pertenece según la prueba estadística (ANOVA de dos factores, prueba de Tukey, 95% de confianza-Anexo 8).

Para *phrC*, precursor del péptido CSF, sólo se observa sobre expresión en la fase estacionaria temprana de las condiciones de los cultivos a baja y alta densidad celular (B y A). La regulación en la expresión de este péptido no ha sido claramente esclarecida, pero la comunicación directa con Grossman y Palmer reportada por Lazazzera en el 2000, sugiere que CSF probablemente esté regulado bajo una segunda señal, que sería la limitación nutricional. Asumiendo que lo anterior concuerde con el modelo de *B. amyloliquefaciens* 83, y que en el cultivo estándar (M) la presencia de metabolitos de reserva (aunque no contenga glucosa a ese tiempo) no propicie la activación de respuesta limitación nutricional, la expresión de *phrC* concuerda con una regulación positiva ante una completa limitación por fuente de carbono. La ausencia de sobreexpresión de *phrC* en la fase estacionaria tardía se puede deber a la presencia de recursos provenientes de la lisis celular. Cabe mencionar que para conocer más acerca del funcionamiento de este péptido sería necesario estudiar además a las fosfatasa (proteínas Rap) que son reguladas por CSF y otros péptidos Phr (Veening et al, 2005).

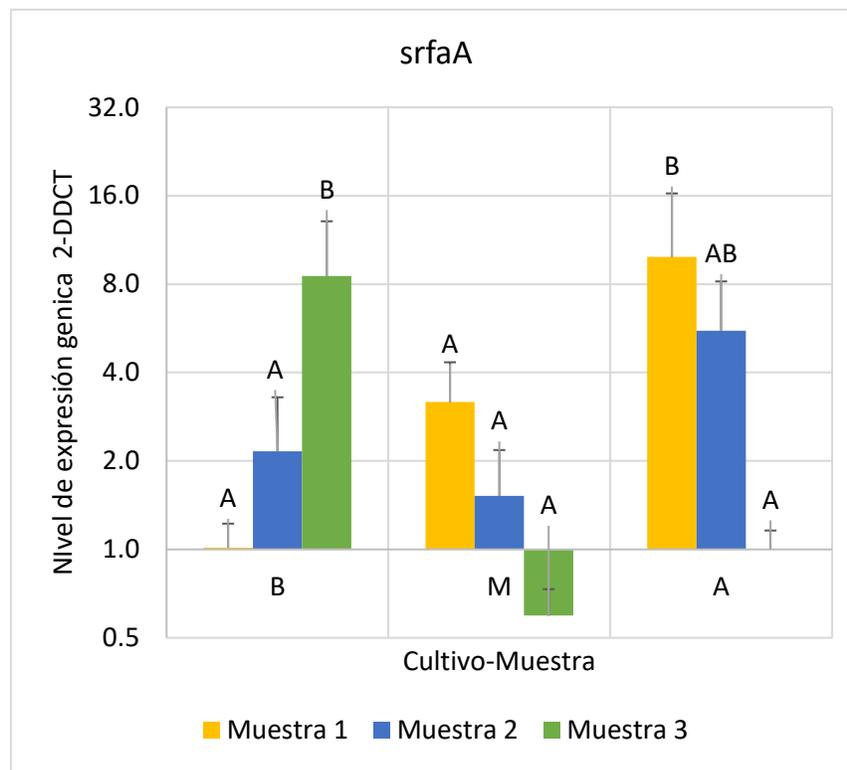


Figura 29. Expresión de *srfaA*. Sobre las columnas se encuentran una letra que representa el conjunto al que pertenece según la prueba estadística (ANOVA de dos factores, prueba de Tukey, 95% de confianza-Anexo 8).

Es interesante que no hay diferencias de expresión de *srfaA* (Figura 29) en el cultivo estándar (M), pero si hay acumulación de la molécula surfactina; lo que sugiere, que bajo estas condiciones, la producción de surfactina no depende de la expresión de la sobreexpresión de *srfaA*, y cuyo efecto sería dependiente de su acumulación. Mientras que sí existe sobreexpresión en las primeras muestras del cultivo a alta densidad y la última del cultivo a baja densidad; probablemente esta sobreexpresión se deba a una respuesta ante el estrés específico de cada condición, pero cuya producción-acumulación de surfactina se obstruyó por la baja disponibilidad de sustrato.

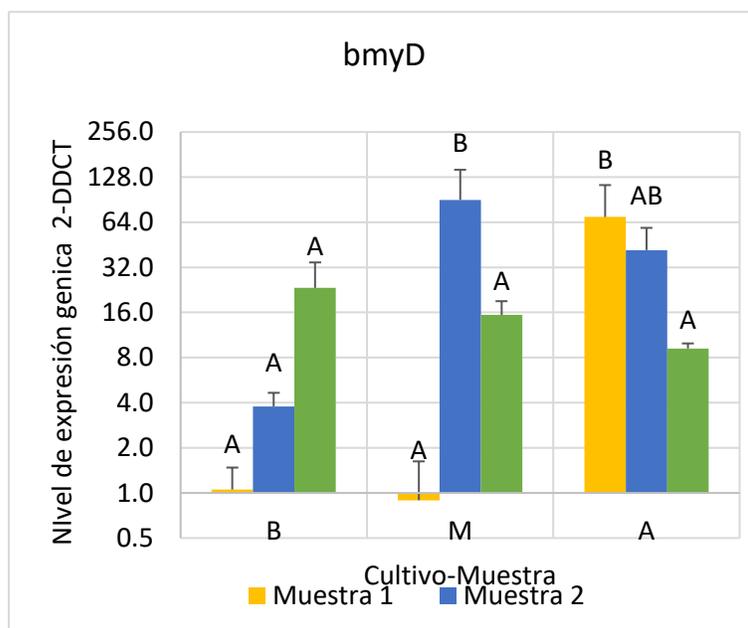


Figura 30. Expresión de *bmyD*. Sobre las columnas se encuentran una letra que representa el conjunto al que pertenece según la prueba estadística (ANOVA de dos factores, prueba de Tukey, 95% de confianza-Anexo 8).

La Figura 30 muestra que la mayor expresión de *bmyD* se alcanzó en la fase estacionaria temprana del cultivo estándar (M), que coincide con la mayor expresión de *spoIIA* (Figura 24) y con la bacilomicina cuantificada en el caldo de cultivo. Este fenómeno se ha observado en otros trabajos del grupo (Cristiano, 2016), lo que sugiere que la bacilomicina D influye en la esporulación, lo cual no ha sido reportado hasta ahora en la literatura. Además se encontró sobreexpresión en las primeras muestras del cultivo a alta densidad (A), probablemente en respuesta a la alta densidad celular, cuya producción-acumulación no se presentó en el cultivo A por la falta de recursos energéticos.

## 8. CONCLUSIONES

- Los genes involucrados en el modelo de diferenciación, estudiado en *B. subtilis*, están conservados en *B. amyloliquefaciens* 83 (identidad de 65-96%), por lo que es un buen modelo de partida para el estudio de la cepa de interés.
- En *Bacillus amyloliquefaciens* 83, la limitación nutricional es el factor más relevante en la diferenciación a esporas.
- El *quorum sensing* agiliza la esporulación (condiciones en que se acumulan moléculas de señalización: surfactina y bacilomicina). Además, el proceso requiere de fuentes alternativas de energía: metabolitos acumulados y/o el producto de la lisis de células hermanas.
- En la fase estacionaria se favorece simultáneamente la diferenciación a células caníbales–productoras de biofilm y esporas (se sobre expresan *epsA* y *spollA*), probablemente, la multiplicidad celular favorece la esporulación.
- Aunque se sobre expresan genes responsables de las moléculas de señalización, ante condiciones específicas de estrés nutricional o por densidad celular, no necesariamente corresponde a la producción de la molécula, ya que depende también de las condiciones, como una nula producción es ausencia de nutrientes.

## 9. PERSPECTIVAS

- Generar alternativas de manipulación genética para *Bacillus amyloliquefaciens* 83. Lo que puede incluir el uso de recombinasas externas o de sistemas como Crisp-Cas9, recientemente usado para una cepa recalcitrante de *Bacillus*.
- Los resultados sugieren, probablemente, en *Bacillus amyloliquefaciens* 83, que las células que esporulan no pasan por estadios intermedios (productoras de *biofilm*), por lo que se propone estudiar la distribución de los tipos celulares mediante promotores de los diferentes tipos celulares unidos a proteínas fluorescentes.
- Validar la función de los genes propuestos de diferenciación a células caníbales en *B. amyloliquefaciens* 83, mediante *knocouts*.
- Estudiar el efecto de la adición exógena de surfactina, bacilomicina, comX y CSF en condiciones de limitación nutricional y de no limitación nutricional, para discernir su efecto en la esporulación y diferenciación a otros tipos celulares.
- Evaluar la producción de ácido poli-gama-glucónico en condiciones de limitación nutricional y de limitación por oxígeno, y el efecto de este polímero en la diferenciación a células productoras de *biofilm* y esporas.
- Probar fuentes alternativas de Nitrógeno, y evaluar su efecto en la esporulación. (Nitratos en lugar de amonio podría disminuir la producción de polímero y repercutir en la esporulación).
- Analizar la diferenciación celular y/o composición del sobrenadante de cultivos en medio rico (YPG), para comprender el efecto del inóculo sin lavar.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Aragón, W. 2012. Desarrollo de un marcador molecular específico para el agente de control biológico *Bacillus* sp. 83. Tesis de MCBq IBT.
- Bacon-Schneider, K., Palmer, T., Grossman, A. 2002. Characterization of comQ and comX, two genes required for the production of ComX pheromone in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 184, 410-419.
- Box G., Hunter W., Hunter J. 1978. Statistics for experimenters. An introduction to Design, Data Analysis and Model Building. Chapter 7 Randomized Blocks and Two-Way Factorial Designs. John Wiley & Sons, Inc. USA. 208-244
- Branda S., Chu F., Kearns D., Losick R., Kolter R. 2006. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular Microbiology* 59, 4, 1229-1238.
- Bustin, S., Benes, V., Garson, J., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M., Shipley, G., Vandesompele, J., Wittwer, C. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 55, 4.
- Cabrera-Valladares, N., Martínez, L., Flores, N., Hernández-Chávez, G., Martínez, A., Bolívar, F., Gosset, G. 2012. Physiologic consequences of glucose transport and phosphoenolpyruvate node modifications in *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 22, 177-197.
- Chen X., Koumoutsi A., Scholz R., Eisenreich A., Schneider K., Heinemeyer I., Morgenstern B., Voss B., Hess W., Reva O., Junge H., Voigt B., Jungblut P., Vater J., Sussmuth R., Liesegang H., Strittmatter A., Gottschalk G., Rainer. 2007. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology* 25, 9, 1007-1014.
- Chen, Y., Cao, S., Chai, Y., Clardy, J., Kolter, R., Guo, J.-h., Losick, R. 2012. A *Bacillus subtilis* sensor kinase involved in triggering biofilm formation on the roots of tomato plants. *Molecular Microbiology* 85, 418-430.
- Cristiano, S. 2012. Estudio en cultivo en lote y lote alimentado para crecimiento vegetativo y producción de esporas de *Bacillus* sp. 83 Tesis MCBq IBT-UNAM.
- Cristiano, S. 2016. Estudio del papel de la tasa de dilución y la densidad celular en la esporulación de *Bacillus* sp. 83 en cultivos continuos. Tesis DCBq IBT-UNAM (En proceso).
- Errington, J., 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology* 1, 117-126.
- Eswaramoorthy, P., Duan, D., Dinh, J., Dravis, A., Devi, S.N., Fujita, M. 2010. The threshold level of the sensor histidine kinase KinA governs entry into sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 192, 3870-3882.
- Flores N., Flores S., Escalante., De Anda R., Leal I., Malpica R., Georgellis D., Gosset G., Bolívar F. 2005. Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Metabolomic Engineering* 7, 70-78.
- Fujita, M., González-Pastor, J.E., Losick, R. 2005. High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 187, 1357-1368.
- Galindo E., Carillo-Fasio J.A., García R., Patiño-Vera M., 2005. Tecnología para el control biológico de la principal enfermedad del mango (antracnosis) y el efecto en su calidad pos cosecha. *Claridades Agropecuarias* 148, pp. 50-59.
- Galindo E., Serrano-Carreón L., Gutiérrez C.R., Allende R., Balderas K., Patiño M., Trejo M., Wong, M.A. Rayo, E. Isauro D., Jurado C. 2013. The challenges of introducing a new biofungicide to the market: A case study. *Electronic Journal of Biotechnology* 16, no. 6. <http://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue3-fulltext-6>.

- Grossman, A., Losick, R., 1988. Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. Proceedings of the National Academy of Sciences 85, 4369-4373.
- González-Pastor, J. 2011. Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiology Reviews 35, 415-424.
- Guan C., Cui W., Cheng J., Zhou I., Guo J., Hu X., Xia h., Zhou Z. 2015. Construction and development of an auto-regulatory gene expression system in *Bacillus subtilis*. Microbial Cell Fact 14, 150.
- Higgins, D., Dworkin, J. 2012. Recent progress in *B. subtilis* sporulation. FEMS Microbiology Reviews 36, 131–148.
- Jiang, M., Shao, W., Perego, M., Hoch, J. 2000. Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology 38, 535-542.
- Koumoutsis A., Chen X., Henne A., Liesegang H., Hitzeroth G., Franke P., Vater J., Borriss R. 2004. Structural and Functional Characterization of Gene Clusters Directing Nonribosomal Synthesis of Bioactive Cyclic Lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* Strain FZB42. Journal of Bacteriology, 186,4, 1084–1096.
- Koumoutsis, A., Chen, X.H., Vater, J., Borriss, R. 2007. DegU and YczE positively regulate the synthesis of bacillomycin D by *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. Applied and Environmental Microbiology 73, 6953-6964.
- Kozera, B. & Rapacz, M. 2013. Reference genes in real-time PCR. Journal Applied Genetics 54, 391–406.
- Lanigan-Gerdes, S., Dooley, A., Faull, K., Lazazzera, B. 2007. Identification of subtilisin, Epr and Vpr as enzymes that produce CSF, an extracellular signalling peptide of *Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology 65, 1321-1333.
- Lazazzera B. 2000. Quorum sensing and starvation: signal for entry into stationary phase. Current Opinion Microbiology 3.177-182.
- Leisner, M. 2008. Genetic switching into the competent state *Bacillus subtilis*: a single cell approach. Dissertation Fakultät für Physik Ludwig–Maximilians–Universität München.
- Lindbjerg, C., Ledet, Jensen., Falck, T. 2004. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. Cancer Research 64, 5245–5250.
- López, D., Kolter, R. 2010. Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *B. subtilis*. FEMS Microbiology Reviews 34, 134-149.
- López, D., Vlamakis, H., Kolter, R. 2009. Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiology Reviews 33, 152-163. L
- López, D., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R., 2009. Paracrine signaling in a bacterium. Genes & Development 23, 1631-1638.
- López, D., Fischbach, M.A., Chu, F., Losick, R., Kolter, R. 2009. Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. PNAS 106, 280-285.
- López D., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. 2009. Cannibalism Enhances Biofilm Development in *Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology, 74,,3, 609–618.
- Loske A., Campos J., Fernández F., Castaño E. 2011. Enhanced shock wave-assisted transformation of *Escherichia coli*. Ultrasound in Medicine and Biology, Vol. 37, No. 3. 502–510.
- Luna, A. 2015. Evaluación del papel de los antibióticos lipopeptídicos producidos por *Bacillus* sp. 83 en la inhibición del crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides*. Tesis MCBq-IBT-UNAM

- Magnuson, R., Solomon, J.M., Grossman, A. 1994. Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. *Cell* 77, 207-216.
- Mallqui, Y. 2016. Efecto de la densidad celular en la esporulación de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* 83. Tesis de MCBq. IBT-UNAM (En proceso)
- Meissner, L., Kauffmann, K., Wengeler, T., Mitsunaga, H., Fukusaki, E., Büchs, J. 2015. Influence of nitrogen source and pH value on undesired poly( $\gamma$ -glutamic acid) formation of a protease producing *Bacillus licheniformis* strain. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology* 42, 1203–1215.
- Miller M., Bassler L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews Microbiology* 55, 165–99.
- Morales, D. 2007. Desarrollo de un proceso de alta densidad celular para la producción de esporas de *Bacillus* sp 83. Tesis de MCBq. IBT-UNAM.
- Nakano, M.N., Magnuson, R., Myers, A., Curry, J., Grossman, A.D., Zuber, P. 1991. *srfA* is an operon required for surfactin production, competence development and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 173, 1770-1778.
- Niazi A., Manzoor S., Asari S., Bejai S., Meijer J., Bongcam-Rudloff E. 2014. Genome Analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* Subsp. *plantarum* UCMB5113: A Rhizobacterium That Improves Plant Growth and Stress Management. *PLoS ONE* 9(8): e104651.
- Perego, M. 1997. A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 8612-8617.
- Pottathil M., Jung A., Lazazzera, B. 2008. CSF, a species-specific extracellular signaling peptide for communication among strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus mojavensis*. *Journal of Bacteriology* 190, 4095-4099.
- Rodríguez, L., 2005. Producción y formulación de esporas de *Bacillus subtilis* CPA como agente de control biológico. Tesis MCBq-IBT. UNAM.
- Rubinstein, S., Kolodkin-Gal, I., McLoon, A., Chai, L., Kolter, R., Losick, R., Weitz, D. 2012. Osmotic pressure can regulate matrix gene expression in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 86, 426-436.
- Schultz, D., Wolynes, P., Jacob, E., Onuchic, J. 2009. Inaugural article: Deciding fate in adverse times: sporulation and competence in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 21027-21034.
- Serrano-Carreón L. & Galindo-Fentanes E. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Academia Mexicana de Ciencias. Revista Ciencia AMD*
- Shank E., Kolter R. 2011. Extracellular signal and multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Current opinion in Microbiology* 14, 741-747.
- Siebring J., Elema M., Vega F., Kovács A., Haccou P., Kuipers O. 2014. Repeated triggering of sporulation in *Bacillus subtilis* selects against a protein that affects the timing of cell division. *The ISME Journal* 8, 77–87.
- Solis Arcos Y. (2010). Identificación parcial de antibióticos ciclo lipopeptídicos termorresistentes producidos por *Bacillus subtilis* 83 con actividad antifúngica contra *Fusarium* spp. Tesis de Ingeniería Química. Universidad Autónoma del estado de Morelos.
- Solomon, J., Lazazzera, B., Grossman, A. 1996. Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes and Development* 10, 2014-2024.
- Soriano, E., 2013. Evaluación de la esporulación de *Bacillus* sp. 83 en función de la densidad celular en cultivos continuos. Tesis UPPue-IBT.

- Stanley N., Lazazzera B. 2005. Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect polyg -DL-glutamic acid production and biofilm formation. *Molecular Microbiology* 57, 4) 1143–1158.
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* 56, 845-857.
- Tan I., Rammamurthi K. 2015 Spore formation en *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology Rep.* 6, 212-225.
- Tojo, S., Hirooka, K., Fujita, Y. 2013. Expression of *kinA* and *kinB* of *Bacillus subtilis*, necessary for sporulation initiation, is under positive stringent transcription control. *Journal of Bacteriology* 195, 1656-1665.
- Toutenburg H., Shalabh. 2009. Statistical Analysis of Designed Experiments. Chapter 7. Multifactor experiments. Springer, 3th edition, 322-245.
- Traag B., Pugliese A., Eisen J., Losick R. 2012. Gene Conservation among Endospore-Forming Bacteria Reveals Additional Sporulation Genes in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* , 195, 2, 253–260.
- Veening, J., Hamoen, L., Kuipers, O. 2005. Phosphatases modulate the bistable sporulation gene expression pattern in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 56, 1481-1494.
- Vlamakis H., Aguilar C., Losick R., Kolter R. 2008. Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes and Development* 22, 945–953.
- Xin Yan, Hao-Jie Yu, Qing Hong, and Shun-Peng Li, 2008. Cre/lox System and PCR-Based Genome Engineering in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 5556–5562.
- Xu, Z., Shao, J., Li, B., Yan, X., Qirong, S., Zhang, R. 2012. Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 808-815.
- Zhang Z., Ding Z., Shu D., Luo D., Tan H. 2015. Development of an Efficient Electroporation Method for Iturin A-Producing *Bacillus subtilis* ZK. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 7334-7351.
- Zhang N., Yang D., Wang D., Miao Y., Shao J., Zhou X., Xu Z., Li Q., Feng H., Li S., Shen Q., Zhang R. 2015. Whole transcriptomic analysis of the plant-beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 during enhanced biofilm formation regulated by maize root exudates. *BMC Genomics* 16:685.
- Zhao J., Cao L., Zhang C., Zhong L., Lu J., Lu Z. 2014. Differential Proteomics Analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* and Its Genome-Shuffled Mutant for Improving Surfactin Production. *International Journal Molecular Sciens*, 15, 19847-19869.

# 11. ANEXOS

## Anexo1. Control de condiciones de cada cultivo

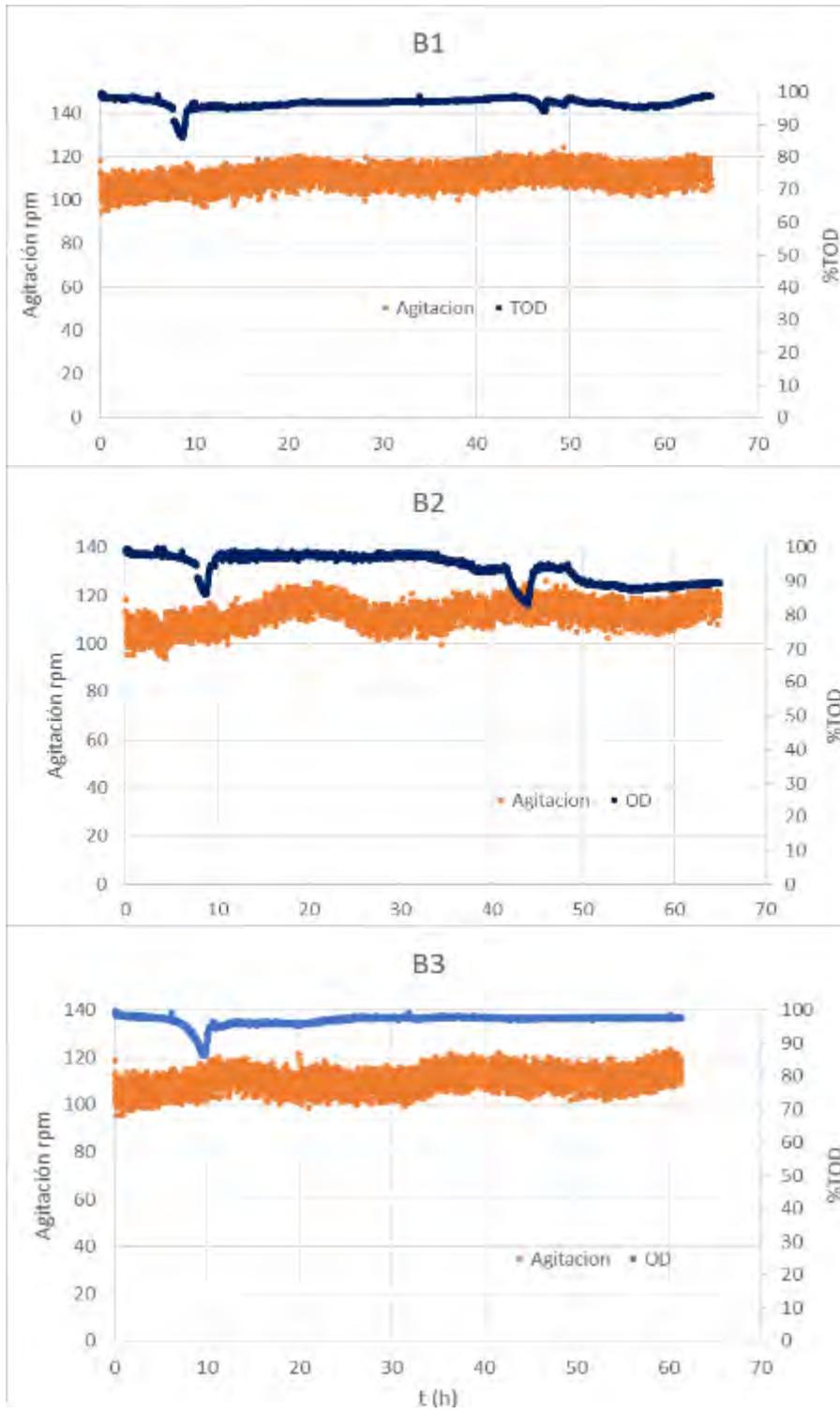


Figura 31. Control de cultivos B.

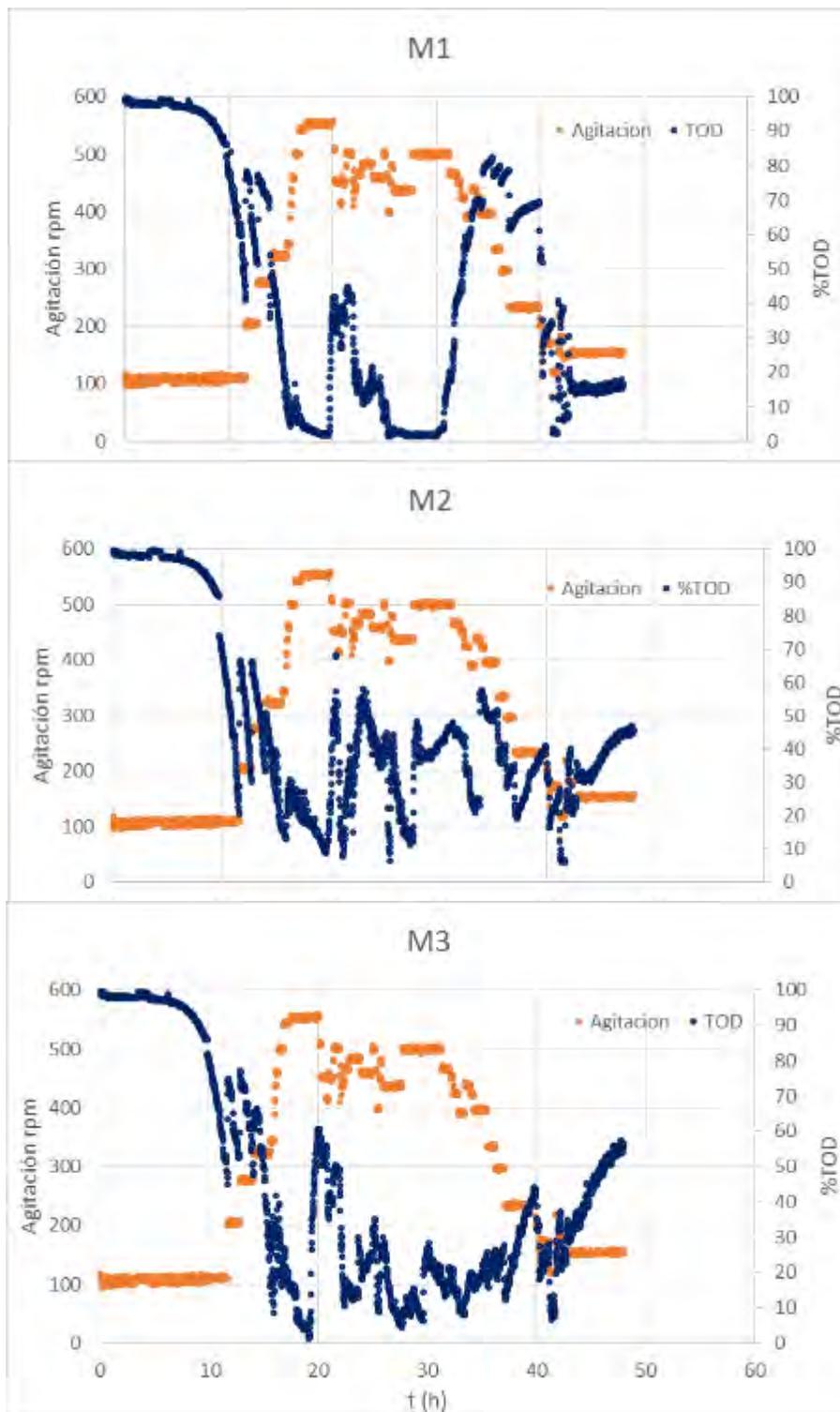


Figura 32. Control de cultivos M.

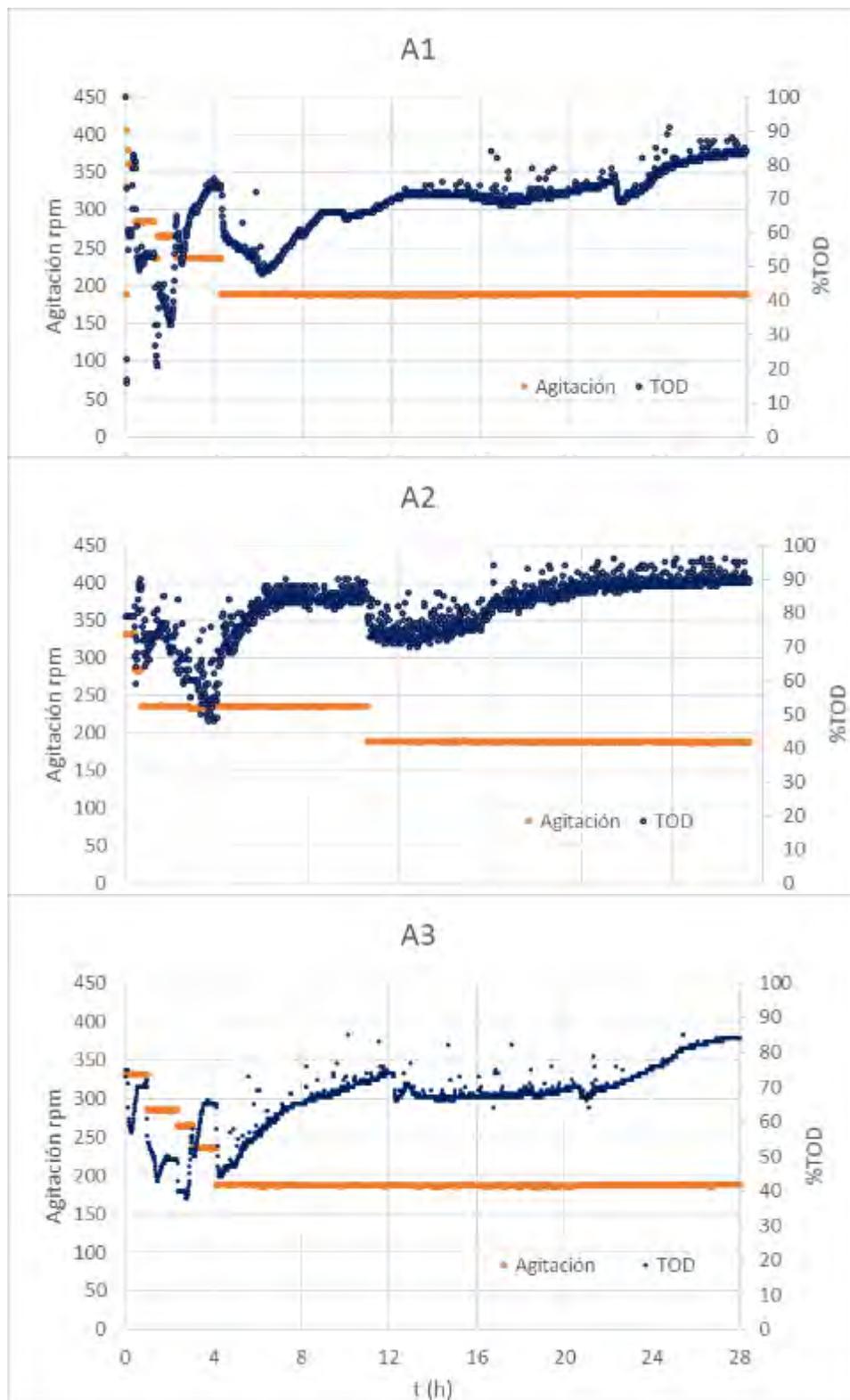


Figura 33. Control de cultivos A.

## Anexo 2. Construcción de plásmidos y estrategias de transformación

Se optó por la doble recombinación homóloga como estrategia de silenciamiento de genes, siguiendo la estrategia de Cabrera, 2012. Con dicho objetivo se construyeron plásmidos a partir del esqueleto de pJET1.2, en los que se introdujeron secuencias (entre 500 y 1100 pb) río arriba y río abajo colindantes a los genes a silenciar (*comA* y *phrC*) rodeando un gen de resistencia (kanamicina o espectinomicina respectivamente). Los plásmidos resultantes (pJET2FAComAFB-Km y pJET2FaphrCFB-LoxPSP) fueron comprobados por PCR, y posteriormente por secuenciación, siendo ambas construcciones finales correctas para los objetivos del presente proyecto (Figuras 34 y 35).

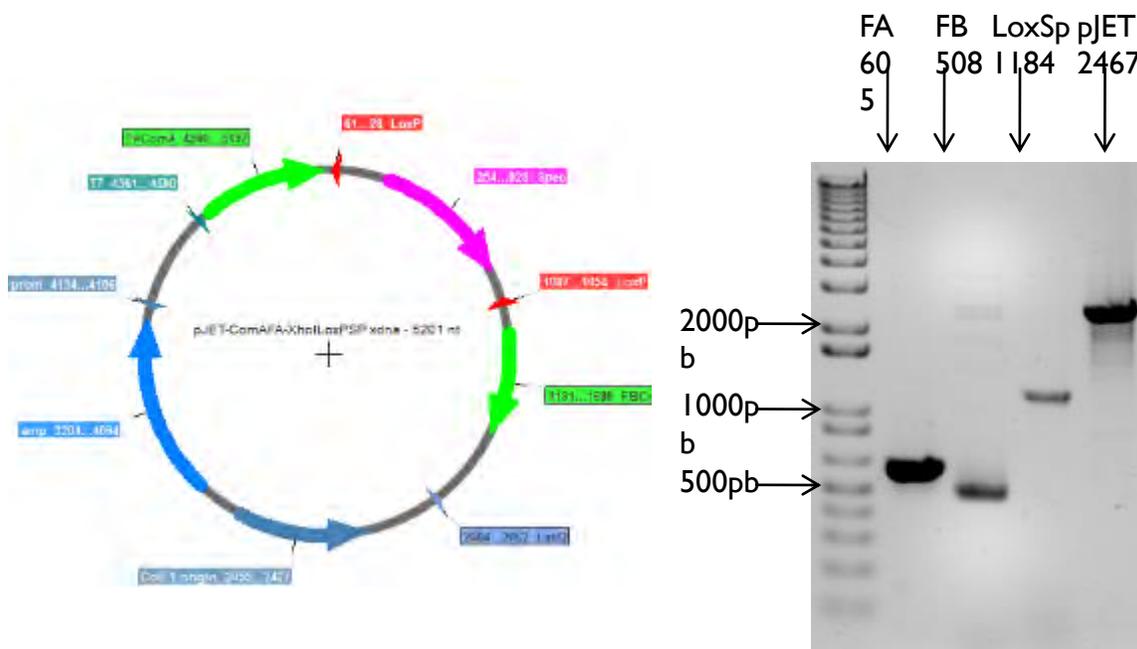


Figura 34 Mapa del plásmido pJET2-FAComAFB-LoxPsp, y gel de agarosa comprobando fragmentos individuales y en el último pozo la suma de los anteriores

Existen reportes que clasifican algunos aislados recientes del género *Bacillus* como cepas recalcitrantes a la transformación por lo que la manipulación genética de ciertas cepas constituye un reto, este es el caso *Bacillus amyloliquifaciens* 83, cuya transformación resultó el cuello de botella del presente proyecto. Para lo cual se tomaron múltiples estrategias de transformación (Tabla 9), entre las que destacan: competencia natural, competencia natural+ electroporación, electroporación a varias DO, ondas de choque, protoplastos +electroporación, protoplastos con PEG (polietilenglicol al 30%), suplementación de medio + electroporación y ondas de choque (Loske et al, 2011; Zhang et al, 2015).

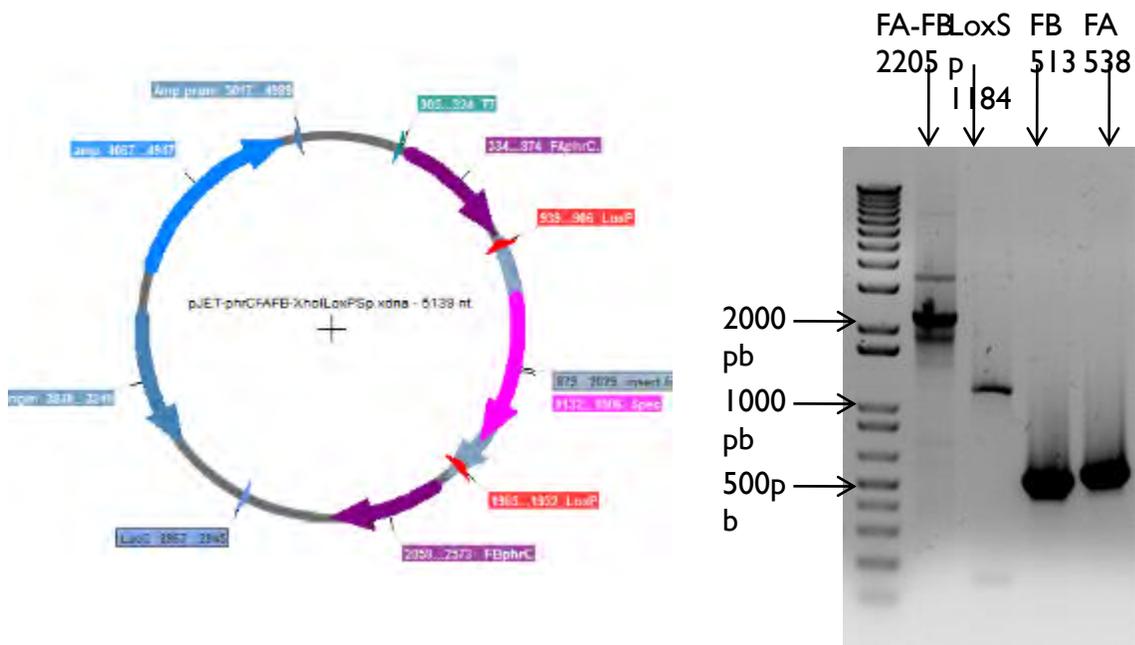


Figura 35. Mapa del plásmido pJET2-FAphrCFB-LoxPSP, y gel de agarosa comprobando fragmentos individuales y en el primer pozo la suma de los anteriores

Paralelamente se han variado las fuentes de ADN (PC=plásmido circularizado, PL=plásmido linerizado, producto de PCR), la cantidad del mismo (0.1-10  $\mu$ g). Los medios de crecimiento (LB, LBG, NCM). El amortiguador de electroporación (TSM, PEB, SM, SMP, Glicerol 10%). El tiempo y medio de recuperación (LB, LBSM, GB/ 3, 12 h). El voltaje de electroporación (6.7, 7.5, 9, 12, 20 kV/cm). Además de suplementación con distintos compuestos como la glicina, la D-L treonina (desestabilizadores de membrana) y medio de cultivo gastado de la cepa de interés o de una cepa de *E. coli* sobreproductora de ComX (ComX: involucrada en la diferenciación a células competentes).

De los anteriores tratamientos mediante la selección con antibiótico se han obtenido una baja cantidad de candidatas, todas verificadas por PCR como falsas positivas.

Dado que se ha logrado incrementar el número de candidatas, probablemente el problema sea alguno de los factores involucrados en la recombinación. Actualmente se sigue trabajando con el establecimiento del protocolo de transformación de la cepa de interés.

Tabla 8. Resumen de métodos de transformación probados

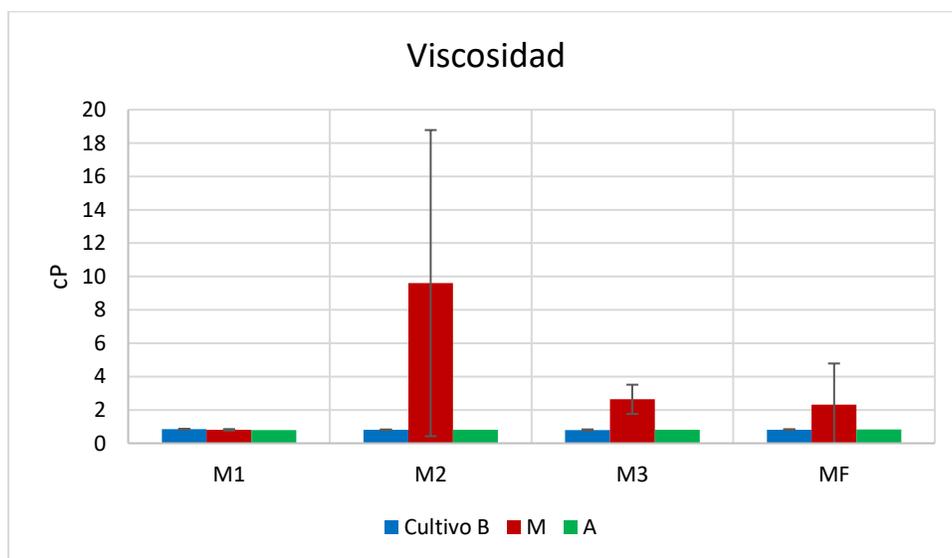
Método	Observaciones	Máximo no. de candidatas
Quimiocompetencia	Medio A → Medio B (Ca, Mg)	1
Quimiocompetencia+ electroporación	Medio A → Medio B (Ca, Mg)+ Electroporacion	1
Electroporación + AA	Tre+Gly+Tween, Amp, Gly	3
Electroporación	DO <sub>f</sub> /DO <sub>o</sub> =10, 15	15
Competencia natural 120 hrs	120 hrs+ ADN	15
Competencia natural 15 hrs	ADN durante todo el cultivo	60
Electroporación +ComQX	10,20, 50%+4 hrs (E. coli pet 22+ COMQX)	49
Electroporación +ComX	50%+ 4hrs (C. alimentado BA 83)	18
Ondas de choque	Monopulso y monochoque	>100
Protoplastos+ PEG 30%	Protoplastos con y sin electroporación	9

### Anexo 3. Viscosidad de los cultivos

En los cultivos M se notó un aumento en la viscosidad al final de la fase exponencial e inicio de la fase estacionaria. Por lo que se cuantificó la viscosidad en los mismos tiempos en que se tomó muestra para metabolitos secundarios y RTqPCR. También se realizó dicha cuantificación para los cultivos B y A, donde no se presentaron cambios con respecto al agua durante toda la fermentación. La viscosidad esta reporta a una velocidad de corte de  $100 \text{ s}^{-1}$ .

Tabla 9. Viscosidad, a  $100 \text{ s}^{-1}$ , en cP. Muestras 2 y 3 de cultivos M muestran un aumento de viscosidad, la cual disminuye hacia el final de la fermentación, sugiriendo un consumo del agente responsable del aumento de la viscosidad

Muestra	Cultivo B		Cultivo M		Cultivo A	
M1	0.84	± 0.02	0.81	± 0.04	0.80	± 0.04
M2	0.80	± 0.02	9.60	± 9.18	0.80	± 0.02
M3	0.79	± 0.04	2.64	± 0.88	0.80	± 0.02
MF	0.82	± 0.03	2.32	± 2.47	0.83	± 0.01



## Anexo 4. Cuantificación de lipopéptidos y ácidos orgánicos

Tabla 10. Concentraciones de lipopéptidos en sobrenadantes de caldo de cultivo.

Cultivo	Muestra	Surfactina (mg/L)	Bacilomicina (mg/L)
B	M1	0.008 ± 0.001	0.00 ± 0.00
B	M2	0.009 ± 0.002	0.00 ± 0.00
B	M3	0.015 ± 0.005	0.00 ± 0.00
B	MF	0.015 ± 0.009	0.61 ± 0.97
M	M1	0.027 ± 0.002	0.00 ± 0.00
M	M2	23.544 ± 1.546	29.95 ± 6.83
M	M3	21.046 ± 4.189	65.25 ± 3.64
M	MF	21.906 ± 4.556	53.95 ± 26.58
A	M1	0.256 ± 0.072	0.00 ± 0.00
A	M2	0.119 ± 0.056	0.00 ± 0.00
A	M3	0.618 ± 0.126	2.12 ± 1.08
A	MF	0.427 ± 0.355	1.47 ± 0.90

Tabla 11. Concentraciones de ácidos orgánicos en sobrenadantes de caldo de cultivo

Cultivo	Muestra	Butanodiol (g/L)	Ac. Acético (g/L)	Acetoína (g/L)
B	M1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
B	M2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
B	M3	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
B	MF	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
M	M1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
M	M2	2.26 ± 0.40	0.53 ± 0.21	1.54 ± 0.02
M	M3	0.42 ± 0.72	1.99 ± 0.16	0.24 ± 0.00
M	MF	0.22 ± 0.38	1.21 ± 0.35	0.25 ± 0.00
A	M1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
A	M2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
A	M3	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.07	0.00 ± 0.00
A	MF	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

## Anexo 5. Expresión génica y análisis estadístico

Tabla 12. Expresión génica y análisis estadístico

Cultivo	B						M						A					
	1		2		3		1		2		3		1		2		3	
<i>bmyD</i> *	1.1 ± 0.4	A <sup>a</sup>	3.8 ± 0.9	A	23.3 ± 11.2	A	0.9 ± 0.7	A	90.1 ± 53.1	B	15.4 ± 3.6	A	69.3 ± 43.9	B	41.7 ± 17.0	AB	9.2 ± 0.7	A
<i>comK</i>	1.1 ± 0.4	-	1.5 ± 0.5	-	1.3 ± 0.4	-	0.9 ± 0.2	-	0.8 ± 0.1	-	1.4 ± 0.1	-	0.6 ± 0.3	-	0.7 ± 0.5	-	1.0 ± 0.2	-
<i>comX</i>	1.0 ± 0.0	-	1.0 ± 0.0	-	1.0 ± 0.0	-	1.0 ± 0.0	-	1.0 ± 0.0	-	1.0 ± 0.0	-	1.0 ± 0.0	-	1.0 ± 0.0	-	1.0 ± 0.0	-
<i>epsA</i> *	1.0 ± 0.3	A	1.5 ± 0.5	A	90.0 ± 33.2	C	1.5 ± 1.6	A	35.2 ± 40.2	ABC <sup>b</sup>	68.3 ± 1.8	C	4.7 ± 2.7	AB	7.9 ± 9.2	AB	19.1 ± 11.0	B
<i>hupA</i> *	1.0 ± 0.1	A	0.1 ± 0.0	-B	0.3 ± 0.1	-B	4.5 ± 0.2	B	0.5 ± 0.5	-B	0.6 ± 0.2	A-B	0.2 ± 0.0	-B	0.2 ± 0.2	-B	0.1 ± 0.0	-B
<i>kinA</i>	1.1 ± 0.5	-	0.8 ± 0.1	-	0.7 ± 0.1	-	0.8 ± 0.0	-	0.7 ± 0.4	-	0.5 ± 0.1	-	1.1 ± 0.4	-	1.7 ± 1.3	-	0.3 ± 0.0	-
<i>kinB</i>	1.1 ± 0.5	A	1.6 ± 0.2	A	3.5 ± 0.4	B	0.7 ± 0.1	A	0.6 ± 0.1	A	3.0 ± 2.1	B	0.4 ± 0.2	A	0.4 ± 0.2	A	1.9 ± 0.6	B
<i>kinC</i> *	1.1 ± 0.4	A	1.1 ± 0.7	A	2.1 ± 0.8	A	1.6 ± 0.4	AB	0.3 ± 0.1	A	0.5 ± 0.1	A	3.0 ± 0.7	B	4.7 ± 2.2	BC	0.8 ± 0.2	A
<i>kinD</i>	1.0 ± 0.4	-	0.6 ± 0.1	-	0.7 ± 0.2	-	0.6 ± 0.1	-	0.5 ± 0.2	-	0.6 ± 0.1	-	1.8 ± 1.2	-	1.1 ± 0.6	-	0.3 ± 0.1	-
<i>kinE</i>	1.0 ± 0.2	-	2.0 ± 0.5	-	0.7 ± 0.2	-	0.8 ± 0.2	-	0.6 ± 0.2	-	0.3 ± 0.1	-	0.8 ± 0.3	-	1.7 ± 1.2	-	0.3 ± 0.0	-
<i>pgsA</i>	1.1 ± 0.6	A	0.6 ± 0.5	A	3.1 ± 2.8	A	1.8 ± 2.2	A	51.5 ± 80.6	A**	1.9 ± 0.5	A	3.9 ± 1.2	A	5.3 ± 6.1	A	1.6 ± 0.6	A
<i>phrC</i>	1.1 ± 0.6	A	7.0 ± 1.3	B	1.7 ± 0.3	B	0.6 ± 0.0	A	1.5 ± 0.5	AB	1.2 ± 0.4	A	0.7 ± 0.5	A	4.4 ± 5.6	AB	0.7 ± 0.1	A
<i>spoIIA</i> *	1.1 ± 0.7	A	13.5 ± 6.1	AB	23.1 ± 8.4	B	0.6 ± 0.1	A	34.6 ± 18.2	C	18.1 ± 9.2	B	3.6 ± 2.3	A	5.0 ± 4.5	A	11.1 ± 0.0	AB
<i>spoOA</i>	1.0 ± 0.2	-	1.6 ± 0.2	-	1.0 ± 0.2	-	0.7 ± 0.1	-	1.0 ± 0.8	-	0.7 ± 0.1	-	0.8 ± 0.5	-	0.9 ± 0.5	-	0.5 ± 0.1	-
<i>srfAA</i> *	1.0 ± 0.2	A	2.2 ± 1.1	A	8.5 ± 4.6	B	3.2 ± 1.2	A	1.5 ± 0.7	A	0.6 ± 0.1	A	9.9 ± 6.4	B	5.6 ± 2.6	AB	1.0 ± 0.2	A

a Análisis estadístico hecho entre muestras (en filas-horizontales). ANOVA de dos factores con prueba de Tukey al 95% de confiabilidad (-=no hay diferencias significativas).

b Datos que incluyen la variabilidad de la muestra que ha sido influida por limitación por oxígeno

\* Estadísticamente existe una interacción entre el efecto de las condiciones del cultivo y el momento de la toma de muestra.

## Anexo 6. Curvas de calibración

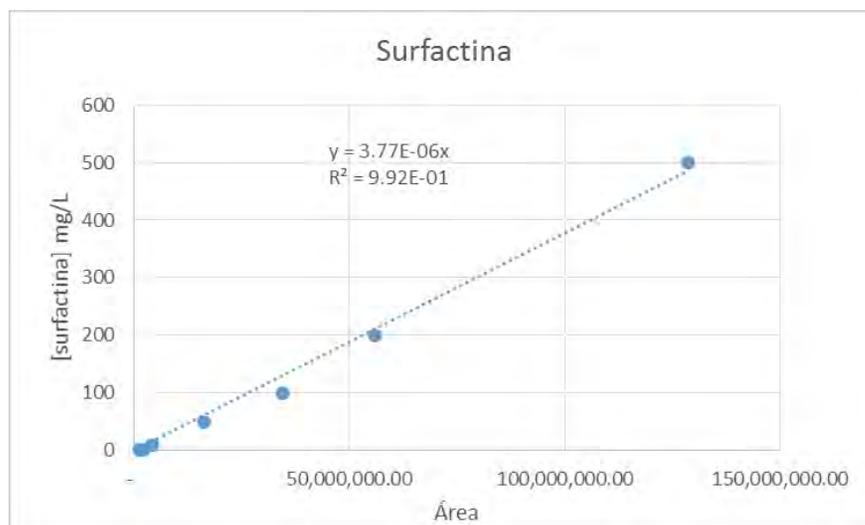


Figura 36. Curva de calibración de surfactina.

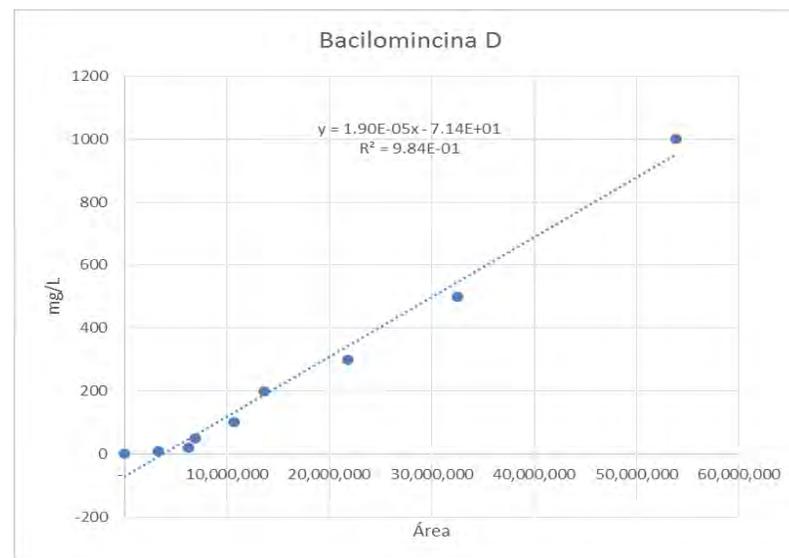


Figura 37. Curva de calibración de bacilomincina D.

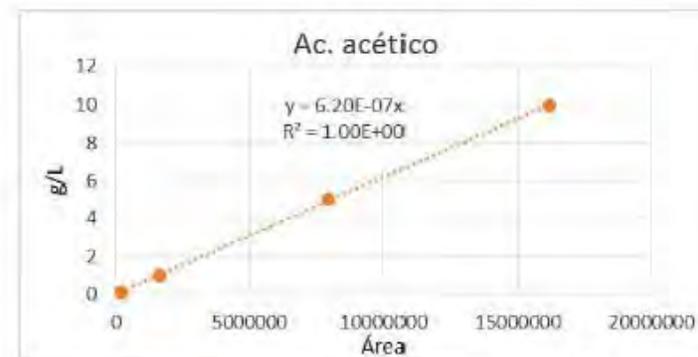
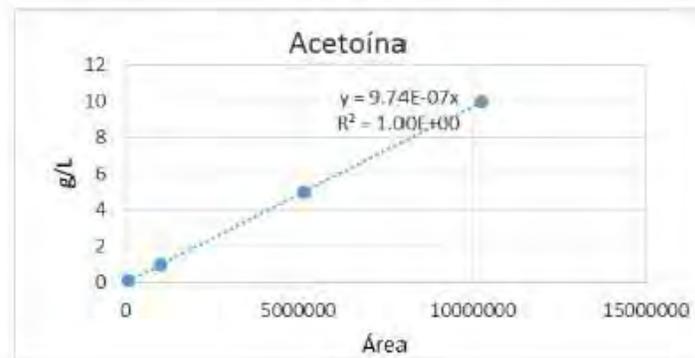
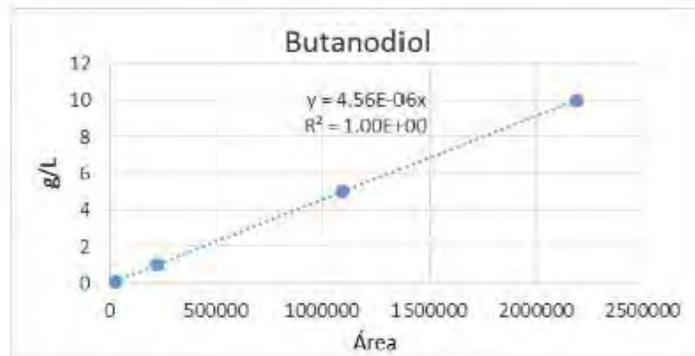


Figura 38. Curvas de calibración de 2,3-butanodiol, acetoína y ácido acético.

## Anexo 7. Validación de gen de referencia

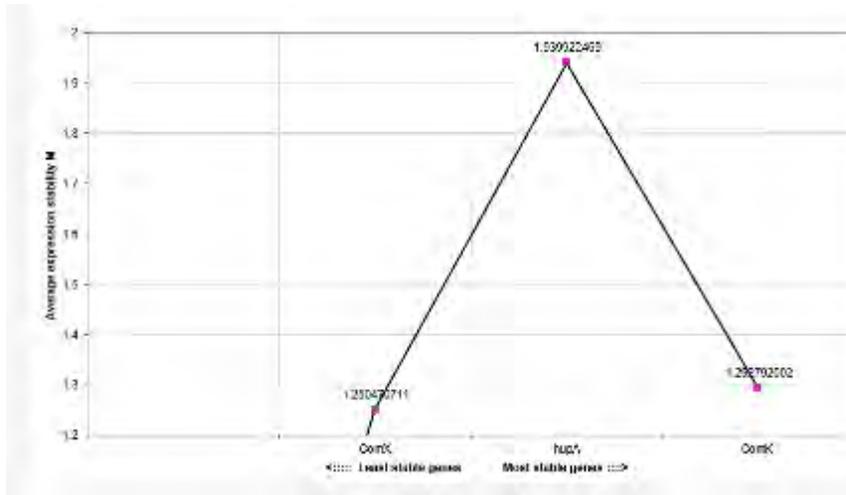


Figura 40. Valores de M obtenidos del algoritmo de geNORM; comK, hupA y comX resultaron los genes con menor variabilidad de expresión, obteniendo el menor valor comX.

## NormFinder

Gene name	Stability value	Best gene	comX
comX	0.034		
ComK	0.013		
hupA	0.042		
phrC	0.021		
sigmaA	0.008		

Figura 39. Valores de estabilidad génica obtenidos del algoritmo NormFinder. La mejor opción para gen de referencia es aquel cuyo valor de estabilidad sea más bajo (comX).

## Anexo 8. Análisis estadístico

En este anexo se presenta el análisis estadístico (realizado en *Sigma Plot V. 12.1, Systat Software Inc*) de la expresión de genes en las que se encontraron diferencias significativas.

### Two Way Analysis of Variance

lunes, julio 18, 2016, 03:05:50 p. m.

**Data source:** 3EG in EG3.JNB

Balanced Design

Dependent Variable: *spollA*

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Failed (P < 0.050)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0.138)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Cultivo	2	567.472	283.736	4.655	0.023
Muestra	2	1493.784	746.892	12.254	<0.001
Cultivo x Muestra	4	1057.703	264.426	4.338	0.012
Residual	18	1097.151	60.953		
Total	26	4216.111	162.158		

Main effects cannot be properly interpreted if significant interaction is determined. This is because the size of a factor's effect depends upon the level of the other factor.

The effect of different levels of Cultivo depends on what level of Muestra is present. There is a statistically significant interaction between Cultivo and Muestra. (P = 0.012)

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Cultivo : 0.594

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Muestra : 0.985

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Cultivo x Muestra : 0.732

Least square means for Cultivo :

**Group Mean**

B 12.578

M 17.797

A 6.577

Std Err of LS Mean = 2.602

Least square means for Muestra :

**Group Mean**

1.000 1.800

2.000 17.728

3.000 17.425

Std Err of LS Mean = 2.602

Least square means for Cultivo x Muestra :

<b>Group</b>	<b>Mean</b>
B x 1.000	1.131
B x 2.000	13.541
B x 3.000	23.062
M x 1.000	0.636
M x 2.000	34.612
M x 3.000	18.144
A x 1.000	3.633
A x 2.000	5.030
A x 3.000	11.069

Std Err of LS Mean = 4.508

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **Muestra within B**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
3.000 vs. 1.000	21.931	3	4.866	0.008	Yes
3.000 vs. 2.000	9.521	3	2.112	0.317	No
2.000 vs. 1.000	12.410	3	2.753	0.155	No

Comparisons for factor: **Muestra within M**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
2.000 vs. 1.000	33.976	3	7.538	<0.001	Yes
2.000 vs. 3.000	16.469	3	3.654	0.047	Yes
3.000 vs. 1.000	17.508	3	3.884	0.034	Yes

Comparisons for factor: **Muestra within A**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
3.000 vs. 1.000	7.436	3	1.650	0.488	No
3.000 vs. 2.000	6.039	3	1.340	0.618	Do Not Test

2.000 vs. 1.000	1.397	3	0.310	0.974	Do Not Test
-----------------	-------	---	-------	-------	-------------

Comparisons for factor: **Cultivo within 1**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
A vs. M	2.996	3	0.665	0.886	No
A vs. B	2.502	3	0.555	0.919	Do Not Test
B vs. M	0.495	3	0.110	0.997	Do Not Test

Comparisons for factor: **Cultivo within 2**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
M vs. A	29.583	3	6.563	<0.001	Yes
M vs. B	21.071	3	4.675	0.011	Yes
B vs. A	8.512	3	1.888	0.395	No

Comparisons for factor: **Cultivo within 3**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
B vs. A	11.994	3	2.661	0.173	No
B vs. M	4.918	3	1.091	0.725	Do Not Test
M vs. A	7.075	3	1.570	0.521	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

## Two Way Analysis of Variance

martes, julio 26, 2016, 04:30:28 p. m.

Data source: 3EG in EG3.JNB

Balanced Design

Dependent Variable: epsA

Normality Test (Shapiro-Wilk) Failed (P < 0.050)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.299)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Cultivo	2	3080.660	1540.330	4.721	0.022
Muestra	2	15976.395	7988.198	24.486	<0.001
Cultivo x Muestra	4	6776.233	1694.058	5.193	0.006
Residual	18	5872.347	326.242		
Total	26	31705.636	1219.448		

Main effects cannot be properly interpreted if significant interaction is determined. This is because the size of a factor's effect depends upon the level of the other factor.

The effect of different levels of Cultivo depends on what level of Muestra is present. There is a statistically significant interaction between Cultivo and Muestra. (P = 0.006)

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Cultivo : 0.603

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Muestra : 1.000

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Cultivo x Muestra : 0.839

Least square means for Cultivo :

**Group Mean**

B 30.848

M 34.996

A 10.549

Std Err of LS Mean = 6.021

Least square means for Muestra :

**Group Mean**

1.000 2.415

2.000 14.873

3.000 59.105

Std Err of LS Mean = 6.021

Least square means for Cultivo x Muestra :

<b>Group</b>	<b>Mean</b>
B x 1.000	1.029
B x 2.000	1.545
B x 3.000	89.969
M x 1.000	1.520
M x 2.000	35.218
M x 3.000	68.250
A x 1.000	4.695
A x 2.000	7.856
A x 3.000	19.096

Std Err of LS Mean = 10.428

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **Cultivo**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.050</b>
M vs. A	24.447	3	4.060	0.026	Yes
M vs. B	4.148	3	0.689	0.878	No
B vs. A	20.299	3	3.371	0.070	No

Comparisons for factor: **Muestra**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.050</b>
3.000 vs. 1.000	56.690	3	9.416	<0.001	Yes
3.000 vs. 2.000	44.232	3	7.347	<0.001	Yes
2.000 vs. 1.000	12.458	3	2.069	0.331	No

Comparisons for factor: **Muestra within B**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
3.000 vs. 1.000	88.940	3	8.529	<0.001	Yes
3.000 vs. 2.000	88.424	3	8.479	<0.001	Yes
2.000 vs. 1.000	0.515	3	0.0494	0.999	No

Comparisons for factor: **Muestra within M**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.05
3.000 vs. 1.000	66.729	3	6.399	<0.001	Yes
3.000 vs. 2.000	33.032	3	3.168	0.091	No
2.000 vs. 1.000	33.698	3	3.231	0.084	No

Comparisons for factor: **Muestra within A**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.05
3.000 vs. 1.000	14.401	3	1.381	0.601	No
3.000 vs. 2.000	11.241	3	1.078	0.730	Do Not Test
2.000 vs. 1.000	3.160	3	0.303	0.975	Do Not Test

Comparisons for factor: **Cultivo within 1**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.05
A vs. B	3.666	3	0.352	0.967	No
A vs. M	3.175	3	0.304	0.975	Do Not Test
M vs. B	0.491	3	0.0471	0.999	Do Not Test

Comparisons for factor: **Cultivo within 2**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.05
M vs. B	33.673	3	3.229	0.084	No
M vs. A	27.362	3	2.624	0.181	Do Not Test
A vs. B	6.311	3	0.605	0.905	Do Not Test

Comparisons for factor: **Cultivo within 3**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.05
B vs. A	70.873	3	6.796	<0.001	Yes
B vs. M	21.719	3	2.083	0.327	No
M vs. A	49.153	3	4.714	0.010	Yes

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

## Two Way Analysis of Variance

martes, julio 26, 2016, 04:31:54 p. m.

**Data source:** 3EG in EG3.JNB

Balanced Design

Dependent Variable: kinB

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Failed (P < 0.050)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0.076)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Cultivo	2	57.411	28.706	7.602	0.004
Muestra	2	283.769	141.884	37.574	<0.001
Cultivo x Muestra	4	22.744	5.686	1.506	0.242
Residual	18	67.970	3.776		
Total	26	431.894	16.611		

The difference in the mean values among the different levels of Cultivo is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in Muestra. There is a statistically significant difference (P = 0.004). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The difference in the mean values among the different levels of Muestra is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in Cultivo. There is a statistically significant difference (P = <0.001). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The effect of different levels of Cultivo does not depend on what level of Muestra is present. There is not a statistically significant interaction between Cultivo and Muestra. (P = 0.242)

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Cultivo : 0.866

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Muestra : 1.000

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Cultivo x Muestra : 0.141

Least square means for Cultivo :

**Group Mean**

B 6.360

M 5.081

A 2.832

Std Err of LS Mean = 0.648

Least square means for Muestra :

**Group Mean**

1.000 2.231

2.000 2.707

3.000 9.334

Std Err of LS Mean = 0.648

Least square means for Cultivo x Muestra :

<b>Group</b>	<b>Mean</b>
B x 1.000	3.352
B x 2.000	4.961
B x 3.000	10.766
M x 1.000	2.074
M x 2.000	1.950
M x 3.000	11.221
A x 1.000	1.269
A x 2.000	1.212
A x 3.000	6.016

Std Err of LS Mean = 1.122

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **Cultivo**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.050</b>
B vs. A	3.528	3	5.446	0.003	Yes
B vs. M	1.278	3	1.973	0.364	No
M vs. A	2.249	3	3.473	0.061	No

Comparisons for factor: **Muestra**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.050</b>
3.000 vs. 1.000	7.103	3	10.966	<0.001	Yes
3.000 vs. 2.000	6.627	3	10.231	<0.001	Yes
2.000 vs. 1.000	0.476	3	0.735	0.863	No

Comparisons for factor: **Muestra within B**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
3.000 vs. 1.000	7.414	3	6.609	<0.001	Yes
3.000 vs. 2.000	5.805	3	5.175	0.005	Yes
2.000 vs. 1.000	1.609	3	1.434	0.578	No

Comparisons for factor: **Muestra within M**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
3.000 vs. 2.000	9.271	3	8.264	<0.001	Yes
3.000 vs. 1.000	9.147	3	8.153	<0.001	Yes
1.000 vs. 2.000	0.124	3	0.111	0.997	No

Comparisons for factor: **Muestra within A**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
3.000 vs. 2.000	4.804	3	4.282	0.019	Yes
3.000 vs. 1.000	4.747	3	4.231	0.020	Yes
1.000 vs. 2.000	0.0566	3	0.0505	0.999	No

Comparisons for factor: **Cultivo within 1**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
B vs. A	2.083	3	1.857	0.406	No
B vs. M	1.278	3	1.139	0.705	Do Not Test
M vs. A	0.805	3	0.718	0.869	Do Not Test

Comparisons for factor: **Cultivo within 2**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
B vs. A	3.749	3	3.342	0.072	No
B vs. M	3.011	3	2.684	0.168	Do Not Test
M vs. A	0.738	3	0.657	0.888	Do Not Test

Comparisons for factor: **Cultivo within 3**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
M vs. A	5.205	3	4.639	0.011	Yes
M vs. B	0.454	3	0.405	0.956	No
B vs. A	4.751	3	4.234	0.020	Yes

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

## Two Way Analysis of Variance

martes, julio 26, 2016, 04:33:35 p. m.

Data source: 3EG in EG3.JNB

Balanced Design

Dependent Variable: kinC

Normality Test (Shapiro-Wilk) Failed (P < 0.050)

Equal Variance Test: Failed (P < 0.050)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Cultivo	2	239.348	119.674	12.865	<0.001
Muestra	2	51.044	25.522	2.744	0.091
Cultivo x Muestra	4	288.431	72.108	7.751	<0.001
Residual	18	167.446	9.303		
Total	26	746.269	28.703		

Main effects cannot be properly interpreted if significant interaction is determined. This is because the size of a factor's effect depends upon the level of the other factor.

The effect of different levels of Cultivo depends on what level of Muestra is present. There is a statistically significant interaction between Cultivo and Muestra. (P = <0.001)

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Cultivo : 0.989

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Muestra : 0.308

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Cultivo x Muestra : 0.973

Least square means for Cultivo :

**Group Mean**

B 4.909

M 2.713

A 9.834

Std Err of LS Mean = 1.017

Least square means for Muestra :

**Group Mean**

1.000 6.545

2.000 7.018

3.000 3.893

Std Err of LS Mean = 1.017

Least square means for Cultivo x Muestra :

<b>Group</b>	<b>Mean</b>
B x 1.000	3.684
B x 2.000	3.710
B x 3.000	7.333
M x 1.000	5.505
M x 2.000	1.035
M x 3.000	1.598
A x 1.000	10.444
A x 2.000	16.308
A x 3.000	2.749

Std Err of LS Mean = 1.761

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **Cultivo**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.050</b>
A vs. M	7.121	3	7.004	<0.001	Yes
A vs. B	4.925	3	4.844	0.008	Yes
B vs. M	2.196	3	2.160	0.302	No

Comparisons for factor: **Muestra**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.050</b>
2.000 vs. 3.000	3.124	3	3.073	0.103	No
2.000 vs. 1.000	0.473	3	0.465	0.942	Do Not Test
1.000 vs. 3.000	2.651	3	2.608	0.184	Do Not Test

Comparisons for factor: **Muestra within B**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
3.000 vs. 1.000	3.649	3	2.072	0.331	No
3.000 vs. 2.000	3.623	3	2.058	0.335	Do Not Test
2.000 vs. 1.000	0.0254	3	0.0144	1.000	Do Not Test

Comparisons for factor: **Muestra within M**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
1.000 vs. 2.000	4.470	3	2.539	0.200	No

1.000 vs. 3.000	3.907	3	2.219	0.284	Do Not Test
3.000 vs. 2.000	0.563	3	0.320	0.972	Do Not Test

Comparisons for factor: **Muestra within A**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.05
2.000 vs. 3.000	13.560	3	7.700	<0.001	Yes
2.000 vs. 1.000	5.864	3	3.330	0.074	No
1.000 vs. 3.000	7.696	3	4.370	0.017	Yes

Comparisons for factor: **Cultivo within 1**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.05
A vs. B	6.760	3	3.839	0.036	Yes
A vs. M	4.939	3	2.805	0.145	No
M vs. B	1.821	3	1.034	0.749	No

Comparisons for factor: **Cultivo within 2**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.05
A vs. M	15.273	3	8.673	<0.001	Yes
A vs. B	12.598	3	7.154	<0.001	Yes
B vs. M	2.675	3	1.519	0.542	No

Comparisons for factor: **Cultivo within 3**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.05
B vs. M	5.735	3	3.257	0.081	No
B vs. A	4.585	3	2.604	0.185	Do Not Test
A vs. M	1.150	3	0.653	0.890	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

## Two Way Analysis of Variance

martes, julio 26, 2016, 04:36:38 p. m.

**Data source:** 3EG in EG3.JNB

Balanced Design

Dependent Variable: phrC

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Failed (P < 0.050)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0.401)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Cultivo	2	50.158	25.079	2.851	0.084
Muestra	2	153.892	76.946	8.746	0.002
Cultivo x Muestra	4	60.084	15.021	1.707	0.192
Residual	18	158.364	8.798		
Total	26	422.499	16.250		

The difference in the mean values among the different levels of Cultivo is not great enough to exclude the possibility that the difference is just due to random sampling variability after allowing for the effects of differences in Muestra. There is not a statistically significant difference (P = 0.084).

The difference in the mean values among the different levels of Muestra is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in Cultivo. There is a statistically significant difference (P = 0.002). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The effect of different levels of Cultivo does not depend on what level of Muestra is present. There is not a statistically significant interaction between Cultivo and Muestra. (P = 0.192)

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Cultivo : 0.325

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Muestra : 0.918

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Cultivo x Muestra : 0.183

Least square means for Cultivo :

**Group Mean**

B 4.976

M 1.670

A 2.918

Std Err of LS Mean = 0.989

Least square means for Muestra :

**Group Mean**

1.000 1.214

2.000 6.547

3.000 1.804

Std Err of LS Mean = 0.989

Least square means for Cultivo x Muestra :

<b>Group</b>	<b>Mean</b>
B x 1.000	1.669
B x 2.000	10.653
B x 3.000	2.606
M x 1.000	0.934
M x 2.000	2.274
M x 3.000	1.802
A x 1.000	1.037
A x 2.000	6.714
A x 3.000	1.003

Std Err of LS Mean = 1.713

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **Cultivo**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.050</b>
B vs. M	3.306	3	3.343	0.072	No
B vs. A	2.058	3	2.081	0.327	Do Not Test
A vs. M	1.248	3	1.262	0.652	Do Not Test

Comparisons for factor: **Muestra**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.050</b>
2.000 vs. 1.000	5.334	3	5.394	0.004	Yes
2.000 vs. 3.000	4.744	3	4.798	0.009	Yes
3.000 vs. 1.000	0.590	3	0.597	0.907	No

Comparisons for factor: **Muestra within B**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
2.000 vs. 1.000	8.985	3	5.246	0.004	Yes
2.000 vs. 3.000	8.048	3	4.699	0.010	Yes
3.000 vs. 1.000	0.937	3	0.547	0.921	No

Comparisons for factor: **Muestra within M**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.05
2.000 vs. 1.000	1.340	3	0.782	0.846	No
2.000 vs. 3.000	0.472	3	0.276	0.979	Do Not Test
3.000 vs. 1.000	0.868	3	0.507	0.932	Do Not Test

Comparisons for factor: **Muestra within A**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.05
2.000 vs. 3.000	5.711	3	3.335	0.073	No
2.000 vs. 1.000	5.676	3	3.315	0.075	Do Not Test
1.000 vs. 3.000	0.0345	3	0.0201	1.000	Do Not Test

Comparisons for factor: **Cultivo within 1**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.05
B vs. M	0.734	3	0.429	0.951	No
B vs. A	0.631	3	0.369	0.963	Do Not Test
A vs. M	0.103	3	0.0601	0.999	Do Not Test

Comparisons for factor: **Cultivo within 2**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.05
B vs. M	8.379	3	4.893	0.008	Yes
B vs. A	3.940	3	2.300	0.261	No
A vs. M	4.440	3	2.592	0.187	No

Comparisons for factor: **Cultivo within 3**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.05
B vs. A	1.603	3	0.936	0.788	No
B vs. M	0.804	3	0.469	0.941	Do Not Test
M vs. A	0.799	3	0.467	0.942	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

## Two Way Analysis of Variance

lunes, julio 18, 2016, 03:00:56 p. m.

**Data source:** 3EG in EG3.JNB

Balanced Design

Dependent Variable: srfAA

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Failed (P < 0.050)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0.545)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Cultivo	2	62.679	31.339	3.933	0.038
Muestra	2	13.288	6.644	0.834	0.451
Cultivo x Muestra	4	214.036	53.509	6.715	0.002
Residual	18	143.440	7.969		
Total	26	433.443	16.671		

Main effects cannot be properly interpreted if significant interaction is determined. This is because the size of a factor's effect depends upon the level of the other factor.

The effect of different levels of Cultivo depends on what level of Muestra is present. There is a statistically significant interaction between Cultivo and Muestra. (P = 0.002)

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Cultivo : 0.493

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Muestra : 0.0500

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Cultivo x Muestra : 0.942

Least square means for Cultivo :

**Group Mean**

B 3.902

M 1.763

A 5.481

Std Err of LS Mean = 0.941

Least square means for Muestra :

**Group Mean**

1.000 4.693

2.000 3.078

3.000 3.377

Std Err of LS Mean = 0.941

Least square means for Cultivo x Muestra :

<b>Group</b>	<b>Mean</b>
B x 1.000	1.014
B x 2.000	2.159
B x 3.000	8.534
M x 1.000	3.172
M x 2.000	1.523
M x 3.000	0.595
A x 1.000	9.892
A x 2.000	5.551
A x 3.000	1.001

Std Err of LS Mean = 1.630

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **Muestra within B**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
3.000 vs. 1.000	7.520	3	4.614	0.012	Yes
3.000 vs. 2.000	6.376	3	3.912	0.033	Yes
2.000 vs. 1.000	1.144	3	0.702	0.874	No

Comparisons for factor: **Muestra within M**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
1.000 vs. 3.000	2.577	3	1.581	0.516	No
1.000 vs. 2.000	1.649	3	1.012	0.758	Do Not Test
2.000 vs. 3.000	0.928	3	0.569	0.915	Do Not Test

Comparisons for factor: **Muestra within A**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
1.000 vs. 3.000	8.891	3	5.455	0.003	Yes
1.000 vs. 2.000	4.341	3	2.664	0.172	No
2.000 vs. 3.000	4.549	3	2.791	0.148	No

Comparisons for factor: **Cultivo within 1**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
A vs. B	8.878	3	5.447	0.003	Yes
A vs. M	6.720	3	4.123	0.024	Yes

M vs. B	2.158	3	1.324	0.625	No
---------	-------	---	-------	-------	----

Comparisons for factor: **Cultivo within 2**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
A vs. M	4.028	3	2.471	0.216	No
A vs. B	3.392	3	2.081	0.327	Do Not Test
B vs. M	0.635	3	0.390	0.959	Do Not Test

Comparisons for factor: **Cultivo within 3**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
B vs. M	7.939	3	4.871	0.008	Yes
B vs. A	7.533	3	4.622	0.011	Yes
A vs. M	0.406	3	0.249	0.983	No

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

## Two Way Analysis of Variance

domingo, julio 24, 2016, 10:07:46 p. m.

Data source: 3EG in EG3.JNB

Balanced Design

Dependent Variable: bmyD

Normality Test (Shapiro-Wilk) Failed (P < 0.050)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.136)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Cultivo	2	4930.698	2465.349	4.285	0.030
Muestra	2	4121.658	2060.829	3.582	0.049
Cultivo x Muestra	4	15961.513	3990.378	6.936	0.001
Residual	18	10355.772	575.321		
Total	26	35369.641	1360.371		

Main effects cannot be properly interpreted if significant interaction is determined. This is because the size of a factor's effect depends upon the level of the other factor.

The effect of different levels of Cultivo depends on what level of Muestra is present. There is a statistically significant interaction between Cultivo and Muestra. (P = 0.001)

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Cultivo : 0.544

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Muestra : 0.440

Power of performed test with alpha = 0.0500: for Cultivo x Muestra : 0.951

Least square means for Cultivo :

Group	Mean
B	9.390
M	35.479
A	40.079

Std Err of LS Mean = 7.995

Least square means for Muestra :

Group	Mean
1.000	23.764
2.000	45.202
3.000	15.982

Std Err of LS Mean = 7.995

Least square means for Cultivo x Muestra :

Group	Mean
B x 1.000	1.055
B x 2.000	3.779
B x 3.000	23.337
M x 1.000	0.894
M x 2.000	90.138
M x 3.000	15.406
A x 1.000	69.344
A x 2.000	41.687
A x 3.000	9.205

Std Err of LS Mean = 13.848

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **Muestra within B**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.05
3.000 vs. 1.000	22.282	3	1.609	0.504	No
3.000 vs. 2.000	19.557	3	1.412	0.587	Do Not Test

2.000 vs. 1.000	2.725	3	0.197	0.989	Do Not Test
-----------------	-------	---	-------	-------	-------------

Comparisons for factor: **Muestra within M**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
2.000 vs. 1.000	89.244	3	6.444	<0.001	Yes
2.000 vs. 3.000	74.733	3	5.397	0.004	Yes
3.000 vs. 1.000	14.511	3	1.048	0.743	No

Comparisons for factor: **Muestra within A**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
1.000 vs. 3.000	60.140	3	4.343	0.017	Yes
1.000 vs. 2.000	27.657	3	1.997	0.356	No
2.000 vs. 3.000	32.483	3	2.346	0.248	No

Comparisons for factor: **Cultivo within 1**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
A vs. M	68.450	3	4.943	0.007	Yes
A vs. B	68.289	3	4.931	0.007	Yes
B vs. M	0.160	3	0.0116	1.000	No

Comparisons for factor: **Cultivo within 2**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
M vs. B	86.359	3	6.236	0.001	Yes
M vs. A	48.451	3	3.499	0.058	No
A vs. B	37.908	3	2.737	0.158	No

Comparisons for factor: **Cultivo within 3**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0.05</b>
B vs. A	14.132	3	1.021	0.754	No
B vs. M	7.931	3	0.573	0.914	Do Not Test
M vs. A	6.201	3	0.448	0.946	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.