



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Efecto de la densidad celular en la esporulación de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* 83

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Yesenia Leila Mallqui Crispin

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Leobardo Serrano Carreón – Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Alfredo Martínez Jiménez – Instituto de Biotecnología, UNAM.  
Dr. Christian Sohlenkamp – Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.

CUERNAVACA, MOR. Noviembre, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 y la tutoría del Dr. Alfredo Martínez Jiménez y Dr. Christian Sohlenkamp. Para la realización del mismo se contó con el apoyo económico del proyecto CONACyT 240445, la beca de maestría CONACyT 406609 y programa de apoyo al estudiante de posgrado (PAEP-UNAM)

## INDICE GENERAL

Índice general.....	iii
Índice de cuadros y figuras.....	v
Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
2. Antecedentes.....	4
2.1 Diferenciación celular en <i>Bacillus subtilis</i> y reguladores maestros.....	4
2.2 Esporulación en <i>Bacillus subtilis</i> .....	5
2.3 Regulador maestro de la esporulación: spo0A.....	7
2.3.1 Cinasas y esporulación.....	7
2.3.2 Moléculas de <i>Quorum Sensing</i> y esporulación.....	9
2.4 <i>Bacillus</i> sp. 83.....	14
3. Justificación.....	15
4. Hipótesis.....	16
5. Objetivos.....	16
5.1 Objetivo general.....	16
5.2 Objetivos específicos.....	16
6. Estrategia experimental.....	17
7. Materiales y métodos.....	20
7.1 Microorganismo.....	20
7.2 Medios de cultivo.....	20
7.3 Cultivo en lote y lote alimentado a diferentes densidades celulares.....	21
7.4 Métodos analíticos.....	23
7.4.1 Conteo de células.....	23
7.4.2 Cuantificación de glucosa residual.....	24

7.4.3 Tinción de esporas.....	24
7.4.4 Cuantificación de surfactina y bacilomicina D.....	25
7.4.5 Determinación de ácidos orgánicos.....	26
7.4.6 Determinación de la viscosidad.....	27
7.4.7 RT-qPCR.....	27
7.5 Análisis estadístico.....	30
8. Resultados.....	31
8.1 Análisis <i>in silico</i> de las secuencias de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 83.....	31
8.2 Cultivo en lote y lote alimentado de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 83.....	33
8.2.1 Crecimiento y esporulación.....	33
8.2.2 Producción de surfactina y bacilomicina.....	38
8.2.3 Ácidos orgánicos.....	40
8.2.4 Viscosidad.....	42
8.2.5 Niveles de expresión de genes involucrados en <i>quórum sensing</i> y diferenciación celular.....	43
9. Discusión.....	54
10. Conclusiones.....	64
11. Perspectivas.....	65
12. Anexos.....	66
13. Referencias.....	70

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 2.1 Esquema general de las diferentes mecanismos de regulación involucrados en la diferenciación celular de <i>B. subtilis</i> .....	5
Figura 2.2 Morfogénesis y regulación génica durante la formación de la spora .....	6
Figura 2.3 <i>Quorum sensing</i> y esporulación .....	12
Figura 2.4 Esporulación dependiente de la densidad celular en la cepa <i>B. subtilis</i> AG130 .....	13
Figura 6.1 Estrategia experimental .....	19
Figura 7.1 Bioreactor Dusher de 3L .....	22
Figura 8.1. Perfil de crecimiento y glucosa residual .....	34
Figura 8.2 Porcentaje de esporulación .....	36
Figura 8.3 Tiempo (horas) desde que inició la limitación nutricional hasta que se alcanzó 80% de esporulación .....	37
Figura 8.4 Producción de surfactina .....	39
Figura 8.5 Producción de bacilomicina D .....	39
Figura 8.6. Concentración específica máxima de lipopéptidos por célula.....	40
Figura 8.7.Producción de acetoína, butanodiol y ácido acético a diferentes etapas del cultivo ....	41
Figura 8.8.Viscosidad (cP) en diferentes etapas del cultivo.....	42
Figura 8.9.Viscosidad (cP) a 1 hora después de agotada la glucosa .....	43
Figura 8.10. Niveles de expresión de <i>bmyD</i> a diferentes etapas del cultivo .....	45
Figura 8.11.Niveles de expresión de <i>sfAA</i> a diferentes etapas del cultivo .....	46
Figura 8.12.Niveles de expresión de <i>kinB</i> a diferentes etapas del cultivo .....	47
Figura 8.13.Niveles de expresión de <i>kinC</i> a diferentes etapas del cultivo .....	48
Figura 8.14.Niveles de expresión de <i>spoIIAA</i> a diferentes etapas del cultivo .....	49
Figura 8.15. Niveles de expresión de <i>epsA</i> a diferentes etapas del cultivo .....	50
Figura 9.1 Expresión de genes a alta densidad celular sin limitación nutricional.....	57
Figura 9.2 Expresión de genes a 30% esporulación.....	59
Figura. 9.3. Diferenciación celular en diferentes ciclos celulares .....	62

Tabla 6.1 Cultivos planteados en este trabajo e información esperada de cada uno .....	18
Tabla 7.1. Oligos para análisis de transcritos .....	29
Tabla 8.1 Análisis de los siguientes genes y proteínas de <i>B. amyloliquefaciens</i> 83 .....	32
Tabla 8.2. Valores de velocidad de crecimiento, Xmax y rendimiento de los cultivos .....	35
Tabla 8.3 Porcentaje de esporulación (Spo max) y velocidad de esporulación .....	35
Tabla 8.4 Porcentaje de células lisadas y esporas con respecto a Xmax .....	37
Tabla 8.5. Puntos de muestreo para el análisis de la producción de surfactina, bacilomicina, ácidos orgánicos y viscosidad.....	38
Tabla 8.6. Genes que se sobreexpresan en fase de crecimiento.....	51
Tabla 8.7. Genes que se sobreexpresan una hora después de agotarse la glucosa .....	52
Tabla 8.8. Genes que se sobreexpresan al 30% esporulación.....	53

## RESUMEN

La cepa *Bacillus amyloliquefaciens* 83 es una bacteria capaz de esporular y producir antibióticos. Actualmente se comercializa bajo el nombre de Fungifree AB®, para su aplicación como biofungicida. La formulación de agentes de control biológico son una alternativa frente al uso de agroquímicos, sin embargo el proceso que desencadena la esporulación no ha sido del todo comprendido. Si bien se conoce que la limitación nutricional es un factor que provoca la diferenciación celular hacia esporas, se conoce también que la densidad celular a través de las moléculas de comunicación celular que se acumulan y luego son sensadas, pueden generar cambios en la expresión de genes que desencadenan diferenciación celular hacia tipos celulares intermedios como células productoras de matriz, células caníbales, células competentes y eventualmente esporulación. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la densidad celular sobre el proceso de esporulación en *Bacillus amyloliquefaciens* 83. Se desarrollaron cultivos en lote y lote alimentado: Cultivo X7L (Concentración celular inicial:  $X_0 = 9.6 \pm 0.3 \times 10^6$  células/mL, concentración celular máxima:  $X_{max} = 5.2 \pm 0.4 \times 10^9$  células/mL), cultivo X9L ( $X_0 = 1.0 \pm 0.1 \times 10^9$  células/mL,  $X_{max} = 4.5 \pm 0.5 \times 10^9$  células/mL) y un cultivo alimentado, cultivo X9AL ( $X_0 = 1.0 \pm 0.2 \times 10^9$  células/mL,  $X_{max} = 2.0 \pm 0.4 \times 10^{10}$  células/mL). A partir de estos cultivos se caracterizaron las cinéticas de crecimiento y esporulación y se cuantificaron lipopéptidos (surfactina y bacilomicina D), ácidos orgánicos (acetoína, ácido acético, 2,3 butanodiol), viscosidad, expresión relativa de genes involucrados en la esporulación y *quorum sensing*. Los resultados muestran que los cultivos X7L y X9AL son los que registran mayor velocidad de esporulación lo cual corresponde con el porcentaje de células lisadas y producción de lipopéptidos y ácidos orgánicos. Además, que el gen que reporta el inicio de la esporulación, *spolI*AA, se ve sobreexpresado  $4.5 \pm 2.5$  veces en X9L y  $143.0 \pm 108.0$  veces en el cultivo alimentado, X9AL, aún en condiciones bajo las cuales no hay limitación nutricional. Sin embargo, la población de esporas se puede apreciar sólo cuando existe limitación nutricional. Por lo tanto, la limitación nutricional compromete a las células a esporular y permite el crecimiento exponencial de la población de esporas mientras que una mayor producción de metabolitos de *quorum sensing* y de reserva energética permiten mayor velocidad de esporulación.



## ABSTRACT

*Bacillus amyloliquefaciens* 83 is a bacterium capable of sporulating and producing antibiotics; this microorganism is currently marketed under the trade name, Fungifree AB®, to be used as a biofungicide. Formulation of biological control agents is an alternative to the use of agrochemicals and the understanding of the factors determining sporulation in this strain is essential in order to design more efficient process for large scale production of spores.

Large studies have been developed to determine the signal that triggers sporulation process since nutritional limitation was traditionally thought to be the main factor. Nevertheless, it is also known that *Bacillus* produce signaling molecules in a cell density dependent way, which are capable to trigger changes in sporulation genes expression. The objective of this study is to evaluate cell density effect in the sporulation of *Bacillus amyloliquefaciens* 83. Several cultures with different cell density were analyzed: X7L culture ( $X_0 = 9.6 \pm 0.3 \times 10^6$  cell/mL,  $X_{max} = 5.2 \pm 0.4 \times 10^9$  cell/mL), X9L culture ( $X_0 = 1.0 \pm 0.1 \times 10^9$  cell/mL,  $X_{max} = 4.5 \pm 0.5 \times 10^9$  cell/mL) and a fed batch culture, X9AL ( $X_0 = 1.0 \pm 0.2 \times 10^9$  cell/mL,  $X_{max} = 2.0 \pm 0.4 \times 10^{10}$  cell/mL). Growth and sporulation kinetics as well as the synthesis of *quorum sensing* molecules (surfactin and bacillomycin D), organic acids production (acetoin, acetic acid and 2,3 butanediol), viscosity and the transcriptional level of the different genes involved in the sporulation were assessed. The results show that X7L and X9AL cultures reached the highest sporulation rates, which corresponds to lysed cell percentage, lipopeptides and organic acid production. Additionally and interestingly, *spoIIAA* gen (initiation of sporulation) is overexpressed  $4.5 \pm 2.5$  times in X9L and  $143.0 \pm 108.0$  times in X9AL, under high density levels; however, nutritional depletion was required to observe spores. Therefore, nutritional limitation commits cell to sporulate and triggers the exponential growth of spores population, while sporulation rate increases at high production of molecules of *quorum sensing* and energy reserves.

## 1. INTRODUCCIÓN

El género *Bacillus* ha sido motivo de diversos estudios y desempeña diferentes papeles en la microbiología aplicada; entre los cuales, se resalta su uso en la agricultura como biocontrolador de fitopatógenos para lo cual cuenta con la capacidad de producir antibióticos, enzimas extracelulares y formar esporas. La esporulación, corresponde a una estrategia de diferenciación celular presente en diversos organismos para hacer frente a condiciones adversas (Lopez & Kolter, 2010). En el proceso de esporulación están involucradas proteínas reguladoras de respuesta controladas por una vía de fosforilación que activan la expresión de genes. Se han desarrollado estudios para determinar la señal que dispara el proceso de esporulación, ya que tradicionalmente se asume que el factor determinante es el estrés nutricional (Quisel *et al.*, 2001; Fujita *et al.*, 2005). Sin embargo, se conoce además que *Bacillus* produce moléculas de señalización, dependientes de la densidad celular, las cuales provocan cambios en la expresión de genes involucrados en la esporulación. El presente estudio evaluó el efecto de la densidad celular en la esporulación de *Bacillus* sp. 83 de manera independiente al estrés nutricional.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Diferenciación celular en *Bacillus subtilis* y reguladores maestros.

*Bacillus subtilis* se diferencia en subpoblaciones fenotípicamente diferentes pero genéticamente iguales. La coexistencia de estos tipos celulares implica que *Bacillus subtilis* cuente con una red compleja de genes y proteínas (Fig 2.1) que monitorean una variedad de señales, las cuales activan mediante fosforilación a tres reguladores maestros principales: DegU, Spo0A y ComA.

Estos reguladores controlan la expresión de un conjunto de genes que desencadenan los distintos tipos celulares a partir de células no diferenciadas, como respuesta a diferentes condiciones y señales. Entre estos estadios diferenciados se pueden encontrar a células competentes, que son capaces de captar ADN exógeno; células productoras de matriz extracelular que están especializadas en secretar los componentes principales de la matriz: polisacárido extracelular (EPS) y la proteína estructural asociada a matriz, TasA (Aguilar *et al.*, 2010); células caníbales, las cuales secretan dos toxinas de naturaleza peptídica: Skf y Sdp, y al mismo tiempo la maquinaria para resistir la acción de estas moléculas; células que producen y secretan proteasas para obtener pequeños péptidos que servirán como sustrato; y células en vías de esporulación. (Lopez & Kolter, 2010).

De esta manera *Bacillus subtilis* ha desarrollado estas estrategias para monitorear y responder a los cambios en su medio externo. Algunas de las señales que detecta pueden ser fluctuaciones de temperatura, concentración de oxígeno, moléculas de origen microbiano, disponibilidad de nutrientes, etc. Las cuales sirven como señales que activan diferentes vías y disparan cambios en la expresión de genes que le permiten adaptarse a diferentes escenarios. Sin embargo, no toda la población celular responde de igual manera por lo que se producen subpoblaciones que coexisten en un mismo medio (Shank & Kolter, 2011).

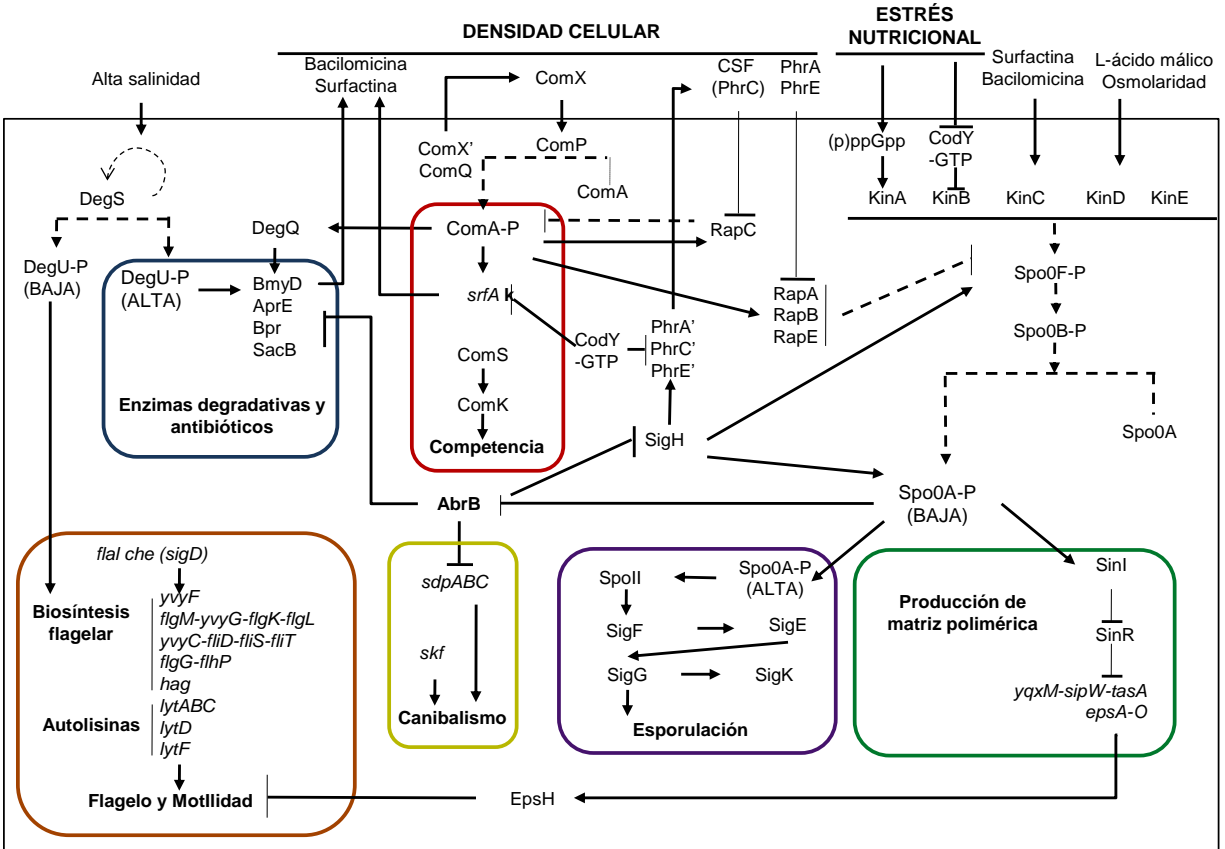


Figura 2.1. Esquema general de las diferentes mecanismos de regulación involucrados en la diferenciación celular de *B. subtilis*. (Adaptada de Lopez *et al.*, 2009a)

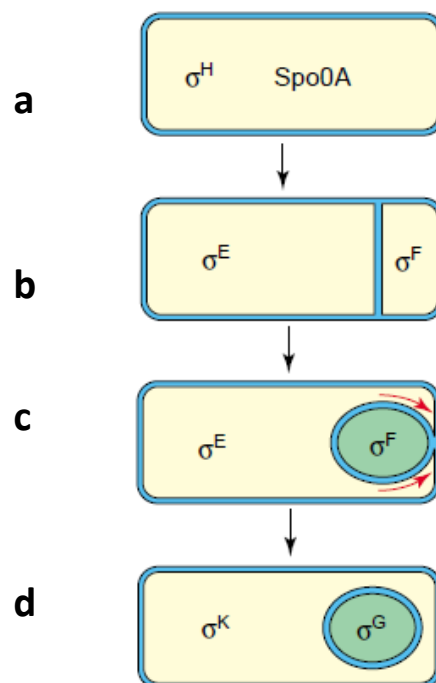
## 2.2 Esporulación en *Bacillus subtilis*

La mayor parte de información recopilada para este trabajo sobre el proceso de esporulación, moléculas asociadas a ésta y la diferenciación hacia otras formas celulares fueron reportadas en *Bacillus subtilis*, sin embargo se indicará cuando se haga referencia a otras especies.

*Bacillus subtilis* es capaz de diferenciarse a células llamadas endosporas como estrategia para sobrevivir frente a condiciones adversas. Las esporas son células que se encuentran en un estado de mínima actividad metabólica y son células capaces de sobrevivir largos periodos de tiempo y resistir condiciones tales como altas temperaturas, desecación, agentes químicos e irradiación UV (Errington, 2003). Durante la esporulación, la célula bacteriana sufre cambios dramáticos iniciando el proceso con una división asimétrica para generar dos células hijas de diferente tamaño, la

preespora y la célula madre. La formación de endosporas inicia con la duplicación del cromosoma, seguido por la formación del septo asimétrico. Luego éste es degradado para dar lugar a una migración de la membrana y producirse el engullimiento. En esta etapa el factor sigmaF es quien dirige los cambios producidos (Fig 2.2 b y c) exclusivamente en la preespora (Piggot & Gilbert, 2004). En esta fase la esporulación es un proceso irreversible.

Más tarde se forma una capa externa de proteínas llamada cubierta de la espora, responsable de la resistencia a factores como alta temperatura, desecación, radiación solar, solventes químicos, entre otros. Finalmente la célula madre se lisa y libera la espora (Errington, 2003).



**Figura 2.2.** Morfogénesis y regulación génica durante la formación de la espora (Piggot & Gilbert, 2004). Activación de sigmaH y spo0A (a), activación de sigmaF y sigmaE en la preespora y la célula madre, respectivamente (b). Engullimiento de la preespora (c). sigmaG y sigmaK se activan permitiendo la expresión de componentes estructurales de la preespora. (d) La preespora se separa de la célula madre y se produce una segunda ronda de expresión génica compartimentalizada. Se activa sigmaG en la preespora y sigmaK en la célula madre. Estos últimos factores activan la transcripción de genes que construyen componentes estructurales de la espora.

### 2.3 Regulador maestro de la esporulación: Spo0A

Spo0A pertenece a la familia de proteínas reguladoras de respuesta capaces de unirse al ADN. Este factor de transcripción está activo al estar fosforilado y gobierna el ingreso a diferentes vías de

diferenciación celular como la esporulación. La activación de Spo0A es el resultado de una vía de fosforilación, en la cual están involucradas proteínas cinasas, fosfatasas y proteínas portadoras del grupo fosfato. Las cinasas que componen esta vía fosforilan a Spo0F. Éste transfiere su grupo fosfato a Spo0B quien finalmente fosforila a Spo0A (Fig. 2.1). Además, su acción está controlada a nivel de síntesis la cual el mismo Spo0A es capaz de activar, y retroalimentar, debido a que estimula la expresión de *sigmaH*. Spo0A-P reprime la transcripción del gen *abrB* quien codifica al represor AbrB, liberando así la transcripción de *sigmaH*, y éste a su vez activa la expresión de *spo0A* y otros genes de la vía de fosforilación. Una vez activado, Spo0A aumenta su capacidad para unirse a la secuencia conocida como caja 0A, por medio de su dominio de unión al DNA localizado en la región C-terminal (Fujita & Losick, 2005; Fujita *et al.*, 2005; Stephenson & Hoch, 2002) (Figura 2.3).

Se ha reportado que Spo0A es capaz de controlar 121 genes que incluye 24 operones (Molle *et al.*, 2003). Sin embargo, los genes difieren en su respuesta en presencia de un nivel alto o bajo de Spo0A-P, esto significa que algunos son activados y otros reprimidos según la concentración de Spo0A-P. Esto fue demostrado al observar que a altas dosis de Spo0A-P se presenta el nivel de máxima expresión de genes involucrados principalmente en esporulación y la ausencia de expresión de otros como los involucrados en división celular y movilidad; por otro lado, a bajos niveles de Spo0A-P se produce la máxima expresión de genes como *skf* y *sdp* (codificantes para toxinas involucradas en el canibalismo). De esta manera, esto permite que una célula tome diferentes rutas de diferenciación según el nivel de Spo0A-P y su acumulación gradual ya que Spo0A-P no sólo controla genes de esporulación sino también aquellos involucrados en el canibalismo y la producción de matriz extracelular (Fujita *et al.*, 2005).

### 2.3.1 Cinasas y esporulación

El inicio de la esporulación está gobernado por la proteína Spo0A fosforilada. La activación de Spo0A es mediada por una vía que incluye cinco histidin cinasas (KinA-E), entre las que KinA y KinB son consideradas como las principales involucradas en la esporulación (Tojo *et al.*, 2013); éstas se autofosforilan y transfieren indirectamente el grupo fosfato a Spo0A por medio de dos proteínas intermediarias, Spo0F y Spo0B (Fig.2.1). Hasta la actualidad se ha relacionado la acción de estas

cinastas con el estrés nutricional, aunque no ha sido identificada la señal inicial que desencadena la esporulación.

KinA es una proteína homodimérica. El dominio C-terminal de esta proteína es conocida como dominio His-KA y está involucrado en la autofosforilación y la transferencia del grupo fosfato, mientras que el dominio N-terminal es un módulo sensor que varía en tamaño y complejidad entre diferentes histidin cinastas, y es conocido como dominio PAS (dominio estructural de proteínas de señalización de procariontes y eucariotes) el cual frecuentemente media interacciones proteína-proteína, unión a ligandos que incluyen grupos hemo, flavinas, ácidos carboxílicos y iones divalentes. Si bien se plantea que esta cinasa estaría sensando una señal que le permite autofosforilarse; no se conoce hasta el momento la molécula o señal específica que sensa KinA. Esto ha llevado al planteamiento de un posible papel del dominio N-terminal netamente estructural, y que sería la expresión de KinA la que está regulada, asociada al estrés por nutrientes, (Winnen *et al.*, 2013; Eswaramoorthy *et al.*, 2010) y su expresión hasta un nivel umbral desencadenaría la esporulación de manera irreversible (Eswaramoorthy *et al.*, 2010; Tojo *et al.*, 2013). Sin embargo, se tienen indicios de que el estado nutricional no es lo único que estaría activando la esporulación.

Por su parte KinB es una cinasa asociada a membrana y cuya expresión es regulada por el represor CodY. CodY es un represor que sensa el nivel intracelular de GTP, de esta manera cuando las células están creciendo en un medio rico en nutrientes el nivel intracelular de GTP es elevado y los genes bajo el control de CodY son reprimidos, mientras que si las células crecen en limitación por nutrientes el nivel de GTP es bajo, resultando en la derepresión de genes regulados por CodY, entre ellos el gen de la cinasa B (Tojo *et al.*, 2013).

KinC y KinD que también participan en la cascada de fosforilación para activar al regulador Spo0A, son activadas por señales distintas a la limitación de nutrientes (Figura 1). La cinasa de membrana, KinC, es activada por la molécula de señalización surfactina a través de un escape de iones potasio con la formación de poros en la membrana (Lopez, *et al.*, 2009b). Asimismo, en *Bacillus amyloliquefaciens*, se ha demostrado que el lipopéptido bacilomicina D es capaz de incrementar la

expresión de KinC. Aunque no se conoce el mecanismo por el que activa a esta cinasa, se ha postulado que utiliza un mecanismo diferente al de la surfactina (Xu *et al.*, 2013).

La cinasa D (KinD) actúa como un osmosensor cuya actividad cinasa aumenta, en respuesta a un incremento de la presión osmótica debido a la síntesis de matriz, estimulando la fosforilación de Spo0A (Rubinstein *et al.*, 2012). Además se ha descrito que KinD cuenta con un dominio denominado CACHE el cual aparentemente responde a pequeñas moléculas liberadas por la planta colonizada y a presencia de glicerol y manganeso (Shemesh & Chai, 2013).

Tanto KinD y KinC están relacionadas con la diferenciación de *Bacillus* hacia células productoras de matriz extracelular, estado intermedio de un grupo que se diferencian a esporas cuando se encuentran en *biofilms* (Aguilar *et al.*, 2010).

### 2.3.2 Moléculas de *quorum sensing* y esporulación.

*Quorum sensing* es un sistema de comunicación intercelular utilizado por *Bacillus*. Este es un fenómeno dependiente de la densidad celular y se basa en la acumulación de moléculas pequeñas denominadas moléculas de *quorum sensing*, que al alcanzar una concentración umbral ejercen alteración en la expresión de genes y median una variedad de respuestas que incluyen la formación de *biofilm* y esporulación (Lazazzera, 2000).

*Bacillus subtilis* cuenta con tres tipos de péptidos señalizadores celulares: i) péptido extracelular modificado, ComX, que interactúa extracelularmente con su receptor, ii) lipopéptidos antibióticos, como la surfactina, que interactúan extracelularmente con su receptor, y iii) pentapéptidos conocidos como péptidos Phr los cuales son internalizados para activar sus proteínas blanco, Rap. De estos, PhrC o factor de esporulación y competencia (CSF, por sus siglas en inglés de *Competence and Sporulation Factor*) forma parte del sistema ComP-ComA (Fig 2.3).

**ComX:** es un péptido de diez aminoácidos, que regula el desarrollo de competencia genética y esporulación. Esta feromona es secretada, y una vez en el medio extracelular actúa a través de la activación de una proteína sensora, la histidina cinasa ComP quien se fosforila y transfiere su



fosfato al regulador de respuesta ComA, éste es un factor de transcripción que regula la transcripción de alrededor de 20 genes, involucrados en procesos como competencia genética, producción de exopolisacárido, producción de antibióticos, formación de *biofilm*, entre otros. El efecto en la expresión de los genes gobernados por ComA es proporcional a la densidad celular (Comella y Grossman, 2005). La secuencia de *comX* ha sido identificada en otras cepas cercanas a *Bacillus subtilis* y varía según la especie. Este polimorfismo está asociado con la especificidad de la respuesta de *quorum sensing* o comunicación intra-especie (Tortosa, 2001).

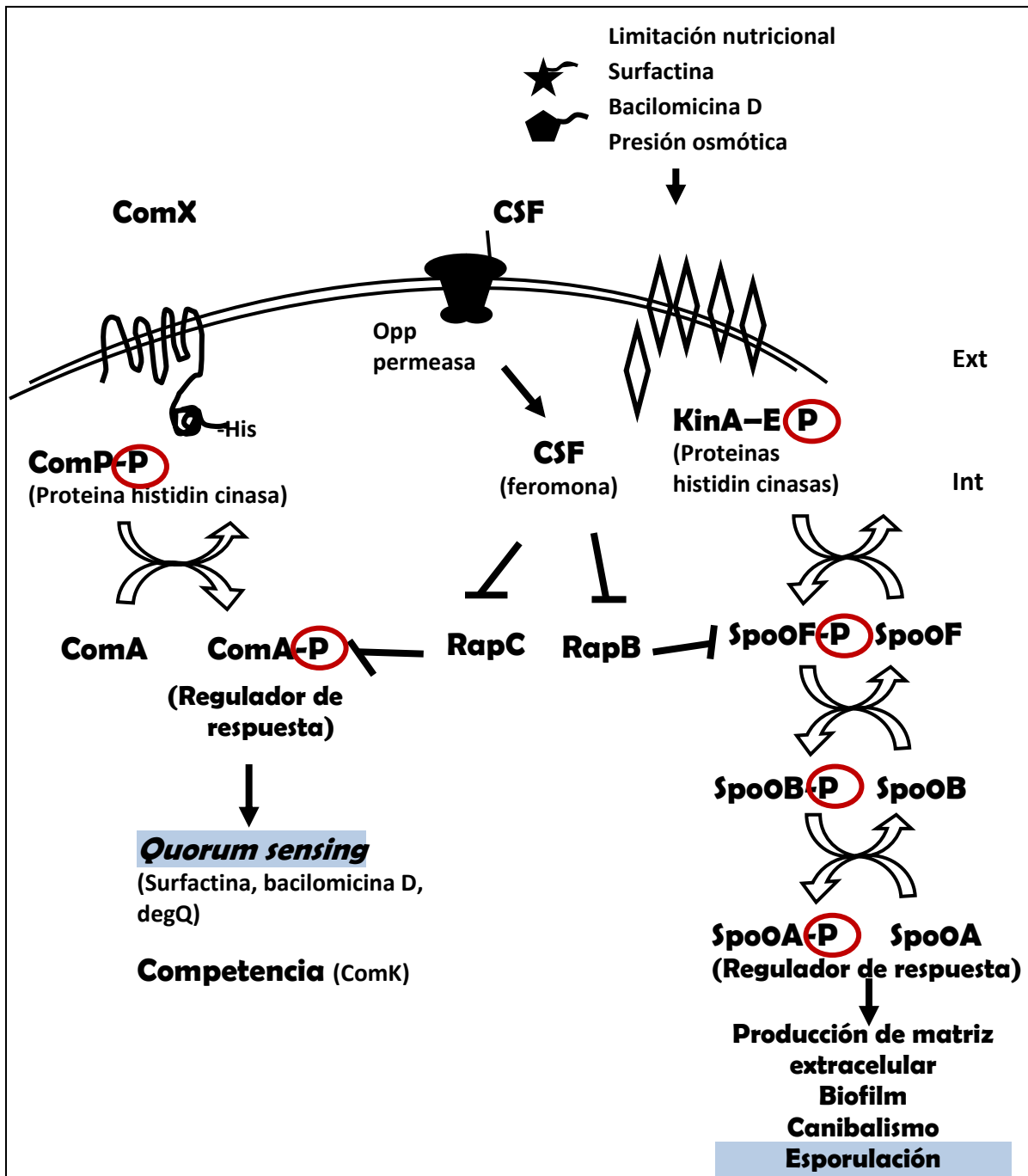
**CSF:** es un pentapéptido (ERGMT) altamente conservado entre especies de *Bacillus*, el cual es importado del medio extracelular y actúa intracelularmente afectando la expresión de genes controlados por ComA-P (Bacon-Schneider *et al.*, 2002, Pottathil, 2008). CSF inhibe la activación de la fosfatasa RapC, la cual a su vez inhibe la acumulación de ComA fosforilado. La contribución de CSF en esporulación requiere la inhibición de otra fosfatasa, en este caso RapB, el cual es un regulador negativo de la cascada de fosforilación que activa a Spo0A (Fig. 2.3) (Solomon *et al.*, 1996, Lopez & Kolter, 2010).

Por otro lado, otro grupo de moléculas que han sido relacionadas con la diferenciación celular hacia esporas son los lipopéptidos, los cuales están compuestos de un oligopéptido cíclico unido a una cola lipídica y han sido clasificados de acuerdo a su estructura química en tres familias principales: surfactina, iturinas y fengicinas. Estas moléculas tienen actividad surfactante, antibiótica, y están involucrados en motilidad celular, colonización de nuevos hábitats, formación de *biofilms* (Raijaamakers *et al.*, 2010). De estas moléculas, la surfactina y bacilomicina D, han sido relacionados con la vía de esporulación (Lopez *et al.*, 2009b, Xu *et al.*, 2012).

**Surfactina:** es un heptapéptido con una secuencia quiral LLDLLDL unido a un grupo de ácido graso beta-hidroxil (C<sub>12</sub>-C<sub>16</sub>). La surfactina presenta una naturaleza anfipática, disminuye la tensión superficial y es capaz de anclarse a la membrana celular, de esta manera altera la integridad biológica de la misma de forma concentración dependiente (Jacques, 2011). Las enzimas involucradas en la síntesis de surfactina están codificadas en el operón *srfA* (*srfAA-srfAB-comS-srfAC-srfAD*) (Nakano *et al.*, 1991). La activación de este operón está regulado por el factor de transcripción ComA, que fosforilado (activo) regula positivamente la síntesis de surfactina, y a su

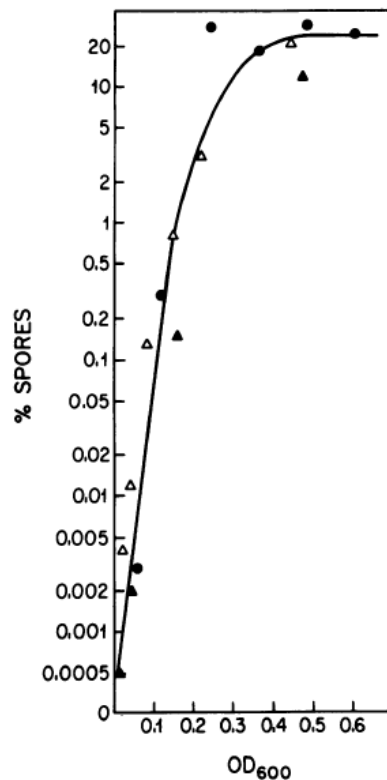
vez la activación de ComA está relacionado con la actividad de las feromonas ComX y CSF (Figura 2.3) (Solomon *et al.*, 1996). Esta activación de la expresión de los genes *surfA* está asociada al incremento de la densidad celular y ocurre principalmente en la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria de crecimiento. La surfactina no sólo cumple un papel de antibiótico, sino que también se ha reportado su papel en la motilidad celular, colonización de superficies y formación de *biofilm* (Raaijmakers *et al.*, 2010). La surfactina es una molécula de señalización celular que actúa de manera unidireccional, es decir, la subpoblación productoras de surfactinas es diferente a la subpoblación que responden a ésta (células generadoras de matriz), las cuales pueden diferenciar a esporulación. Si bien no se ha reportado que la acumulación de surfactina promueva la activación del proceso de esporulación directamente, se sabe que la surfactina induce la activación de la proteína KinC, que activa al regulador maestro de esporulación Spo0A. (Fig. 2.3) (López *et al.*, 2009b).

**Bacilomicina D:** es un lipopéptido de la familia de las iturinas, se trata de heptapéptidos cíclicos unidos a un ácido graso beta-aminado (C<sub>15</sub>-C<sub>17</sub>). Cuenta con una secuencia de aminoácidos, Asn<sub>1</sub>-Tyr<sub>2</sub>-Asn<sub>3</sub>-Pro<sub>4</sub>-Glu<sub>5</sub>-Ser<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub> (Luna, 2015). Al igual que la surfactina es un surfactante y disminuye la tensión superficial pero a diferencia de ella, presenta una fuerte actividad antifúngica al unirse a los esteroides de las membranas eucariotas, y forma poros causando la liberación de iones esenciales como el K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup>, de esta manera provoca la muerte celular (Jacques, 2011). El operón *bmy* (*bmyA*, *bmyB*, *bmyC*, *bmyD*) codifica las enzimas necesarias para la síntesis de bacilomicina D, a su vez la activación de la expresión de *bmy* está gobernado de manera directa por el regulador de respuesta, DegU y de manera indirecta por ComA, que actuaría via DegQ, un factor auxiliar de DegU (Fig.2.3) (Koumoutsis *et al.*, 2007). Por otro lado, en *Bacillus amyloliquefaciens*, la bacilomicina D ha sido reportada como causante de un incremento en la síntesis de KinC aunque no se conoce el mecanismo (Xu *et al.*, 2013). En base a lo anterior, este trabajo pretende contribuir al estudio sobre la relación entre la síntesis de moléculas lipopeptídicas con la inducción del proceso de esporulación, dado que este tipo de moléculas pueden activar estados intermedios como la síntesis de matriz extracelular.



**Figura 2.3.** Quorum sensing y esporulación. Vías convergentes regulan la respuesta de quorum sensing en *B. subtilis*. ComX estimula a la histidina cinasa ComP, ComP se autofosforila y transfiere su fosfato a la proteína de respuesta, ComA, desencadenando la activación de los genes dependientes de ComA. CSF también estimula la actividad de ComA, pero de manera indirecta, es importado por la permeasa (Opp) y en el citoplasma inhibe la acción de RapC quien regula negativamente a ComA. Además, CSF actúa estimulando la activación de Spo0A (regulador maestro de la esporulación) de manera indirecta ya que se une e inhibe a la fosfatasa RapB. Otras moléculas de comunicación celular que han sido relacionadas con la activación de Spo0A, son la surfactina y la bacilomicina D. (Cornella & Grossman, 2005; Xu *et al.*, 2013, Lopez *et al.*, 2009b, Lopez & Kolter, 2010).

Existen pocos reportes que relacionan el efecto de moléculas de *quorum sensing* sobre la esporulación. Un trabajo que relaciona directamente el papel de moléculas dependientes de la densidad celular sobre la esporulación fue publicado por Grossman y Losick (1988), en el que se reporta que cultivos de diferentes densidades celulares alcanzan distintos niveles de esporulación como se puede observar en la figura 3. A alta densidad celular ( $DO_{600} = 0.5$  equivalente a  $1 \times 10^8$  células/mL – 39% esporulación), la esporulación fue considerada normal, pero a una baja densidad celular ( $DO_{600}$  menor a 0.1) la esporulación fue considerada baja (0.02% esporulación). Estos resultados demuestran que bajo condiciones de limitación nutricional, la alta densidad celular induce un nivel mayor de esporulación (>30%).



**Figura 2.3.** Esporulación dependiente de la densidad celular. La cepa *B. subtilis* AG130 se cultivó a alta densidad celular y luego se realizó diluciones hasta menores densidades. La limitación nutricional fue inducida por adición de decoyina (inhibidor de la GMP sintetasa, disminuye los niveles de GTP en la célula). Las muestras fueron incubadas por 12-16 horas. Se determinó el porcentaje de esporulación y éste se graficó en función de la densidad celular en el tiempo de limitación nutricional ( $t=0$ ). (Grossman & Losick, 1988).

En este mismo trabajo se adicionó medio gastado (cultivo que alcanza  $DO_{600}$  1.5 y al que se le separan las células) y se logró estimular la esporulación al adicionarse a cultivos a baja densidad, se observó que de una esporulación de 0.003% sin suplementación se incrementó la esporulación a 1.5% al adicionar medio gastado (Grossman & Losick, 1988).

Por otro lado, Solomon *et al.* (1996), reportaron una molécula que tenía efecto sobre el proceso de esporulación y el estado de competencia, al cual denominaron factor de competencia y esporulación (CSF). Ellos demostraron que a baja concentración de este péptido (1-10 nM) se estimulaba la expresión del gen *urfAA* codificante de la surfactina, mientras que a concentraciones superiores se estimuló la esporulación de células, incluso a baja densidad celular.

#### 2.4 *Bacillus* sp. 83

*Bacillus* sp. 83 es una cepa aislada de filósfera de mango y aplicada como controlador de fitopatógenos (Galindo *et al.*, 2005). Se han identificado compuestos lipopeptídicos (iturinas y surfactina) producidos por esta cepa, los cuales presentaron actividad frente a cepas del género *Fusarium*. (Solis, 2010). Además, se ha reportado la presencia de genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de compuestos lipopeptídicos surfactina y bacilomicina D (Aragón, 2012).

Por otro lado, se ha estudiado la esporulación de *Bacillus* sp. 83 en cultivos en lote y lote alimentado en un medio mineral suplementado con glucosa y sulfato de amonio. De forma general, el cultivo de *Bacillus* sp. 83 se divide en dos etapas: crecimiento vegetativo y esporulación (Rodríguez, 2005; Morales, 2007). En cultivos en lote de *Bacillus* sp. 83, es posible distinguir claramente ambas etapas de proceso (Morales, 2007; Cristiano, 2012). Sin embargo, en cultivos en lote alimentado, utilizados para alcanzar altas densidades celulares se observó un estado de transición (a  $1 \times 10^9$  cel/mL) que da lugar a una esporulación temprana, la cual se induce aún a concentraciones de glucosa no limitantes (Cristiano, 2012). Por otro lado, Aragón (2012) clasificó a esta bacteria del género *Bacillus* como *Bacillus amyloliquefaciens*.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La cepa *Bacillus amyloliquefaciens* 83 es una bacteria capaz de esporular y producir antibióticos. Actualmente se comercializa bajo el nombre de Fungifree AB<sup>®</sup>, para su aplicación como biofungicida. El producto es un formulado a base de esporas como principio activo, por lo que es importante generar conocimiento acerca del proceso de esporulación de *Bacillus amyloliquefaciens* 83 que permita incrementar la productividad del proceso de producción.

Tradicionalmente, se asume que la limitación nutricional es el factor que desencadena la esporulación. No obstante, existen reportes que muestran el efecto conjunto de la limitación nutricional y la presencia de moléculas de *quorum sensing* en procesos de diferenciación celular de *Bacillus subtilis* (Grossman y Losick, 1988; Magnuson *et al.*, 1994; Bacon-Schneider *et al.*, 2002). Sin embargo, no se ha reportado un estudio donde los efectos de la densidad celular y de la limitación nutricional sean evaluados de manera independiente. En este trabajo se pretende evaluar el efecto de la densidad celular sobre la esporulación del agente de control biológico *Bacillus amyloliquefaciens* 83.

#### 4. HIPÓTESIS

En la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* 83, la densidad celular es el factor que desencadena la esporulación.

#### 5. OBJETIVOS

##### 5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la densidad celular en la esporulación de *Bacillus amyloliquefaciens* 83.

##### 5.1 Objetivos específicos

- Estudiar la esporulación de *Bacillus amyloliquefaciens* 83 en cultivos lote y lote alimentado a diferentes valores de densidad celular bajo condiciones de limitación y no limitación nutricional.
- Análisis de genes involucrados en las vías de *quorum sensing* y diferenciación celular de *Bacillus amyloliquefaciens* 83.
- Contribuir al conocimiento del papel de la producción de moléculas de *quorum sensing* (bacilomicina y surfactina) en la esporulación de *Bacillus amyloliquefaciens* 83.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Los cultivos planteados, los escenarios analizados y la información esperada en cada uno se resumen en la tabla 6.1. Se plantearon dos cultivos que inician a alta densidad celular ( $X_0 = 1 \times 10^9$  cel/mL) X9L y X9AL, cultivo lote y lote alimentado, respectivamente. Estos cultivos se plantearon principalmente para investigar si de manera separada de la limitación nutricional, la densidad celular puede desencadenar la esporulación (escenario 2, tabla 6.1). El cultivo control fue el X7L ( $X_0 = 1 \times 10^7$  cel/mL) ya que al iniciar con baja densidad celular, se espera disminuir el efecto de este factor y así poder contrastar con lo obtenido por los cultivos que inician a alta densidad celular.

A partir de estos cultivos se estudiaron cuatro posibles escenarios (tabla 6.1), donde se puede observar que al comparar las condiciones de baja densidad celular sin limitación nutricional y alta densidad celular sin limitación nutricional, podemos evaluar de manera separada el efecto de la densidad celular. En el escenario 3, se observa que existe alta densidad celular y limitación nutricional, esto se presenta en los tres cultivos; sin embargo, cada uno alcanzó esa etapa de distinta forma (concentración inicial de células, cinética de crecimiento, producción de lipopéptidos, consumo de glucosa, etc); por lo que se espera estudiar de qué manera cada uno de estos cultivos que iniciaron y finalizaron a diferentes densidades celulares, responde a la limitación nutricional (una hora después que se agota la glucosa) y en el último, cuando se alcanza el 30% de esporulación.



Tabla 6.1 Cultivos planteados en este trabajo e información esperada de cada uno.

Cultivo	Etapas del cultivo	Condición evaluada
Cultivo lote X7L - control ( $X_0 = 9.6 \pm 0.3 \times 10^6$ cel/mL)	Mitad de la fase de exponencial	1. Baja densidad celular sin limitación nutricional (Condición control).
Cultivo lote - X9L ( $X_0 = 1.0 \pm 0.1 \times 10^9$ cel/mL)	Mitad de la fase de exponencial (Glucosa $8.2 \pm 0.1$ g/L; $2.7 \pm 0.4 \times 10^9$ cel/mL)	2. Altas densidades celulares sin limitación nutricional.
Cultivo lote alimentado - X9AL ( $X_0 = 1.0 \pm 0.2 \times 10^9$ cel/mL)	Una hora antes de agotarse la glucosa (Glucosa $7.2 \pm 2.4$ g/L, $1.2 \pm 0.3 \times 10^{10}$ cel/mL)	
Cultivo X7L ( $X_0 = 9.6 \pm 0.3 \times 10^6$ cel/mL)  Cultivo X9L ( $X_0 = 1.0 \pm 0.1 \times 10^9$ cel/mL)  Cultivo X9AL ( $X_0 = 1.0 \pm 0.2 \times 10^9$ cel/mL)	Una hora después de glucosa = 0 g/L	3. Diferentes densidades celulares + limitación nutricional.
Cultivo X7L ( $X_0 = 9.6 \pm 0.3 \times 10^6$ cel/mL)  Cultivo X9L ( $X_0 = 1.0 \pm 0.1 \times 10^9$ cel/mL)  Cultivo X9AL ( $X_0 = 1.0 \pm 0.2 \times 10^9$ cel/mL)	30 % de esporulación <hr/> 80% esporulación	4. Cultivo en proceso de esporulación a diferentes densidades celulares.

A partir de estos cultivos se evaluarán los parámetros cinéticos y de esporulación; síntesis de bacilomicina, surfactina y ácidos orgánicos. Finalmente, el nivel de expresión de genes involucrados en la esporulación y *quorum sensing* (Figura 6.1).

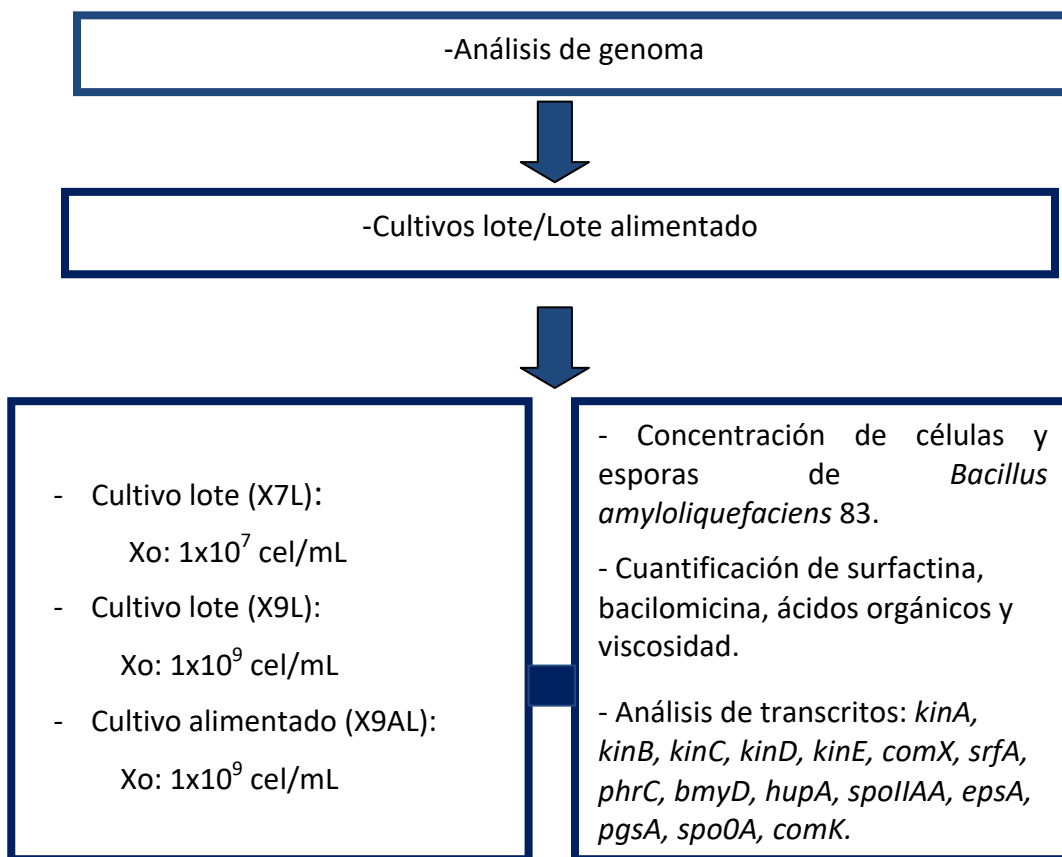


Figura 6.1 Estrategia experimental.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Microorganismo

*Bacillus amyloliquefaciens* 83 es una bacteria que fue aislada de follaje de mango, proporcionada por el Centro de Investigaciones en Alimentos y Desarrollo, A.C (Unidad de Culiacán) donde se comprobó su actividad antagonista sobre el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* (Aragón *et al.*, 2012; Morales *et al.*, 2007).

El genoma de esta cepa fue enviada para su secuenciación a la empresa MOgene (USA), por medio de tecnología HiSeq 2000™. El ensamblaje y anotación del genoma se llevó a cabo con apoyo del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM.

Se utilizaron los programas Blast y Artemis para el análisis de las secuencias a partir del cual se diseñaron los oligonucleótidos necesarios para el estudio de expresión de genes (Tabla 7.1).

### 7.2 Medios de cultivo

#### LB

Peptona	10.0 g/L
NaCl	10.0 g/L
Extracto de levadura	5.0 g/L

(Becton, Dickinson and Company)

#### YPG

Glucosa	10.0 g/L
Peptona	10.0 g/L
Extracto de levadura	10.0 g/L

(J.T. Baker®; Chemicals, Becton, Dickinson and Company)

#### Medio mineral

Glucosa	15.0 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.0 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.3 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.4 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.4 g/L
MnCl <sub>2</sub>	0.02 g/L
CaCl <sub>2</sub>	0.1 g/L
FeSO <sub>4</sub>	0.1 g/L

(J.T. Baker®)

### 7.3 Cultivo en lote y lote alimentado de *Bacillus amyloliquefaciens* 83 a diferentes densidades celulares.

#### 7.3.1 Preparación de inóculos

Con el objetivo de contar con la mayor cantidad de células en estado vegetativo que sirvan como inóculo, se sembró una asada sobre una placa Petri con agar YPG. De estas placas se tomaron dos asadas y se sembró en tubos con 5 mL de medio YPG. Posteriormente, se dejaron incubar 12 horas, para transferir a matraces con 50 mL de medio YPG, los cuales luego de 12 horas de incubación se transfirieron a matraces Fernbach con 500 mL de YPG.

En total se utilizaron 3 matraces Fernbach para cosechar las células a inocular. Estos cultivos se centrifugaron ( $6370 \times g$ , 15 minutos,  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y las células se resuspendieron en solución de fosfatos ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 5.3g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 6.4g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 4.0g/L). El volumen a inocular se ajustó de manera que en el reactor se consiga la densidad celular inicial deseada ( $1.0 \times 10^7$  cel/mL ó  $1.0 \times 10^9$  cel/mL)

#### 7.3.2 Medio de cultivo y condiciones de fermentación

-Preparación de medio de cultivo

Se preparó una solución de fosfatos y sulfato ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5.3g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.4g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4.0 g/L), a pH de 6.8 la cual fue vertida al reactor y se esterilizó a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 15 libras por 20 minutos, luego de esto se le añadieron la glucosa y las sales restantes previamente estériles, por separado, bajo condiciones de esterilidad.

-Condiciones de fermentación

Los cultivos se realizaron en bioreactores marca Dusher de 3 L de volumen nominal (Figura 7.1), con las siguientes características, altura 25 cm, diámetro interno 12.5 cm. Se utilizaron 3 turbinas Rushton, con una relación diámetro impulsor/diámetro de jarra (D/T) igual a 0.5. Mientras que la separación entre impulsores fue de 1/3 el diámetro del tanque.



Figura 7.1 Bioreactor Dusher de 3L

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

El pH y el oxígeno disuelto se monitorearon utilizando un electrodo para pH modelo InPro® 405-DPAS y un sensor de oxígeno modelo inPro® 6800 (*Mettler Toledo*). La tensión de oxígeno disuelto (TOD) se controló a 15% variando manualmente la velocidad de agitación en un rango de 250 a 700 rpm y el flujo de aireación se mantuvo constante a 1 vvm. Los cultivos se llevaron a cabo a 30 °C, y pH de 6.8, el cual se controló por medio de la adición automática de NaOH 2N mediante una bomba peristáltica.

Todos los cultivos realizados y descritos a continuación se realizaron por triplicado.

**Cultivo en lote de *Bacillus amyloliquefaciens* 83 a diferentes densidades celulares.**

<b>Medio</b>	Medio mineral
<b>Volumen nominal</b>	3 L
<b>Volumen de trabajo</b>	1.5 L
<b>Concentración celular</b>	
<b>Inicial</b>	- Cultivo (X7L) = $9.6 \pm 0.3 \times 10^6$ cel/mL
	- Cultivo (X9L) = $1.0 \pm 0.1 \times 10^9$ cel/mL

Las condiciones a las que se llevaron a cabo estos cultivos se describen en el punto 7.3.2.

### Cultivo en lote alimentado de *Bacillus amyloliquefaciens* 83.

Al igual que en el caso anterior el cultivo se realizó en medio mineral. Se preparó de manera separada las soluciones de fosfato al que se le añadieron la glucosa y las sales minerales.

<b>Medio</b>	Medio mineral
<b>Volumen reactor</b>	3 L
<b>Volumen de trabajo</b>	1.5 L
<b>Concentración celular Inicial</b>	- Cultivo (X9AL) = $1.0 \pm 0.2 \times 10^9$ cel/mL

Y se operó bajo las condiciones descritas en la sección 7.3.2.

La alimentación se realizó por pulsos adicionando: 75 mL de una solución con 300 g glucosa/L, una hora antes que se consuma la glucosa. En este momento la concentración de glucosa residual se encuentra por encima de los 5 g/L, lo cual resulta en una concentración de glucosa en el medio luego de la alimentación, por encima de 20 g/L. Las sales minerales ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $FeSO_4$ ) se adicionaron a la concentración inicial (sección 7.2), mientras que la solución de sulfatos ( $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ) fue adicionada al doble de concentración al comienzo del cultivo. Se realizaron dos alimentaciones de glucosa y sales minerales con las que se aseguraba que alcanzaría por lo menos,  $1 \times 10^{10}$  cel/mL.

## 7.4 Métodos analíticos

### 7.4.1 Conteo de células totales

Para el conteo de células se tomaron muestras de 1 mL de cultivo cada hora para el cultivo X9L ( $X_0: 1.0 \pm 0.1 \times 10^9$  cel/mL) y X9AL ( $X_0: 1.0 \pm 0.2 \times 10^9$  cel/mL) y cada 2 horas para el cultivo X7L ( $X_0: 9.6 \pm 0.3 \times 10^6$  cel/mL). Se realizó mediante cuantificación directa al microscopio, utilizando la cámara de Neubauer, tal como lo describen Morales (2007) y Cristiano, (2012).

La cámara de Neubauer presenta un cuadrante central dividido en 25 cuadrantes, cada uno con un área de  $0.04 \text{ mm}^2$  y al colocar el cubre objeto presenta una profundidad de 0.1 mm, de tal forma que el volumen total en cada cuadrante es de  $0.004 \text{ mm}^3$  ó  $0.000004 \text{ mL}$ .

Se colocan 100  $\mu$ L de muestra sobre la cámara, la cual se enfoca en el microscopio a 40 X. Posteriormente, se cuentan el total de células de cuatro cuadrantes, repitiendo esto 16 veces en cuadrantes diferentes. Al final se realiza el cálculo de número de células por mililitro utilizando la siguiente fórmula.

$$\text{Cel} = \frac{\text{Promedio de células contadas por cuadrante}}{\text{mL}} * \text{Factor de dilución} \\ \text{0.000004 mL}$$

#### **7.4.2 Cuantificación de glucosa residual**

Se separaron las células del caldo de cultivo mediante centrifugación en tubos Eppendorf de 1.5 mL (15 000 x g, 5 min). Se determinó la concentración de glucosa residual con el analizador Yellow Spring Instruments (YSI). La técnica se basa en la oxidación de la glucosa mediante la enzima glucosa-oxidasa, que se encuentra inmovilizada en una membrana y cuyo subproducto, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es cuantificado y es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

#### **7.4.3 Tinción de esporas**

Se tomó 1 mL de muestra del cultivo cada dos horas a partir de la aparición de las primeras esporas. Se realizó una dilución de 1:20, y se centrifugó (15 000 x g, 5 min), se desechó el sobrenadante y se lavó el paquete celular con 500  $\mu$ L de solución salina (NaCl, 0.9 % p/v), dos veces. Para fijar la muestra en un portaobjeto se calentó la lámina sobre una rejilla expuesta a vapores de agua, para luego teñir con verde malaquita (solución acuosa al 5% p/v) por 10 min, se lavó y se tiñó con solución acuosa de safranina al 0.5 % p/v. Finalmente, la lámina es lavada con agua para eliminar el colorante y se deja secar para observar al microscopio a 100 X de aumento.

Al tratarse de una tinción diferencial, las células que presentan una endospora retienen el colorante verde malaquita por lo que se tiñen de verde, mientras que las células vegetativas se tiñen de color rosa debido al colorante de contraste (safranina).

Se cuentan las esporas y las células vegetativas en unos 15 campos de los cuales se obtiene un promedio así como el porcentaje de esporas respecto a las células totales.

#### 7.4.3.1 Concentración de células esporuladas y lisadas con respecto a Xmax.

A partir de los valores de porcentajes de esporas y concentración de células cuantificadas por conteo directo en cámara de Neubauer, se calcularon las concentraciones de esporas, células vegetativas y células lisadas con respecto a Xmax, con las siguientes fórmulas.

Concentración de esporas	$\text{Esporas/mL} = \text{Células totales (cel/mL)} * \% \text{ esporulación}$
Concentración de células lisadas	$\text{Cel. Lisadas/mL} = \text{Xmax (concentración máxima de células en el cultivo-cel/mL)} - \text{Concentración de células contadas al final de la esporulación (cel/mL)}$
Porcentaje de células lisadas	$\text{Porcentaje de células lisadas al final de la esporulación} = \frac{\text{Concentración de células lisadas al final del cultivo (cel/mL)}}{\text{Xmax (cel/mL)}}$
Porcentaje de máxima concentración celular que esporuló (Eficiencia)	$\text{Eficiencia de esporulación} = \frac{\text{Máxima concentración de esporas (Spo max/mL)}}{\text{Xmax (cel/mL)}}$

#### 7.4.4 Cuantificación de surfactina y bacilomicina D

Se colectaron 20 mL de cultivo y se separaron las células mediante centrifugación (4000 x g por 15 minutos), se colectó el sobrenadante y se agregó HCl 3N para lograr la acidificación de éste hasta pH 2. Posteriormente, se incubó a 4°C durante 48 horas para asegurar la precipitación de los lipopéptidos. Posteriormente, se colectó el precipitado centrifugando a 4000 x g por 15 minutos.

El precipitado es disuelto en metanol, para lo cual se debe agregar al precipitado obtenido un volumen de metanol de aproximadamente 300 µL y se deja disolviendo durante 4 horas. Este último paso (lavado con metanol) debe repetirse unas 2 veces más. Los pasos siguientes difieren según el compuesto a cuantificar.



Surfactina.- Una vez obtenidos los extractos metanólicos se inyectan en una columna Zorbax C8 (4.6 mm x 150 mm; *Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, USA) y se separaron por cromatografía líquida en fase reversa de alta resolución (HPLC) utilizando un equipo Waters 2695 HPLC system (*Water corporation*). La elución se realiza a 30 °C a un flujo isocrático de 0.5 ml/min y la fase móvil consistió de 0.1% ácido trifluoroacético (TFA) en agua y 0.1% de TFA en acetonitrilo. Los patrones de elución se monitorean a 200nm en un detector marca Waters serie 2487. La concentración de surfactina fue estimada usando una curva estándar de surfactina (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) presentada en el anexo 2 (figura A.2)

Bacilomicina D.- Se inyectan los extractos metanólicos en una columna analítica Nucleosil 120-5 C18 (Macherey-Nagel, Duren, DEU) y se separan por HPLC, utilizando el equipo Waters 2695 HPLC system (*Water corporation*). La elución se realizó a 30 °C a un flujo de 1 ml/min y la fase móvil consistió de 55% v/v de agua/45% v/v acetonitrilo (acidificado con 1% v/v de ácido fosfórico). Los patrones de elución se monitorean a 200 nm en un detector marca Waters, serie 2487. La concentración de bacilomicina D fue estimada usando una curva estándar de bacilomicinas producidas por *Bacillus amyloliquefaciens* 83, previamente identificadas y cuantificadas por Luna (2015) y presentadas en el anexo 2 (figura A.3)

#### **7.4.5 Determinación de ácidos orgánicos.**

Se tomó 1 mL de muestra del cultivo, se centrifugó (15 000 x g, 5 min) y se colectó el sobrenadante. Se determinó la concentración de acetoína, ácido acético y 2,3 butanodiol mediante HPLC, usando el equipo Waters 600 HPLC system (*Water corporation*). Se cargó sobrenadante (sin células) en una columna para el análisis de ácidos orgánicos Aminex HPX-87H (7.8 x 300 mm) empacada con una resina de estireno-divinilbenceno. Se utilizó ácido sulfúrico 10 mM para la elución a un flujo de 0.6 ml/min y a 40 °C de temperatura. Los compuestos se analizaron con un detector marca Waters, serie 2487 a una longitud de onda de 210 nm, y un detector de índice de refracción marca Waters serie 2414. La concentración de ácidos orgánicos fue estimada usando una curva estándar de acetoína (Merck Schuchardt OHG), 2,3 butanodiol (Sigma - Aldrich Química), ácido acético (J.T.Baker®) (Anexo 2).

#### 7.4.6 Determinación de la viscosidad

Se tomó 1 mL de muestra del cultivo, a diferentes tiempos de la fermentación, y se separaron las células mediante centrifugación (4000 x g por 15 minutos). Posteriormente, se colectó el sobrenadante y se analizó la viscosidad utilizando un reómetro AR 1000 (*TA Instruments*), con una geometría de cono-plato, de 60 mm de diámetro. Los análisis se hicieron a una temperatura constante de 30 °C. Los datos fueron tomados por el programa *AR instrument control*, proporcionado por el fabricante del equipo. Posteriormente, los datos adquiridos fueron analizados en Excel, para encontrar los valores de la viscosidad aparente del caldo de cultivo durante la fermentación.

Para determinar la viscosidad, se calculó una velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) utilizando la ecuación de Metzner y Otto, quienes plantearon una velocidad de deformación promedio, que depende del tipo de impulsor y de la agitación:  $\dot{\gamma}_{\text{promedio}} = K_s * N$  (Metzner & Otto, 1957); donde el valor de  $K_s$  es 11.5 (constante para turbinas Rushton) y  $N = 11.7 \text{ s}^{-1}$ , la velocidad de agitación máxima durante la fermentación. De este cálculo, la velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) que se usó para el cálculo de viscosidad fue  $134.6 \text{ s}^{-1}$ .

#### 7.4.7 RT-qPCR.

##### Toma de muestra

Se toman 10 mL de muestra en tubos estériles previamente enfriados y conteniendo 1- 1.5 mL de *RNAlater*® (Ambion), se centrifuga a 4000 x g, 10 minutos, 4°C. La pastilla se almacena a -70°C hasta su procesamiento. Las muestras de los cultivos lote fueron tomadas a la mitad de la fase exponencial, una hora después de agotarse la glucosa y a 30 % de esporulación. En el caso del cultivo alimentado la primera muestra fue a una hora antes de agotarse la glucosa, mientras que las dos últimas fueron las mismas que en el caso anterior, al acabarse la glucosa y a 30% de esporulación.

## Extracción de RNA

Este protocolo está basado en el método de aislamiento de RNA total de fenol caliente equilibrado con agua, combinado con un tratamiento previo para romper la pared celular con lisozima (Flores *et al.*, 2005; Cabrera-Valladares *et al.*, 2012). Las muestras fueron descongeladas y resuspendidas completamente en 1.5 mL de solución (0.3 M sacarosa, 0.1 M de acetato de sodio y 15 mg/mL lisozima) e incubadas a temperatura ambiente por 16 minutos, a esta mezcla se le agregaron 2 mL de solución II (0.01 M de acetato de sodio, 2 % SDS). Las muestras se calentaron en baño de agua a 70° C por 3 minutos para completar la lisis. Se agregó 2 mL de Ultrapure™ fenol: agua (3.75:1 v/v, grado biología molecular, Invitrogen), previamente incubado a 70° C, se agitó al máximo por 20 segundos, y las muestras se incubaron a 70° C por 3 minutos. Inmediatamente se colocó en hielo y se centrifugó (3600 x g por 15 minutos a 4 °C). A continuación se retiró la fase acuosa y se transfirió a otro tubo. Este procedimiento se llevó a cabo dos veces y se agregaron 2 ml de fenol:cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) a la fase acuosa, para nuevamente centrifugar y transferir la fase acuosa a otro tubo. Se agregó 2 mL de cloroformo para realizar la extracción, y éste paso se repitió una vez más. Luego de la extracción con cloroformo, se retiró la fase acuosa y se agregó acetato de sodio 3M (en una relación 1 volumen de acetato de sodio: 10 volúmenes de la muestra), dando un instante de vortex para homogeneizar, y precipitar con 2.5 volúmenes de etanol (agitación manual). Ésta mezcla se centrifugó para finalmente decantar el sobrenadante y resuspender el precipitado en aproximadamente 300 µl de agua más 0.5 µl de RiboLock RNAase Inhibitor (20U/ul) de Fermentas. Se midió la concentración de RNA y se obtuvieron las relaciones  $DO_{260/280nm}$  y  $DO_{260/230nm}$ , que evalúa la pureza de los ácidos nucleicos extraídos; utilizando un espectrofotómetro NanoDrop Chemidoc XRS (Biorad). Por otro lado, la integridad del RNA se verificó tomando 500 ng del material extraído y sometiénolo a electroforesis en gel de agarosa (1%) en buffer MAE (MOPS 0.2 M, EDTA 0.01M, acetato de sodio 0.05 M) 1X a 80Kv por 35 minutos.

## cDNA

Para la preparación del cDNA, primero se trató el RNA con DNAasa I usando el kit Turbo DNAsa free (Ambion®). A continuación la primera cadena de cDNA se sintetizó a partir de 5 µg de RNA

total utilizando la mezcla de oligos dT y el kit para síntesis de cDNA, RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermoscientific™) bajo las instrucciones del fabricante.

### PCR en tiempo real

Las reacciones de qPCR, fueron realizadas en placas de 96 pozos (MicroAmp Optical 96 Well reaction plate, Applied Bysistem), en un termociclador CFX Real Time System (BioRad) con el kit Maxima® SYBR Green/ROX Qpcr Mast Mix (Fermentas). Las condiciones de los ciclos para todos los genes fueron los siguientes: un paso inicial a 95 °C por 2 min, seguido de 39 ciclos de 95° C por 15s y 55° C por 1 min y finalmente un paso de disociación a 65° C por 5 seguido de 95° C por 30s.

Cada reacción consistió en 1µL de oligos (5µM) a partir de una mezcla equimolar de cada par de oligonucleótidos, 1 µL de muestra de cDNA (5ng/µL) y 5 µL de Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (Fermentas) y 3 µL de agua libre de nucleasas, en un volumen total de reacción de 10µL. En cada experimento, por cada gen analizado se sometieron al mismo procedimiento controles negativos sin templado de ADN (NTC) para excluir o detectar cualquier posible contaminación.

**Tabla 7.1.** Oligos para análisis de transcritos

<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>
<b><i>kinA</i></b>	KinABaa	ATGCCTTGACCTTTTCGTCT
	KinABab	AATTTCCACACCCGCTTCAA
<b><i>kinB</i></b>	KinBBaa	TTTTTCAAGTCAGCGCCCTT
	KinBBab	GCATGGACGCATTCTCATCA
<b><i>kinC</i></b>	KinCBaa	AGCTGAAGGACAGCGAGCAG
	KinCBab	GCAGATTGTCCATGATCCGG
<b><i>kinD</i></b>	KinDBaa	GTCAAAGGAAAAGGCACCG
	KinDBab	GAACCGCCGTACATCAGCAT
<b><i>kinE</i></b>	KinEBaa	CGATTAAGCTTGACAGCGGC
	KinEBab	AATCCTCCCAATTCCGTCT
<b><i>bmyD</i></b>	bmyDBaa	AAGATGGACGGAATCGATGC
	bmyDBab	TTCGGACCCATTTTCGATGAC
<b><i>comX</i></b>	comXBaa	GGAGTTAGCCAGGATCAAACAGA
	comXbab	GCCGAAAGAAATAACATCTATACCCT
<b><i>phrC</i></b>	phrCBaa	TGGTTTGTATTGTTTAGCAGCC

	phrCBab	AGCCTGATCTGTCTGGCCTG
<b><i>hupA</i></b>	hupABaa	AATCCAACCTGATCGGTTTCGG
	hupABab	TGCGGGTTACGTCCTTACG
<b><i>srfAA</i></b>	<i>srfA</i> ABaa	GGCCACTCGTTAGCGGG
	<i>srfA</i> ABab	TTAAGGTAAGCTGCACGCCG
<b><i>spolI</i>AA</b>	spolIABaa	CGTCACATCGTGCTGAACCT
	spolIABab	CCCTAAAATCACGCCGAGG
<b><i>epsAB</i></b>	epsABaa	GTCTGAGGCAAAAGCATCGG
	epsAaBb	AACGCCATCACGATATTCCG
<b><i>pgsA</i></b>	pgsABaa	AGCAATGTCAGATGCCGGAG
	pgsABab	ATTTTCGATCGGTTCCAGCAC
<b><i>comK</i></b>	comKABaa	CCAGAAAACACACGCACCCT
	comKABab	TCCTCAGGCAAAACAGCGAT

La adquisición de datos se realizó mediante el programa CFX manager (BioRad). Los oligonucleótidos diseñados se ilustran en la Tabla 7.1. La técnica para la evaluación de expresión génica utilizada fue el método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  descrito por Livak & Shmittgen (2001) (Anexo 5).

## 7.5 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se usó el programa MINITAB v 17.3 con el cual se realizaron los análisis de varianza ANOVA y prueba de Tukey, con un nivel de confianza de 95%.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Análisis *in silico* de las secuencias de *Bacillus amyloliquefaciens* 83

La cepa en estudio fue inicialmente denominada *Bacillus* sp. 83, una vez que se logró identificar hasta especie, por análisis del gen *recA*, (Aragón, 2012), se identificó como *Bacillus amyloliquefaciens*. El genoma de *Bacillus amyloliquefaciens* 83 está conformado por aproximadamente 4 millones de pares de bases (Mpb), 4074 secuencias codificantes y tiene un contenido de GC de 46.4%. Ésto corresponde con lo observado por Chen *et al.*, (2007) para *Bacillus amyloliquefaciens*, quien reporta que *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 tiene un genoma de 3 918 589 pb y un contenido de GC de 46.4%, mientras que *B. subtilis* 168 tiene 4 214 630 pb y un contenido de GC de 43.5%; por su parte *Bacillus cereus* tiene aproximadamente 5 Mpb y un contenido de GC de 35.4%.

Dado que la información sobre las vía de señalización y de diferenciación celular; en mayor parte ha sido estudiada en *Bacillus subtilis*; en primer lugar se verificó que la cepa de trabajo presente todos los genes involucrados en el proceso de esporulación, producción de lipopéptidos, feromonas de comunicación celular, así como genes que codifican para reguladores de la diferenciación celular. De manera específica, se realizó la comparación de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos, con la cepa de laboratorio más estudiada, *B. subtilis* 168. Como se observa en la tabla 8.1, algunos genes tienen porcentaje de identidad menor a 80%; *epsA* tiene apenas una identidad de 65%, lo cual indicaría que la composición de la matriz extracelular es diferente a la de *Bacillus amyloliquefaciens* 83, *kinB* registra una identidad a nivel de proteínas de 63%. Sin embargo, se comprobó que presente las mismas regiones que la proteína correspondiente en *B. subtilis* 168. De ellas, la región histidin cinasa cuenta con 85% de identidad mientras que el dominio ATPase, 61%. Por su parte, *comX* registra 35% de identidad, esto puede deberse a la variación *comX* del cual se conoce que es una molécula de composición altamente específica a cada cepa de *Bacillus*, incluso en base a esta molécula se han reportado ferotipos dentro de este género (Tortosa *et al.*, 2001). El gen *bmyD* involucrado en la síntesis de bacilomicina D no ha sido incluido en la tabla, ya que *B. subtilis* 168 no lo presenta (Koumoutsis *et al.*, 2004), pero sí ha sido reportado en cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* como la cepa SQR9 con

la que tiene 98% de identidad, y en donde se ha estudiado parte de lo presentado en los antecedentes.

Tabla 8.1 Análisis de los siguientes genes y proteínas de *B. amyloliquefaciens* 83 frente a *Bacillus subtilis* 168, *Bacillus amyloliquefaciens* Y2 y *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9:

Gen	Organismo	Proteína	% identidad Gen	% identidad proteína
<b>kinA</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y2	Cinasa A	99	
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SQR9		99	
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168		78	81
<b>kinB</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y2	Cinasa B	99	
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SQR9		99	
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168		52.53	63
<b>kinC</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y2	Cinasa C	99	
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SQR9		99	
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168		72	74
<b>kinD</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y2	Cinasa D	99	
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SQR9		99	
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168		60	76
<b>kinE</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y2	Cinasa E	99	
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SQR9		99	
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168		75	80
<b>phrC</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y2	CSF	100	
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SQR9		98	
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168		73	100
<b>comX</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y2	Feromona comX	33	
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SQR9		99	
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168		34	35
<b>srfAA</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y2	Subunidad 1 de surfactina sintasa	99	
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SQR9		25	
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168		98	76
<b>spolIIA</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y2	Factor anti-antisigma F	99	
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SQR9		99	
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168		82	91
<b>epsA</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y2	síntesis de exopolisacárido	100	
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SQR9		99	
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168		65	65
<b>comK</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y2	Factor de transcripción de estado competencia	99	
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SQR9		99	
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168		78	82
<b>pgsA</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y2	Subunidad Poly- $\gamma$ - glutamato sintasa	99	
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SQR9		99	

	<i>B. subtilis subsp. subtilis</i> 168		74	79
<b>spo0A</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y2	Regulador del estado 0 de la esporulación	99	
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SQR9		99	
	<i>B. subtilis subsp. subtilis</i> 168		86	96

## 8.2 Cultivo en lote y lote alimentado de *Bacillus amyloliquefaciens* 83.

### 8.2.1 Crecimiento y esporulación

La figura 8.1 muestra los perfiles de crecimiento y consumo de glucosa de los cultivos realizados. Se puede observar el desarrollo de cada uno de estos cultivos en el tiempo. El cultivo X7L es un cultivo que inicia a baja densidad celular ( $9.6 \pm 0.3 \times 10^6$  cel/mL) pero que alcanza una concentración celular alta ( $5.2 \pm 0.4 \times 10^9$  cel/mL). El cultivo X9L alcanza una densidad celular equivalente a X7L pero este cultivo inicia a alta densidad celular ( $1.0 \pm 0.1 \times 10^9$  cel/mL). El cultivo alimentado es un cultivo que inicia igualmente a alta densidad celular pero alcanza un orden de magnitud mayor de concentración de células con respecto a los otros cultivos ( $2.0 \pm 0.4 \times 10^{10}$  cel/mL), al finalizar el crecimiento.

Como se observa existen tres escenarios de densidad celular. X7L inicia a baja densidad celular pero alcanza una alta densidad celular antes del agotamiento de la glucosa, X9L inicia a alta densidad celular y finaliza a la misma densidad que X7L, estos dos cultivos pueden ser comparables ya que ambos alcanzan igual densidad celular cuando se presenta la limitación nutricional, siendo diferentes en la historia previa a esta limitación, ya que una inicia a baja y la otra alta densidad celular; por lo que las diferencias en esporulación y niveles de transcripción se deberán a los procesos previos al fin del crecimiento y limitación por glucosa. Por su parte, el cultivo alimentado nos permite evaluar el efecto de la densidad celular sobre la esporulación, ya que se logró incrementar en un orden de magnitud este factor, al momento de presentarse la limitación. Además, nos permite incrementar el efecto de los procesos previos al inicio de la limitación nutricional cuando se inicia a alta densidad celular.

Estos procesos previos a la limitación, incluyen las moléculas que se acumularon ya que se producen durante crecimiento celular- transición a fase estacionaria (anexo 1), y en donde el



cultivo que mayor número de duplicaciones realizó fue el cultivo X7L (9), seguido del cultivo alimentado X9AL con 4 duplicaciones, por último el cultivo X9L sólo realizó 2 duplicaciones.

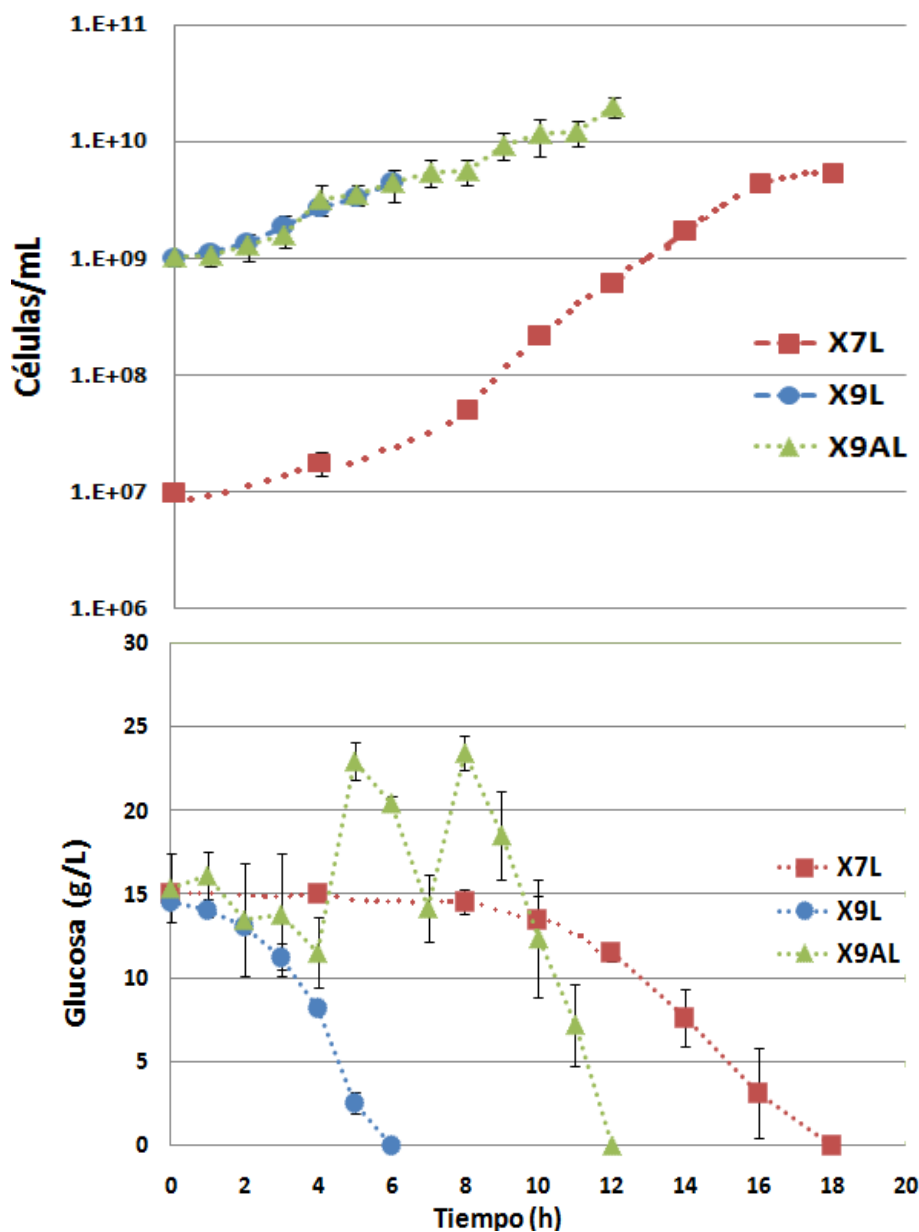


Figura 8.1. Perfil de crecimiento celular y glucosa residual. Cultivo lote X7L ( $X_0 = 9.6 \pm 0.3 \times 10^6$  cel/mL), cultivo lote X9L ( $X_0 = 1.0 \pm 0.1 \times 10^9$  cel/mL) y cultivo alimentado X9AL ( $X_0 = 1.0 \pm 0.2 \times 10^9$  cel/mL). Los cultivos se realizaron por triplicado, usando medio mineral, en reactores de 1.5L a 30 °C, y pH 6.8. Se muestran los promedios y las desviaciones estándar.

La tabla 8.2 muestra las velocidades de crecimiento, donde se puede observar que la velocidad de crecimiento es mayor en el cultivo que inició a baja densidad celular (X7L). Esto puede deberse presumiblemente al mayor consumo de glucosa para mantenimiento que necesitaron en los cultivos que iniciaron a alta densidad celular.

Tabla 8.2. Valores de velocidad de crecimiento, Xmax y rendimiento de los cultivos. (Letras distintas representan diferencias significativas).

Parámetro/Cultivo	X7L	X9L	X9AL
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.39 ± 0.01 <b>b</b>	0.29 ± 0.04 <b>a</b>	0.25±0.02 <b>a</b>
Xmax (cel/mL)	5.2E+9 ± 3.8E+8 <b>a</b>	4.5E+9 ± 4.8E+8 <b>a</b>	2.0E+10 ± 3.9E+9 <b>b</b>
Yx/g glucosa (cel/ggluc)	3.7+11 ± 2.8E+10 <b>a</b>	3.0E+11 ±3.5E10 <b>a</b>	2.7E+11.0 ± 6.0E+10 <b>a</b>

Además, se calculó la velocidad de específica de esporulación, mostrada en la tabla 8.3. Para este cálculo se graficó el logaritmo natural de la concentración de esporas contra el tiempo, donde la pendiente fue la velocidad específica de esporulación. La mayor velocidad de esporulación la registraron los cultivos X7L y X9AL. En el caso del cultivo X9L, pese a que inició a alta densidad celular, registró una menor velocidad de esporulación.

Tabla 8.3 Porcentaje de esporulación (Spo max) y velocidad de esporulación. (Letras distintas representan diferencias significativas).

Parámetro/Cultivo	X7L	X9L	X9AL
Spo max (%)	90.5 ± 0.03 <b>a</b>	90.0 ± 0.01 <b>a</b>	90.3±0.01 <b>a</b>
$\mu$ esporulación (h <sup>-1</sup> )	0.52 ± 0.05 <b>b</b>	0.37 ± 0.02 <b>a</b>	0.46 ± 0.06 <b>b</b>

Por otro lado, los valores de porcentaje de esporulación (relación esporas/células totales) alcanzados fueron superiores a 90% en todos los casos (figura 8.2.).

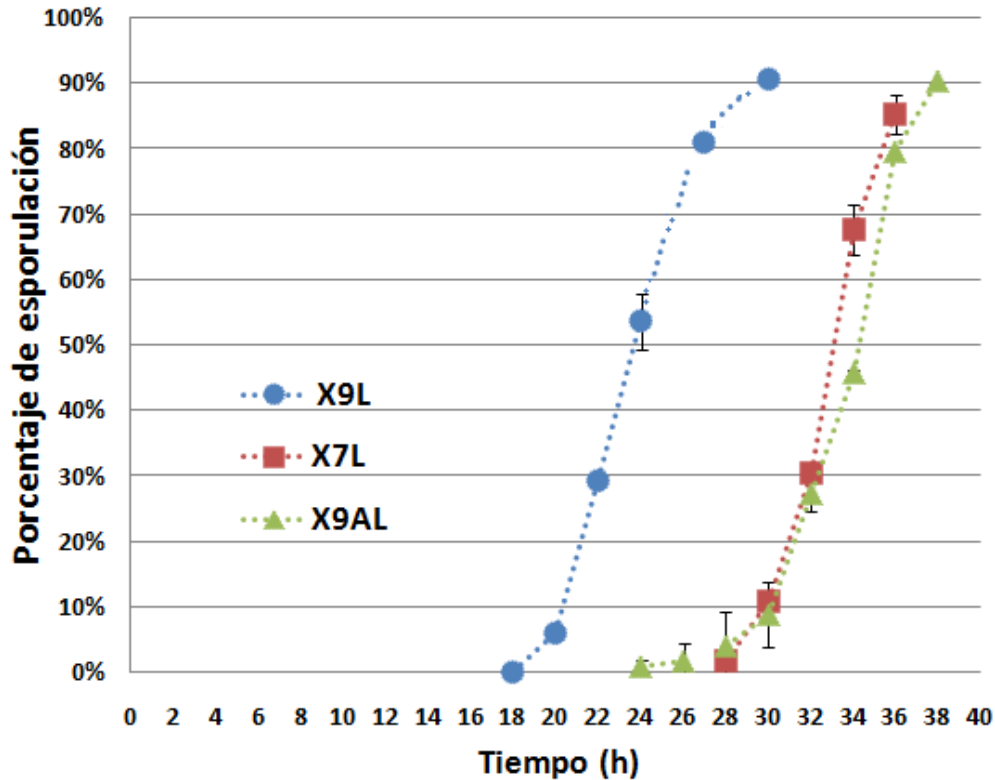


Figura 8.2 Porcentaje de esporulación. Cultivo lote X7L ( $X_o = 9.6 \pm 0.3 \times 10^6$  cel/mL), cultivo lote X9L ( $X_o = 1.0 \pm 0.1 \times 10^9$  cel/mL) y cultivo alimentado X9AL ( $X_o = 1.0 \pm 0.2 \times 10^9$  cel/mL). Se realizó tinción con verde malaquita y se contaron células vegetativas y esporas, a partir de estos valores se calculó el porcentaje de esporulación (esporas/células totales). Los cultivos se realizaron por triplicado, usando medio mineral, en reactores de 1.5L a 30 °C, y pH 6.8. Se muestran los promedios y las desviaciones estándar.

Además, en todos los cultivos sólo se observaron esporas luego de agotarse la glucosa (entre 10 y 12 horas después, figura 8.3). Según lo reportado por Cristiano (2012), al realizarse el cultivo alimentado (X9AL) se esperaba una esporulación temprana, es decir sin limitación nutricional, ya que la concentración celular fue 4 veces lo alcanzado por los otros dos cultivos lotes (X7L y X9L). Sin embargo, no se observaron esporas antes de consumirse la glucosa. Se presume que esto se debe a que a diferencia de lo reportado por Cristiano (2012) el inóculo consistió de células lavadas por lo que las moléculas de comunicación celular generadas durante el crecimiento del inóculo, no estuvieron presentes desde el comienzo del cultivo. Asimismo, la figura 8.3 nos indica el tiempo (horas) que tomó cada cultivo desde que inició la limitación nutricional (glucosa= 0g/L) para alcanzar 80% de esporulación. El valor menor y que por lo tanto, el cultivo que necesitó menor tiempo fue el cultivo X7L, seguido de X9AL.

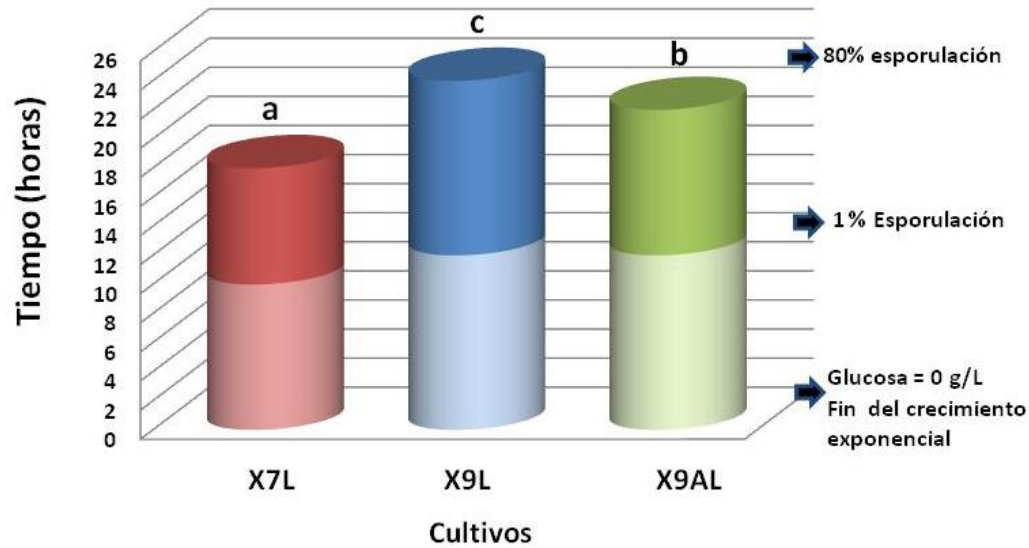


Figura 8.3 Tiempo (horas) desde que inici3 la limitaci3n nutricional hasta que se alcanz3 80% de esporulaci3n. Tiempo cero es igual al tiempo en el que se agot3 la glucosa (limitaci3n nutricional), 1% de esporulaci3n, es el tiempo en el que se comienza a ver esporas teñidas con verde malaquita, y el tiempo final es aquel en el que se alcanza 80% de esporulaci3n. Los cultivos se realizaron por triplicado y se muestran los promedios, no se graficaron las desviaciones porque las r3plicas agotaron la glucosa y alcanzaron el 80% de esporulaci3n en los mismos tiempos. Letras distintas indican diferencias estadisticamente significativas.

Otros valores calculados a partir de las cin3ticas de crecimiento y esporulaci3n, son los porcentajes de c3lulas lisadas, al final del cultivo y con respecto a  $X_{max}$  (calculados seg3n el punto 7.5.3). Estos valores se muestran en la tabla 8.4. All3 se observa que X7L y X9AL alcanzan los mayores valores de c3lulas lisadas as3 como el cultivo X9L present3 la mayor eficiencia de esporulaci3n (concentraci3n de esporas m3xima / concentraci3n celular m3xima en el cultivo - $X_{max}$ ), es decir de un total de c3lulas producidas al final de la fase de crecimiento, el  $59 \pm 8\%$  fueron esporas.

Tabla 8.4 Porcentaje de c3lulas lisadas y esporas con respecto a  $X_{max}$ . (Letras distintas representan diferencias significativas).

Par3metro/Cultivo	X7L	X9L	X9AL
Esporas (%)	$0.41 \pm 0.04$ <b>a</b>	$0.59 \pm 0.08$ <b>b</b>	$0.41 \pm 0.11$ <b>a</b>
C3lulas lisadas (%) - no esporularon	$0.53 \pm 0.05$ <b>b</b>	$0.35 \pm 0.09$ <b>a</b>	$0.54 \pm 0.12$ <b>b</b>

### 8.2.2 Producción de surfactina y bacilomicina

Diferentes cepas de *Bacillus* son capaces de producir lipopéptidos entre ellos bacilomicina y surfactina, ambos con capacidad surfactante y antibiosis. Sin embargo, se ha reportado también la relación de estos metabolitos con el proceso de esporulación y etapas intermedias de la esporulación (Zerouh *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2013, Luo *et al.*, 2015).

Las muestras fueron tomadas en las siguientes etapas de cultivo, que corresponden a distintas condiciones de densidad celular y disponibilidad de nutrientes, como lo indicada la siguiente tabla:

Tabla 8.5. Puntos de muestreo para el análisis de la producción de surfactina, bacilomicina, ácidos orgánicos y viscosidad.

Cultivo/ Muestra	½ Fase exponencial	T0-1 (una hora antes de agotarse la glucosa)	T0+1 (una hora después de agotarse la glucosa)	30% esporulación	80 % esporulación
X7L	Baja densidad celular sin limitación nutricional.	-	Alta densidad celular y limitación nutricional.	Cultivo en proceso de esporulación	Cultivo al final del proceso de esporulación
X9L	Alta densidad celular sin limitación nutricional.	-	Alta densidad celular y limitación nutricional	Cultivo en proceso de esporulación	Cultivo al final del proceso de esporulación
X9AL	-	Alta densidad celular sin limitación nutricional.	Alta densidad celular y limitación nutricional	Cultivo en proceso de esporulación	Cultivo al final del proceso de esporulación

A partir de estos datos se graficó la producción de surfactina en la figura 8.4 y bacilomicina en la figura 8.5. X7L presentó la mayor producción de surfactina y X9AL la mayor producción de bacilomicina D.

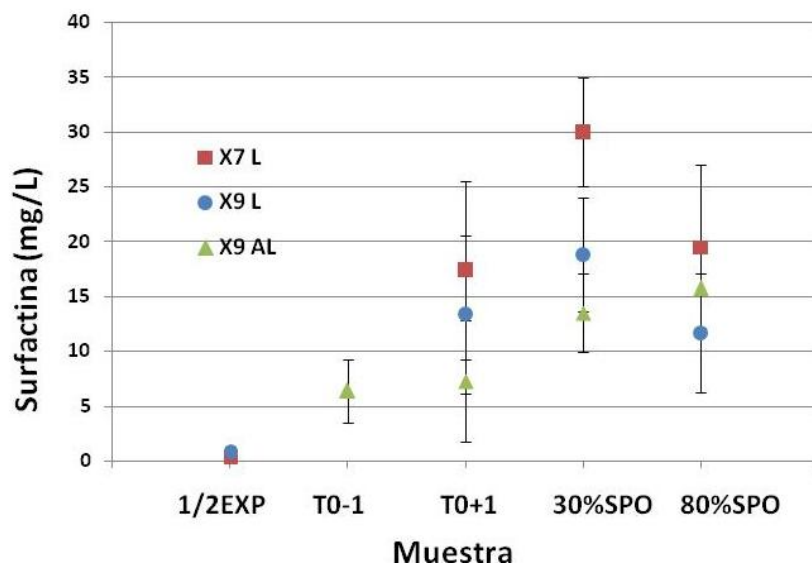


Figura 8.4 Producción de surfactina en cultivo lote X7L ( $X_o = 9.6 \pm 0.3 \times 10^6$  cel/mL), cultivo lote X9L ( $X_o = 1.0 \pm 0.1 \times 10^9$  cel/mL) y cultivo alimentado X9AL ( $X_o = 1.0 \pm 0.2 \times 10^9$  cel/mL). Los cultivos se realizaron por triplicado, usando medio mineral, en reactores de 1.5L a 30 °C, y pH 6.8. Las muestras se tomaron en las siguientes etapas del cultivo, 1/2EXP (Fase exponencial, cultivo lote), T0-1 (1 hora antes de agotarse la glucosa, cultivo alimentado), T0+1 (1 hora después de agotada la glucosa), 30% SPO (30% esporulación) y 80% SPO (80% esporulación). Se muestran los promedios y las desviaciones estándar.

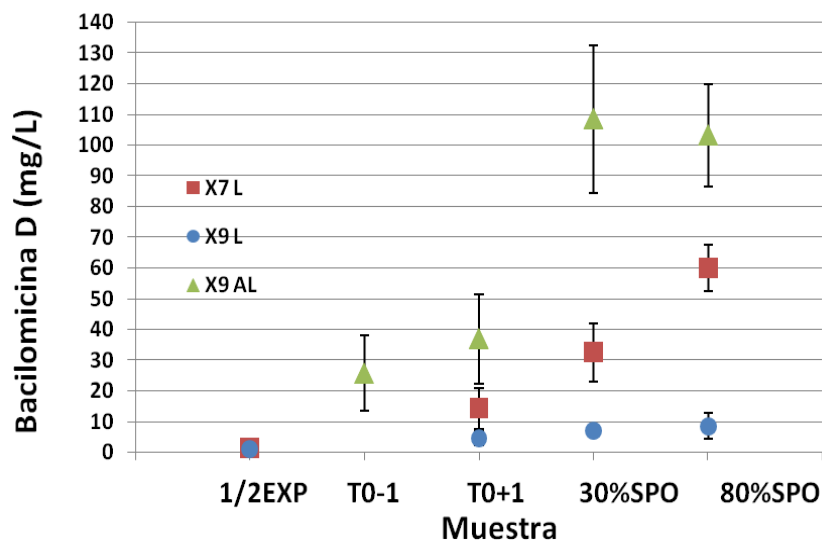


Figura 8.5 Producción de bacilomicina D en cultivo lote X7L ( $X_o = 9.6 \pm 0.3 \times 10^6$  cel/mL), cultivo lote X9L ( $X_o = 1.0 \pm 0.1 \times 10^9$  cel/mL) y cultivo alimentado X9AL ( $X_o = 1.0 \pm 0.2 \times 10^9$  cel/mL). Los cultivos se realizaron por triplicado, usando medio mineral, en reactores de 3L a 30 °C, y pH 6.8. Las muestras se tomaron en las siguientes etapas del cultivo, 1/2EXP (Fase exponencial, cultivo lote), T0-1 (1 hora antes de agotarse la glucosa, cultivo alimentado), T0+1 (1 hora después de agotada la glucosa), 30% SPO (30% esporulación) y 80% SPO (80% esporulación). Se muestran los promedios y las desviaciones estándar.

Además, en la figura 8.6, se muestra la concentración específica de lipopéptidos (miligramos de lipopéptidos por célula), se puede observar que X7L presenta el mayor valor, seguido de X9AL, lo cual coinciden con que estos cultivos registraron una mayor velocidad de esporulación, y con los niveles de transcripción de los genes correspondientes. En cuanto al momento del cultivo en el que se registraron las mayores concentraciones de estos lipopéptidos, se observó que fue cuando el cultivo alcanzó un 30% de esporulación, es decir luego que se agota la glucosa. Sin embargo, en la etapa de crecimiento también se observa producción tanto de surfactina como bacilomicina D, especialmente en el cultivo alimentado que una hora antes que se agote la glucosa alcanza concentraciones de surfactina de  $6.4 \pm 2.2$  mg/L y bacilomicina de  $25.6 \pm 12.3$  mg/L (figura 8.4 y 8.5).

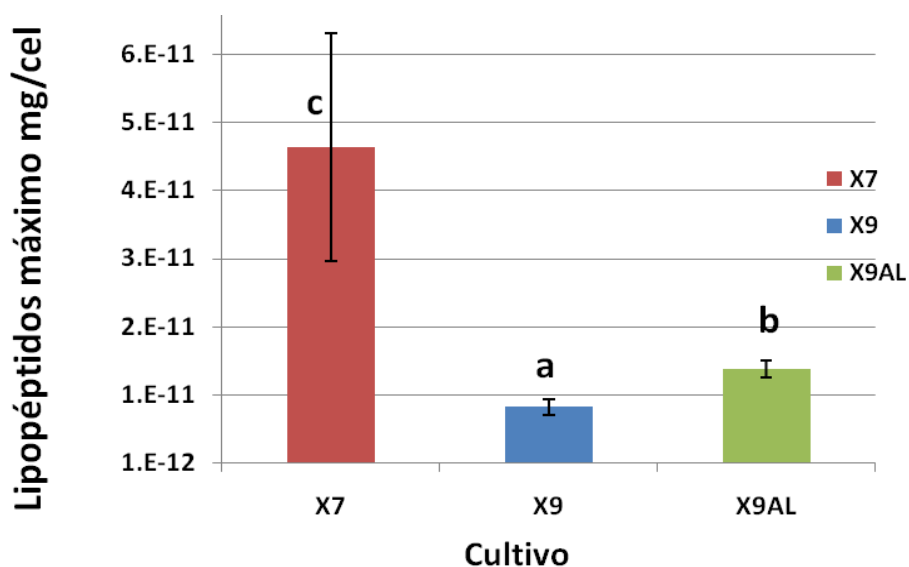


Figura 8.6. Concentración específica máxima de lipopéptidos por célula de *B. amyloliquefaciens* 83 en cultivo lote X7L ( $X_0 = 9.6 \pm 0.3 \times 10^6$  cel/mL), cultivo lote X9L ( $X_0 = 1.0 \pm 0.1 \times 10^9$  cel/mL) y cultivo alimentado X9AL ( $X_0 = 1.0 \pm 0.2 \times 10^9$  cel/mL). Los cultivos se realizaron por triplicado, usando medio mineral, en reactores de 1.5L a 30 °C, y pH 6.8. Las concentraciones específicas fueron las máximas reportadas en cada cultivo, dividiendo los miligramos de surfactina + bacilomicina entre la concentración celular.

### 8.2.3 Ácidos orgánicos

La acumulación de ácidos orgánicos dentro de un cultivo microbiano indica un sobreflujo de carbono y puede cumplir un papel como reserva de energía. Se determinaron los siguientes metabolitos, generados como sub-productos del metabolismo, 2,3 butanodiol, acetoína y ácido

acético. La producción de 2,3 butanodiol y acetoína están relacionados al crecimiento bacteriano y su concentración se incrementa alcanzando su nivel más alto al final de la fase de crecimiento, luego del cual decae probablemente por su consumo, una vez que se acaba la fuente de carbono (Cristiano, 2012). Esto puede observarse en el caso del ácido acético que puede tratarse de un producto del consumo de acetoína, ya que alcanza su mayor concentración al 30% de esporulación, es decir, posterior a los otros ácidos cuantificados (Figura 8.7). La presencia de estos sub productos hace pensar en un sobreflujo de carbono (Cristiano, 2012; Tobisch *et al.*, 1999), que en el caso del cultivo alimentado se registraron los valores máximos, el cual además presentó el mayor valor de lipopéptidos.

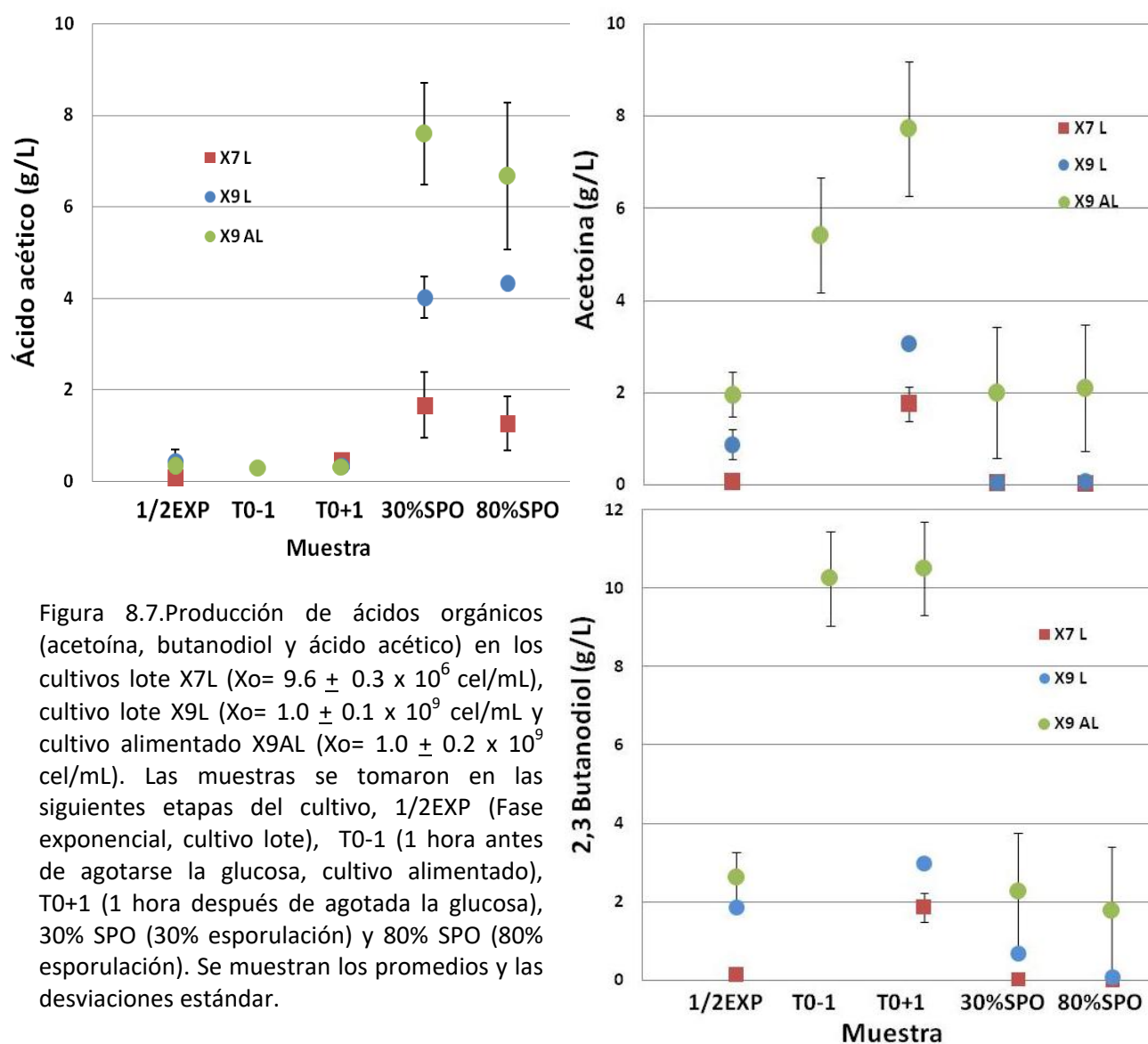


Figura 8.7. Producción de ácidos orgánicos (acetoína, butanodiol y ácido acético) en los cultivos lote X7L ( $X_0 = 9.6 \pm 0.3 \times 10^6$  cel/mL), cultivo lote X9L ( $X_0 = 1.0 \pm 0.1 \times 10^9$  cel/mL) y cultivo alimentado X9AL ( $X_0 = 1.0 \pm 0.2 \times 10^9$  cel/mL). Las muestras se tomaron en las siguientes etapas del cultivo, 1/2EXP (Fase exponencial, cultivo lote), T0-1 (1 hora antes de agotarse la glucosa, cultivo alimentado), T0+1 (1 hora después de agotada la glucosa), 30% SPO (30% esporulación) y 80% SPO (80% esporulación). Se muestran los promedios y las desviaciones estándar.



## 8.2.4 Viscosidad

Las fermentaciones microbianas en las que se desarrolla la síntesis de polímeros como el  $\gamma$ -ácido poliglutámico sufren un efecto sobre el incremento de la viscosidad a etapas tardías del crecimiento (Zhu *et al.*, 2013), por lo tanto se estimó la viscosidad del medio como una manera indirecta de apreciar la producción de exopolímero en el cultivo.

Para la determinación de la viscosidad primero se tuvieron que calcular los valores del índice de flujo ( $n$ ) y el índice de consistencia ( $K$ ), con estos valores se analizó en qué tiempos el caldo de cultivo tenía un comportamiento de fluido Newtoniano o pseudoplástico, de éstos últimos se calculó el valor de la viscosidad aparente a una velocidad de deformación de  $134.6 \text{ s}^{-1}$ . La viscosidad en los diferentes cultivos fue muy cercano a la del agua a  $30^\circ\text{C}$  ( $0.8 \text{ cP}$ ) en casi todas las muestras tomadas (figura 8.8); sólo se observó diferencia en la muestra tomada una hora después que se agotó la glucosa, en el cultivo X7L, en donde presenta un comportamiento pseudoplástico. Los resultados correspondientes a esta muestra (T0+1) para los diferentes cultivos se graficó en la figura 8.9.

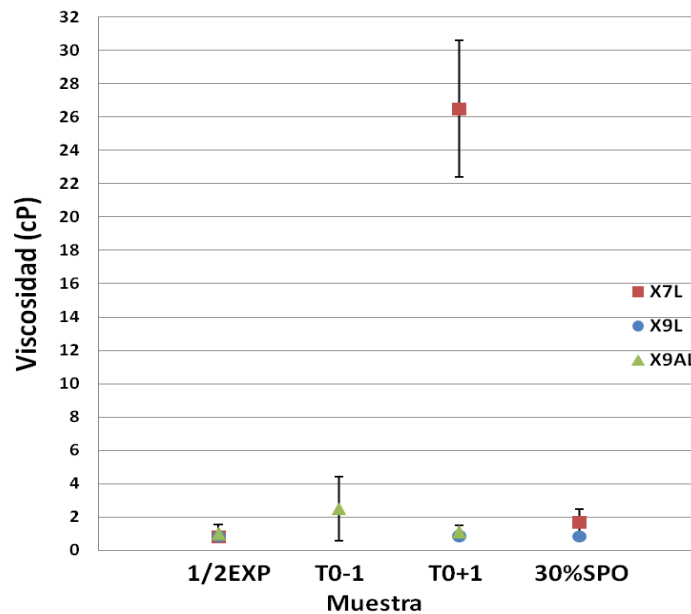


Figura 8.8. Viscosidad (cP) en las siguientes etapas del cultivo, 1/2EXP (Fase exponencial, cultivo lote), T0-1 (1 hora antes de agotarse la glucosa, cultivo alimentado, T0+1 (1 hora después de agotada la glucosa), 30% SPO (30% esporulación). La viscosidad fue medida en un reómetro AR 1000, utilizando una geometría de cono y plato, a  $30^\circ\text{C}$  y a una velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) de  $134.6 \text{ s}^{-1}$ .

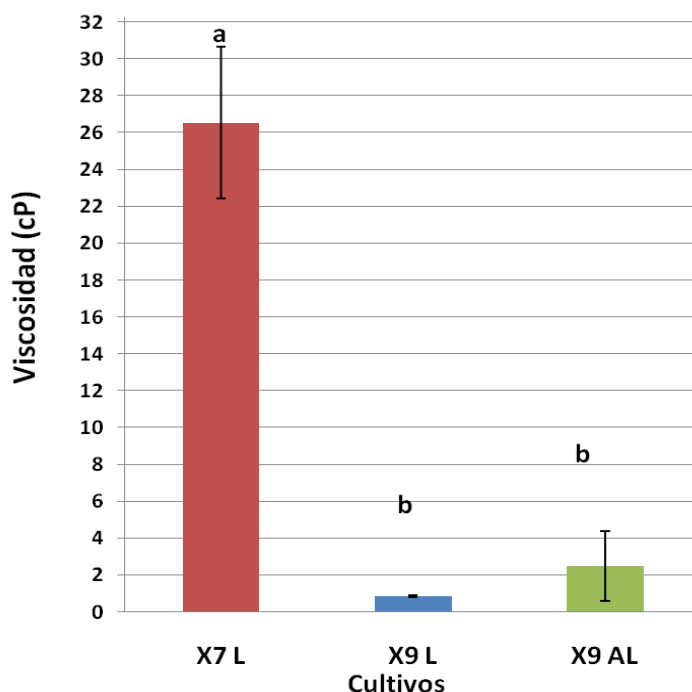


Figura 8.9. Viscosidad (cP) a 1 hora después de agotada la glucosa (T0+1), la viscosidad fue medida en un reómetro AR 1000, utilizando una geometría de cono y plato, a 30 °C y a una velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) de  $134.6 \text{ s}^{-1}$ .

Se conoce que este comportamiento se debe a la acumulación de polímeros extracelulares los cuales provocan un aumento en la viscosidad. Teniendo en cuenta que el cultivo X7L fue el que contó con mayor tiempo, esto pudo permitir que acumulara en mayor grado el biopolímero producido por la cepa.

#### 8.2.5 Niveles de expresión de genes involucrados en *quorum sensing* y diferenciación celular.

Los resultados de RT-qPCR están reportados como niveles de expresión relativos a la condición control, la cual fue la muestra en fase exponencial del cultivo X7L. En este punto el cultivo tenía una concentración celular de  $5.0 \pm 0.2 \times 10^7 \text{ cel/mL}$  (baja densidad celular) y concentración de glucosa mayor a 10 g/L (no limitación nutricional). Por lo que este punto, se considera como una muestra donde no está presente o es mínimo el efecto de la densidad celular y la limitación nutricional. Ésto nos sirve para comparar el patrón de expresión cuando se presenta el efecto de la densidad celular y/o la limitación por nutrientes. Sin embargo, también se necesitó establecer un gen de referencia, para ésto los datos de RT-qPCR fueron incluidos en una hoja de cálculos de Excel (Excel microsoft) y para el análisis se usaron los programas geNorm y Normfinder, que

incluyen algoritmos para asignar un valor de estabilidad M, mientras menor es el valor de M, mayor la estabilidad, de los genes evaluados. Se estableció a *comX* que codifica para un péptido de comunicación celular, como gen de referencia debido a que presenta el menor valor M (<1.5) (criterio establecido por Vandesompele *et al.*, 2002) y mayor estabilidad entre las condiciones evaluadas. Adicionalmente, se ha descrito que este tipo de péptidos señalizadores incrementa conforme incrementa la densidad celular y su expresión es constitutiva (De Vizio, 2011).

A continuación se muestran los resultados de expresión de genes involucrados en *quorum sensing* y esporulación, cuyos niveles de expresión bajo las condiciones evaluadas frente a la condición control fueron significativamente diferentes. (Mayor a 2 veces o menor a 0.5 veces de expresión).

#### **Genes que codifican para moléculas de *quorum sensing*:**

Se muestran los niveles de expresión de dos genes involucrados en la síntesis de los lipopéptidos: *bmyD* que codifica para una malonil-coA transacilasa que participa en la síntesis del lipopéptido bacilomicina D y el gen *srfAA* que codifica para la enzima surfactina sintetasa, involucrada en la síntesis de surfactina. La bacilomicina ha sido propuesta como activadora de la la expresión del gen que codifica para la cinasa C (*kinC*) (Xu *et al.*, 2013) y mientras que la acción de la surfactina es sensada por *kinC*, cinasa que es capaz de activar *spo0A*, regulador de la diferenciación hacia células productoras de matriz y esporulación (Lopez *et al.*, 2009b).

#### **Gen *bmyD***

La expresión del gen *bmyD* está asociada al crecimiento en todos los cultivos y disminuye conforme se desarrolla el proceso de esporulación (figura 8.10); el mayor valor lo presentó el cultivo alimentado (X9AL) en la muestra T0-1 (una hora antes de agotarse la glucosa, alta densidad celular sin limitación nutricional) con  $940.5 \pm 155.0$  veces de expresión frente a la mitad de la fase exponencial del cultivo X7L (condición control), mientras que en la muestra que se tomó una hora después de agotarse la glucosa disminuye la expresión.

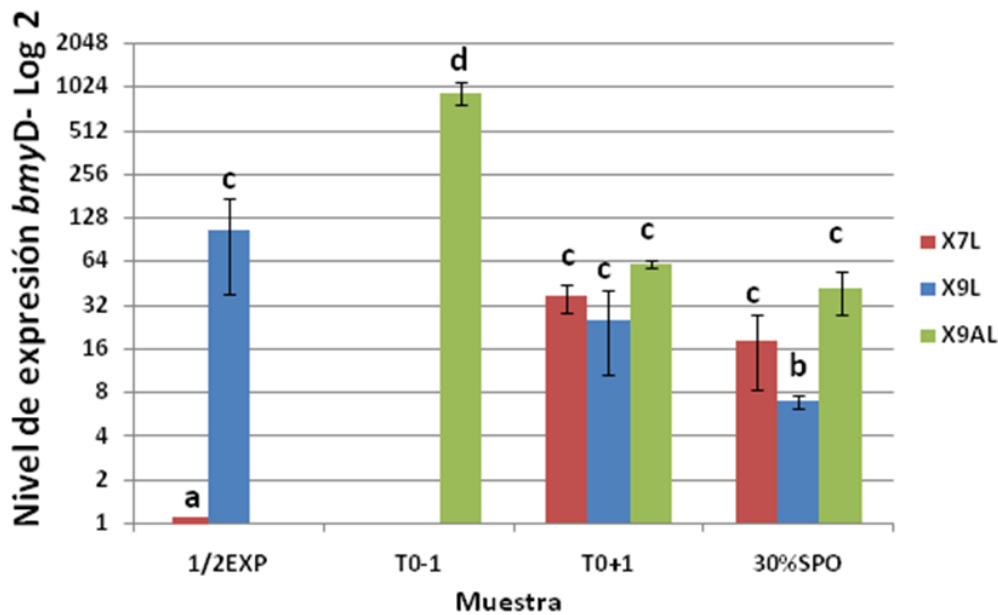


Figura 8.10. Niveles de expresión de *bmyD* (Log<sub>2</sub>) a diferentes etapas del cultivo. 1/2EXP (Fase exponencial, cultivo lote), T0-1 (1 hora antes de agotarse la glucosa, glc aprox.=5g/L- cultivo alimentado), T0+1 (1 hora después de agotada la glucosa), 30% SPO (30% esporulación). La expresión es relativa a la condición EXP (mitad de la fase exponencial del cultivo X7L, X<sub>0</sub>= 9.6 ± 0.3 x 10<sup>6</sup> cel/mL). Letras distintas indican diferencias significativas.

### *srfAA*

El nivel de expresión del gen de *srfAA*, gen que codifica para surfactin sintetasa, disminuyó luego de agotada la glucosa, en el caso del cultivo X7L (X<sub>0</sub>= 9.6 ± 0.3 x 10<sup>6</sup> cel/mL), y en el cultivo X9L (X<sub>0</sub>= 1.0 ± 0.1 x 10<sup>9</sup> cel/mL) al encontrarse en el 30% de esporulación (Figura 8.11). En la etapa estacionaria de estos cultivos se observa la represión de la expresión de este gen. En el caso de la bacilomicina también disminuye la expresión en comparación a la etapa de crecimiento. Sin embargo, los valores tanto de bacilomicina y surfactina alcanzan su valor máximo hasta la etapa de esporulación (figuras 8.4 y 8.5) por lo que no se observa una relación entre la expresión de las sintetisas y los valores máximos de las moléculas sintetizadas por las mismas (bacilomicina y surfactina).

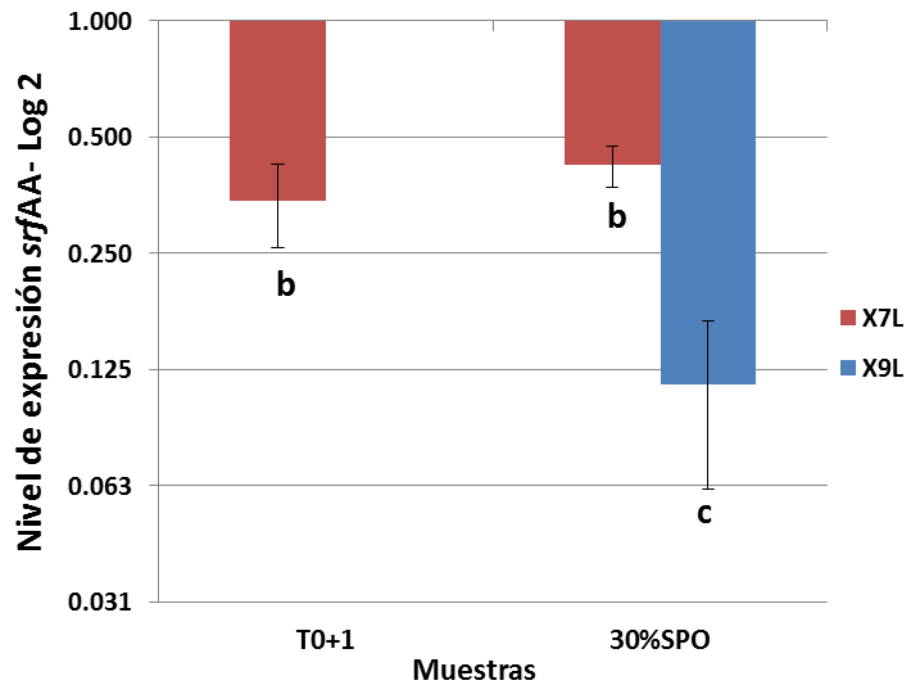


Figura 8.11. Niveles de expresión de *srfAA* (Log<sub>2</sub>) a diferentes etapas del cultivo. T0+1 (1 hora después de agotada la glucosa), 30% SPO (30% esporulación). La expresión es relativa a la condición 1/2 EXP (mitad de la fase exponencial del cultivo X7L,  $X_0 = 9.6 \pm 0.3 \times 10^6$  cel/mL). Letras distintas indican diferencias significativas.

### Genes que codifican para cinasas de esporulación

A continuación se muestran los niveles de expresión de los genes que codifican para las cinasas KinA, KinB, KinC y KinD; estas proteínas se autofosforilan y permiten la acumulación de Spo0A-P, el regulador maestro de la diferenciación hacia células productoras de matriz y esporulación.

#### *kinA*

El gen que codifica para la cinasa A, se sobre expresó en el cultivo alimentado ( $X_0 = 1.0 \pm 0.2 \times 10^9$  cel/mL), en la muestra que fue tomada antes que se agotara la glucosa (5g/L glucosa residual,  $1 \times 10^{10}$  cel/mL). En este punto el nivel de expresión incrementó  $11.1 \pm 5.0$  veces.

### *kinB*

Se observó un incremento en los niveles de expresión de *kinB* en los cultivos X7L y X9AL significativamente distinta al de la condición control, en la muestra correspondiente al 30% de esporulación (figura 8. 12) además de en la muestra tomada antes de agotarse la glucosa en el cultivo alimentado (X9AL).

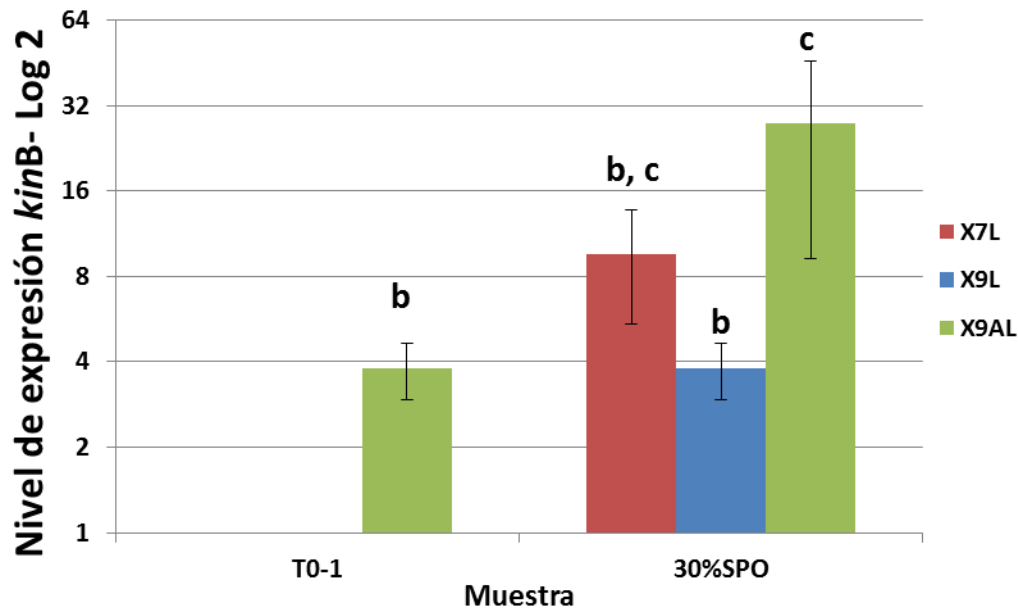


Figura 8.12. Niveles de expresión de *kinB* (Log 2) a diferentes etapas del cultivo. T0-1 (1 hora antes de agotarse la glucosa, glc aprox.=5g/L- cultivo alimentado), 30% SPO (30% esporulación). La expresión es relativa a la condición EXP (mitad de la fase exponencial del cultivo X7L,  $X_0 = 9.6 \pm 0.3 \times 10^6$  cel/mL). Letras distintas indican diferencias significativas.

### *kinC*

El nivel de expresión del gen de la cinasa C disminuyó luego de agotada la glucosa, en el caso del cultivo X7L ( $X_0 = 9.6 \pm 0.3 \times 10^6$  cel/mL), y en el cultivo X9L ( $X_0 = 1.0 \pm 0.1 \times 10^9$  cel/mL) al encontrarse en el 30% de esporulación (Figura 8.13). Esta misma tendencia de disminución en la expresión se observa en la expresión de la surfactina (figura 8.12), en fase exponencial los genes que codifican para surfactina y bacilomicina presentan un nivel de expresión mayor al que se observa luego de agotarse la glucosa.

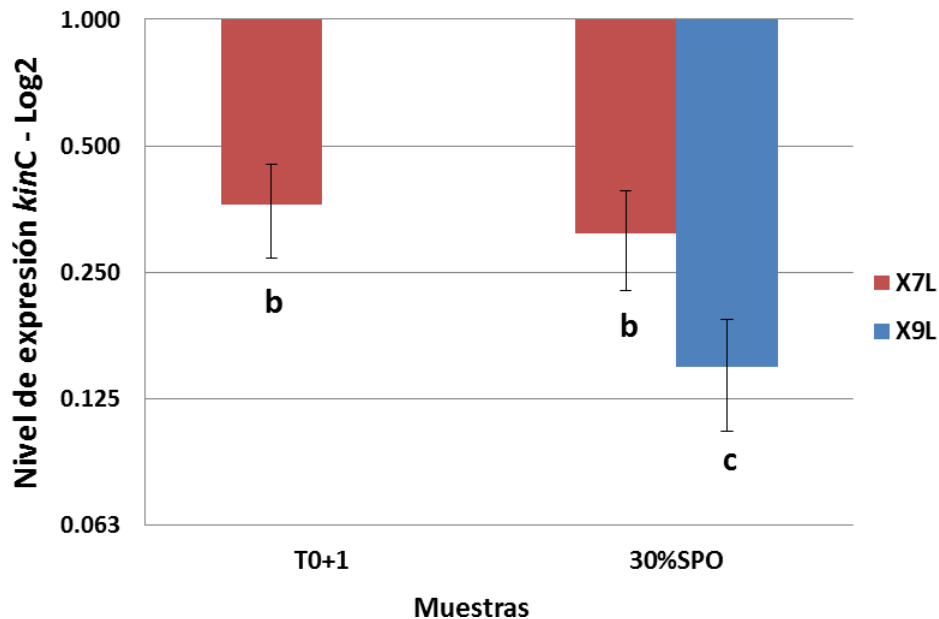


Figura 8.13. Niveles de expresión de *kinC* (Log2) a diferentes etapas del cultivo. T0+1 (1 hora después de agotada la glucosa), 30% SPO (30% esporulación). La expresión es relativa a la condición EXP (mitad de la fase exponencial del cultivo X7L,  $X_0 = 9.6 \pm 0.3 \times 10^6$  cel/mL). Letras distintas indican diferencias significativas.

### *kinD*

El gen de la cinasa D, *kinD*, sólo se sobreescribió en el cultivo alimentado X9AL, ( $X_0 = 1.0 \pm 0.1 \times 10^9$  cel/mL,  $X_{max} = 2.0 \pm 0.4 \times 10^{10}$  cel/mL) al 30% de esporulación, con  $4.6 \pm 1.5$  veces de expresión.

### Genes involucrados en esporulación y producción de matriz.

A continuación se muestran los niveles de expresión de los genes que codifican para *spoIIAA*, gen involucrado directamente con la vía de esporulación, específicamente participa en la etapa II (formación de la preespora) y de *epsA*, gen involucrado en la síntesis de exopolisacárido componente de la matriz extracelular. Ambas vías son gobernadas por Spo0A-P.

### *spoIIAA*

La expresión del gen *spoIIAA* (factor anti-anti sigma) permite que el factor sigma de la preespora, sigmaF, pueda gobernar la transcripción de los genes correspondientes. SigmaF es bloqueada por

*spolIAB* (factor antisigma), sin embargo, *spolIIA* (factor anti anti sigma) libera a sigmaF al unirse a *spolIAB* (Clarkson *et al.*, 2004). Se puede observar que *spolIIA* incrementa su expresión a mitad de fase exponencial en el cultivo X9L ( $X_0 = 1.0 \pm 0.1 \times 10^9$  cel/mL), con respecto a la condición control (Figura 8.14), luego conforme transcurre el cultivo se observa en las siguientes muestras, como este valor en la expresión va en aumento, siendo el mayor valor el registrado al 30% de esporulación, la misma tendencia puede observarse en el otro cultivo lote, X7L ( $X_0 = 9.6 \pm 0.3 \times 10^6$  cel/mL). En el caso del cultivo alimentado no se observan diferencias entre los tiempos de cultivo, pero si cabe notar que incluso cuando la glucosa no se ha agotado (muestra T0-1) los niveles de expresión de *spolIIA* son superiores con respecto a la condición control.

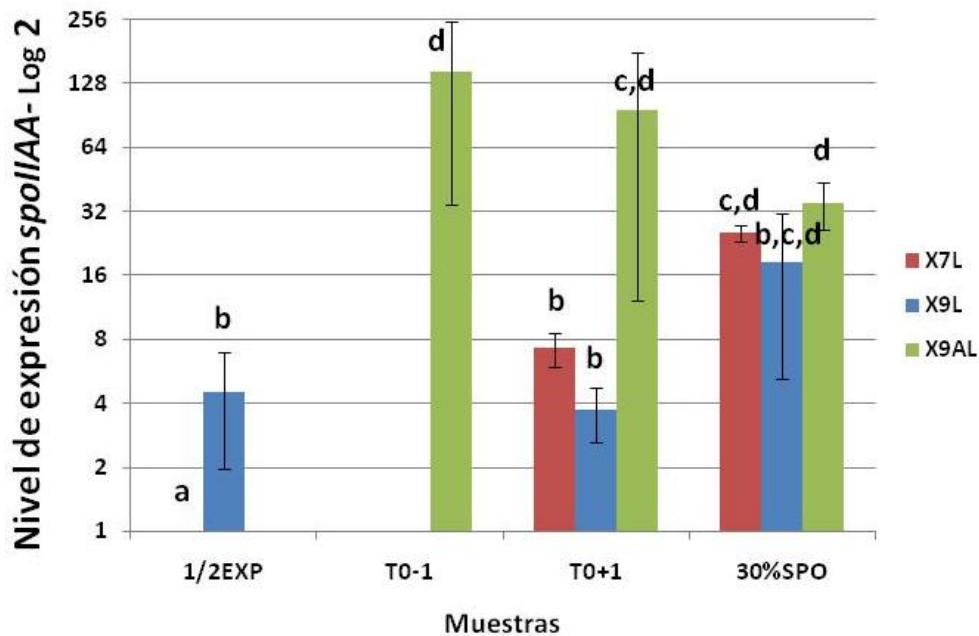


Figura 8.14. Niveles de expresión de *spolIIA* (Log<sub>2</sub>) a diferentes etapas del cultivo. 1/2EXP (Fase exponencial, cultivo lote), T0-1 (1 hora antes de agotarse la glucosa, glc aprox.=5g/L- cultivo alimentado), T0+1 (1 hora después de agotada la glucosa), 30% SPO (30% esporulación). La expresión es relativa a la condición EXP (mitad de la fase exponencial del cultivo X7L,  $X_0 = 9.6 \pm 0.3 \times 10^6$  cel/mL). Letras distintas indican diferencias significativas.

Existe por tanto una evidencia de que en cultivos de alta densidad celular ( $> 1 \times 10^9$  cel/mL) y bajo condiciones de no limitación nutricional, X9L en etapa de mitad de fase exponencial y X9AL (glucosa  $> 5$ g/L), el gen de inicio de esporulación se activa, demostrando que la densidad celular puede tener un efecto sobre la inducción del proceso de esporulación.



## *epsA*

El gen *epsA* incrementa su nivel de expresión en las etapas tardías del cultivo, en los tres cultivos se observó una mayor expresión relativa en la muestra tomada al 30% de esporulación (figura 8.15). Sin embargo, se comienza a observar un aumento en la expresión de *epsA* desde la muestra tomada después que se agota la glucosa.

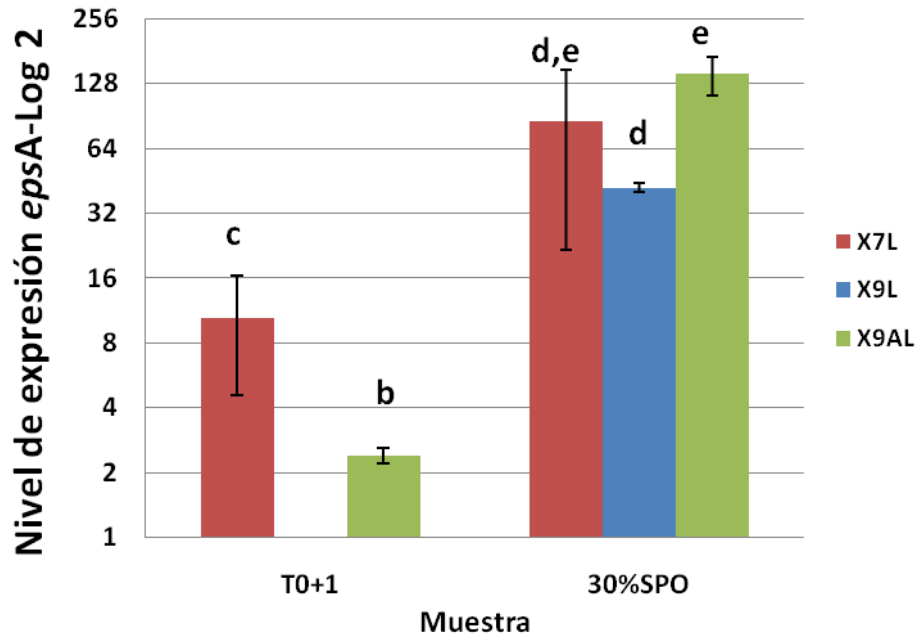


Figura 8.15. Niveles de expresión de *epsA* (Log<sub>2</sub>) a diferentes etapas del cultivo. 1/2EXP (Fase exponencial, cultivo lote), T0-1 (1 hora antes de agotarse la glucosa, glc aprox.=5g/L- cultivo alimentado), T0+1 (1 hora después de agotada la glucosa), 30% SPO (30% esporulación). La expresión es relativa a la condición EXP (mitad de la fase exponencial del cultivo X7L,  $X_0 = 9.6 \pm 0.3 \times 10^6$  cel/mL). Letras distintas indican diferencias significativas.

A continuación se presentan los resultados agrupados por los genes que se sobreexpresan (mayor a 2 veces) o subexpresan (menor a 0.5 veces de expresión) en diferentes condiciones de cultivo.

La tabla 8.6 nos muestra los genes que se sobreexpresaron bajo condiciones de alta densidad celular sin limitación nutricional para los cultivos X9L y X9AL, estos resultados son relativos a la expresión de la mitad de la fase exponencial del cultivo X7L, donde el efecto de la densidad celular y la limitación nutricional son mínimos. Es decir, la expresión de *bmyD*, *kinA*, *kinB* y *spolI*AA, presentados en la tabla 8.6, es activada por el efecto de la densidad celular.

Tabla 8.6. Genes que se sobreexpresan en fase de crecimiento. (Mitad de la fase exponencial en cultivos lote X9L y una hora antes de agotarse la glucosa X9AL). En esta etapa no hay efecto de la limitación nutricional, únicamente de la densidad celular. La condición control para estos resultados es la mitad de la fase exponencial del cultivo X7L (baja densidad celular y sin limitación nutricional). Letras distintas indican diferencias significativas en la expresión de cada gen.

<i>Gen</i>	Producto	Función/vía involucrada	Cultivo	
			X9L	X9AL
<i>bmyD</i>	malonil-coA transacilasa	Síntesis de bacilomicina/ <i>quorum sensing</i>	105.9 ± 67.1 b	940.5 ± 155.0 c
<i>kinA</i>	Cinasa A	Fosforilación de Spo0A/ producción de matriz extracelular, canibalismo y esporulación	-	11.1 ± 5.6 b
<i>kinB</i>	Cinasa B		-	3.8 ± 0.8 b
<i>spolI</i>	Factor anti-antisigma F	Activación de sigma F/inicio de la esporulación	4.5 ± 2.0 b	143.0 ± 108.5 c

La tabla 8.7 nos muestra los genes que se sobre expresaron bajo condiciones de limitación nutricional, una hora después de agotada la glucosa, para los 3 cultivos: X7L, X9L y X9AL. Estos resultados son relativos a la expresión de la mitad de la fase exponencial del cultivo X7L, donde el efecto de la densidad celular y la limitación nutricional son mínimos. Bajo esta condición se sobre expresaron *bmyD*, *kinA*, *kinB*, *kinC* y *spolI*, y sub expresó *srfAA*.

Tabla 8.7. Genes involucrados en esporulación y *quorum sensing* que se sobreexpresaron o subexpresaron bajo limitación nutricional. Fase estacionaria del cultivo. (Una hora después que se agotó la glucosa). En esta etapa hay efecto de la limitación nutricional y de la densidad celular. La condición control para estos resultados es la mitad de la fase exponencial del cultivo X7L (baja densidad celular y sin limitación nutricional- efecto de ambos factores disminuidos). Letras distintas indican diferencias estadísticas en la expresión de cada gen presentado.

Gen	Producto	Función/vía involucrada	Cultivo		
			X7L	X9L	X9AL
<i>bmyD</i>	malonil-coA transacilasa	Síntesis de Bacilomicina/ <i>quorum sensing</i>	36.9 ± 8.1b	25.3 ± 14.8b	62.2 ± 4.3b
<i>srfAA</i>		Síntesis de Surfactina/ <i>quorum sensing</i> , <i>competencia</i>	0.3 ± 0.1 b	-	-
<i>kinA</i>	Cinasa A	Fosforilación de Spo0A/ producción de matriz extracelular, canibalismo y esporulación	-	-	11.1 ± 5.6 b
<i>kinB</i>	Cinasa B		-	-	3.8 ± 0.8 b
<i>kinC</i>	Cinasa C		0.4 ± 0.1 b	-	-
<i>spollAA</i>	Factor anti-antisigma F	Activación de sigmaF/inicio de la esporulación	7.2 ± 1.4 b	3.7 ± 1.1 b	94.6 ± 82.5 c

La tabla 8.8 nos muestra los genes que se sobre expresaron cuando el cultivo bajo condiciones de limitación nutricional, al 30% de esporulación. Estos resultados son relativos a la expresión de la mitad de la fase exponencial del cultivo X7L, donde el efecto de la densidad celular y la limitación nutricional son mínimos. Bajo esta condición se sobre expresaron *bmyD*, *kinA*, *kinB*, *kinD*, *epsA* y *spollAA*, y sub expresaron *srfAA* y *kinC*.

Tabla 8.8. Genes involucrados en esporulación y *quorum sensing* que se sobre expresaron o subexpresaron fase estacionaria tardía del cultivo (30% esporulación. En esta etapa hay efecto de la limitación nutricional y de la densidad celular. La condición control para estos resultados es la mitad de la fase exponencial del cultivo X7L (baja densidad celular y sin limitación nutricional). Letras distintas indican diferencias significativas en la expresión de cada gen.

Gen	Producto	Función/vía involucrada	Cultivo		
			X7L	X9L	X9AL
<i>bmyD</i>	malonil-coA transacilasa	Síntesis de bacilomicina/ <i>quorum sensing</i>	18.2 ± 9.8 c	6.9 ± 0.6 b	41.3 ± 13.7 c
<i>srfAA</i>		Síntesis de surfactina/ <i>quorum sensing</i> , <i>competencia</i>	0.4 ± 0.05 b	0.1 ± 0.05 c	-
<i>kinB</i>	Cinasa B	Fosforilación de Spo0A/ producción de matriz extracelular, canibalismo y esporulación	9.5 ± 4.1 b,c	3.8 ± 0.9 b	27.6 ± 18.3 c
<i>kinC</i>	Cinasa C		0.31 ± 0.08 b	0.15 ± 0.04 c	-
<i>kinD</i>	Cinasa D		-	-	4.6 ± 1.5 b
<i>spolIAA</i>	Factor anti-antisigmaF	Activación de sigmaF/ inicio de la esporulación	25.1 ± 2.2 b	18.3 ± 13.1 b	34.7 ± 8.7 b
<i>epsA</i>	Tirosin cinasa	Síntesis de exopolisacárido/Formación de biofilm.	85 ± 63.5 b,c	41.9 ± 1.9 b	63.5 ± 28.9 c

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Poco se ha reportado del papel de las moléculas de *quorum sensing* y cinasas activadoras de Spo0A en cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*. Lo que se conoce sobre el papel de las moléculas señalizadoras así como las proteínas sensoras y de respuesta que desencadenan diferenciación celular en el género *Bacillus*, ha sido reportado en *Bacillus subtilis*. Este trabajo nos acerca a la comprensión de la relación de estas moléculas con la esporulación. Si bien se habían reportado trabajos como los de Solomon *et al.* (1996) y Grossman & Losick (1988); tampoco en *Bacillus subtilis*, existen mayores aportes que planteen alguna relación entre la densidad celular con la esporulación.

Los cultivos realizados en este trabajo fueron 3. Los dos primeros se trataron de dos cultivos lote, uno con concentración inicial igual a  $9.6 \pm 0.3 \times 10^6$  cel/mL (X7L) y el otro a  $1.0 \pm 0.1 \times 10^9$  cel/mL (X9L), al final del crecimiento ambos cultivos alcanzaron densidades celulares similares o sin diferencia estadística y no se observaron esporas antes de agotarse la glucosa. En el tercer cultivo, X9AL (cultivo alimentado,  $X_0 = 1.0 \pm 0.2 \times 10^9$  cel/mL), se alcanzó una concentración mayor de  $X_{max}$  ( $2.0 \pm 0.4 \times 10^{10}$  cel/mL) en comparación a los cultivos lote, así se esperó incrementar el efecto de la densidad celular para comprobar si bajo estas condiciones, alta densidad celular y sin limitación nutricional, era posible observar esporas (esporulación temprana previa a la limitación nutricional). Sin embargo, en todos los casos se observaron esporas luego de agotarse la glucosa. A pesar de tratarse de cultivos con alta densidad celular se necesita de limitación nutricional para iniciar un crecimiento en la población de esporas.

Al observar los resultados de producción de lipopéptidos (surfactina y bacilomicina D), los cultivos que mayores valores alcanzan de estas moléculas son X9AL y X7L. El cultivo lote X9L, inicia con alta densidad celular; sin embargo, la producción de lipopéptidos es menor que el caso del cultivo X7L que inicia a baja densidad celular. Por otro lado, comparando los cultivos X9L y cultivo alimentado X9AL, se observa que el cultivo alimentado es quien alcanza mayor producción de lipopéptidos. Esto se debe a que si bien iniciaron a un mismo nivel de densidad celular ( $1 \times 10^9$  cel/mL), X9AL contó con 60g/L de glucosa adicionales que pudieron haber favorecido la acumulación en mayor grado de moléculas de *quorum sensing* relacionadas con la esporulación. Esta diferencia en la

producción de metabolitos también puede explicarse por el número de duplicaciones en cada cultivo. Así, en el cultivo X9AL se realizaron 4 duplicaciones mientras que el lote X9L apenas 2; y comparando entre los cultivos lote; el cultivo lote X7L, que inició con  $9.6 \pm 0.3 \times 10^6$  cel/mL fue el de mayor número de duplicaciones (9).

Se asume que los péptidos señalizadores se sintetizan constitutivamente a través del crecimiento, como consecuencia alcanzan una concentración umbral a cierta densidad celular (Rutherford & Bassler, 2012; Comella y Grossman, 2005). Ésto se pudo comprobar en los niveles de transcripción de *comX* y *phrC* los cuales mostraron una expresión constante. La acumulación de estos señalizadores es sensada por histidin cinasas, las cuales al autofosforilarse encienden una serie de vías que desembocan en la expresión de otras moléculas (Lopez & Kolter, 2010). En este caso se cuantificaron dos lipopéptidos, surfactina y bacilomicina D, ya que se conoce que están involucrados en la diferenciación celular hacia células productoras de matriz, una vía intermedia en la esporulación (Lopez *et al.*, 2009b; Shank & Kolter, 2011; Xu *et al.*, 2013). Estos lipopéptidos alcanzaron su máxima producción luego de la fase de crecimiento, sin embargo antes de agotarse la glucosa ya había producción de los mismos. La siguiente interrogante es si la concentración que alcanzaron durante la fase de crecimiento pudo tener efecto sobre la diferenciación celular de la cepa. Lopez *et al.*, (2009b) adicionaron surfactina (20  $\mu$ M) a un cultivo de *Bacillus subtilis* que no había producido este lipopéptido, para corroborar si se estimulaba la formación de *biofilm*, se observó que la acción de la surfactina provocaba la activación de KinC y finalizaba en la expresión de proteínas componentes de matriz extracelular y la recuperación de la capacidad de formar biopelícula sobre el medio de cultivo. Por otro lado, el efecto de las moléculas de *quorum sensing*, CSF tuvo un efecto sobre la esporulación de manera concentración dependiente, desde 50nM hasta 100nM (Solomon *et al.*, 1996). Otro ejemplo del efecto concentración dependiente de surfactina y bacilomicina lo presentan Luo *et al.* (2015), quienes al adicionar entre 10-100  $\mu$ M de surfactina, bacilomicina o la mezcla de ambas, a cepas mutantes de estos lipopéptidos, recuperan su morfología. En este trabajo antes de agotarse la glucosa, se alcanzaron valores de surfactina 6.2  $\mu$ M y 24  $\mu$ M de bacilomicina (una hora antes de agotarse la glucosa, cultivo X9AL). Si bien no existe un reporte que relacione de manera directa los lipopéptidos con la esporulación, se ha demostrado que la surfactina es capaz de activar la cinasa C (Lopez *et al.*, 2009b); mientras que la bacilomicina, la expresión de esta misma cinasa (Xu *et al.*, 2013). Por lo anterior; proponemos que

el ingreso a la vía de esporulación, reflejado en la sobreexpresión de *spoIIAA*, puede darse debido al efecto de estos lipopéptidos, especialmente al de la bacilomicina D, cuya expresión es superior en el cultivo X9AL y a la vez está relacionado con el nivel de expresión de *spoIIAA*, en el mismo cultivo, incluso antes de agotarse la glucosa. La razón por la que aún activándose la expresión de *spoIIAA*; cuya expresión requiere un alto nivel de *spo0A* fosforilado (Fujita & Losick, 2005), no se logran observar esporas hasta después de por lo menos 12 horas de agotada la glucosa no ha podido ser explicada. Sin embargo, se conoce que el proceso de esporulación es un proceso que cuenta con subsecuentes etapas en la que inmediatamente *spoIIAA* debe defosforilarse, esto ha sido relacionado con una disminución de ATP (Clarkson *et al.*, 2004), lo cual puede ser una forma de sentir la limitación nutricional. En procesos posteriores, en la pre espora, una señal de limitación puede ser requerida para seguir con las etapas de maduración de la espora, la cual recién puede ser teñida y observada al microscopio.

Además, se cuantificaron ácidos orgánicos y la viscosidad como una medida indirecta de la producción de exopolímero. Se observó que tanto la concentración de ácidos orgánicos como la viscosidad alcanzan su mayor valor al final del crecimiento. Estos compuestos de reserva energética se van acumulando conforme se desarrolla el cultivo y alcanzan su mayor valor al final del crecimiento, luego del cual decaen (Cristiano, 2012). Este comportamiento se observa en todos los cultivos analizados, sin embargo el grado de acumulación de las moléculas es diferente según el cultivo. El cultivo X9AL alcanzó los mayores valores de acetoína, ácido acético, 2,3 butanodiol; y en el caso de la viscosidad, el cultivo X7L supera en dos órdenes de magnitud los valores a los otros cultivos. Este aumento en la viscosidad puede deberse a una mayor producción y acumulación de ácido poli- $\gamma$ - glutámico, un compuesto polimérico extracelular que incrementa la viscosidad del medio de cultivo (Kambourova *et al.*, 2001, Meissner, *et al.*, 2015).

Considerando el crecimiento celular y que contó con mayor cantidad de glucosa por célula es explicable que en el cultivo X7L se observó mayor cantidad de metabolitos de comunicación celular, producción de ácidos orgánicos y viscosidad, que en el cultivo lote X9L.

El análisis de transcritos nos permitió observar qué genes de las vías de esporulación y señalización celular se activan bajo condiciones de no limitación nutricional y de limitación nutricional a alta densidad celular. En la figura 9.1 se observan los niveles de expresión de aquellos genes que se

sobreexpresaron en los cultivos X9L y X9AL. Se observa que aún bajo condiciones de no limitación nutricional el gen *spoIIAA* se sobreexpresa; de igual manera *kinA* y aunque en menor medida, también *kinB*. Estas dos cinasas pueden ser las fuentes de entrada para la vía de esporulación que activa a *spo0A* y provoca la expresión de *spoIIAA*, pero de qué manera se podría estar dando la activación de la expresión estas cinasas ya que éstas han sido relacionadas con la limitación nutricional (Tojo *et al.*, 2013); ya que, no se conoce con exactitud la o las señales que incrementan su expresión. Sin embargo, se ha propuesto que la expresión de *kinA* se produce en un estado activo ya que el dominio sensor estaría cumpliendo un papel estructural para permitir al dominio efector (histidin cinasa) fosforilar una segunda molécula que luego da lugar al incremento del regulador maestro de la esporulación *spo0A* (Eswaramoorthy *et al.*, 2010), esto podría ser una entrada a la cascada de fosforilación que permite la sobre expresión de *spoIIAA*. Además, en este escenario de no limitación podemos observar que *bmyD*, que codifica para una enzima del complejo bacilomicina sintetasa también está siendo sobreexpresada. De igual forma, la cuantificación de esta molécula para el cultivo X9AL corresponde a  $25.7 \pm 12.3$  mg/L que podría estar siendo suficiente para permitirle a la bacteria diferenciarse y activar la cascada de señales e incrementar *spo0A*-P, desencadenando la expresión de *kinA* y *spoIIAA*.

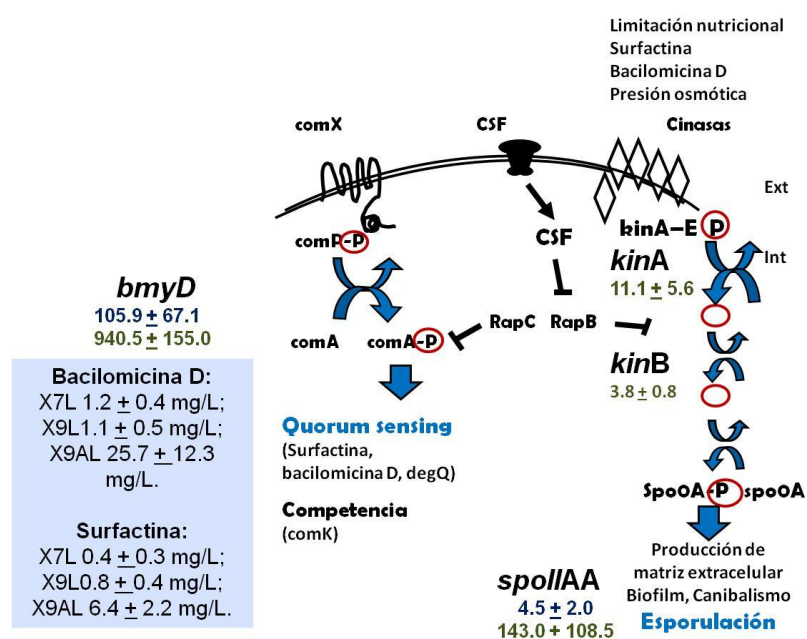


Figura 9.1 Expresión de genes a alta densidad celular sin limitación nutricional. Genes sobreexpresados en cultivos X9L (mitad de la fase exponencial números en azul) y X9AL (una hora antes que se agote la glucosa-números verdes), relativos a la mitad de la fase exponencial de X7L (mínimo efecto de la densidad celular y la limitación nutricional).



En la figura 9.2 podemos observar los genes que se sobreexpresan o subexpresan cuando cada uno de los cultivos se encuentra al 30% de esporulación, como era de esperarse en este punto más genes relacionados con las vías de señalización y esporulación están siendo alterados en sus niveles de de expresión.

Los genes que se activan en mayor medida luego que se agota la glucosa son *kinB*, *epsA*, *spoIIAA*. Este resultado de *kinB* corresponde a lo señalado por Tojo *et al.* (2013) quienes indican que la limitación nutricional, específicamente un bajo nivel de GTP activa la cinasa B y ésta a su vez activa la vía de fosforilación hacia la acumulación de spo0A-P, regulador maestro de la diferenciación hacia células productoras de matriz extracelular y esporas. Ésto se confirma con la mayor expresión de *epsA*, gen relacionado con síntesis de exopolisacárido y de *spoIIAA* (inicio de la esporulación), gen que se expresa en mayor nivel después del agotamiento de la glucosa.

Por su parte, los genes *kinC*, *srfAA* y *bmyD* disminuyen su expresión luego de agotarse la glucosa en los cultivos X7L y X9L, esto no corresponde a la producción de surfactina y bacilomicina ya que estas moléculas alcanzan su mayor valor en la fase estacionaria.

El gen que codifica a KinD únicamente ve incrementado sus niveles de expresión en el cultivo alimentado, al 30% de esporulación; esto pudo deberse a algún fenómeno físico o químico que estaría sensando y que se vio amplificado en el cultivo alimentado ya que en los otros cultivos no se observó. Si bien no se ha identificado el factor específico que pudo activar la expresión de cinasa D, se ha propuesto que KinD responde a diferentes estímulos entre ellos cambio de presión osmótica. (Aguilar *et al.*, 2010; Rubinstein *et al.*, 2012, Chen *et al.*, 2012). Además, la cinasa D ha sido relacionada con la formación de *biofilm*, teniendo en cuenta que las células que se diferencien a células productoras de matriz polimérica son aquellas que presentan una concentración de spo0A-P a un nivel menor que el necesario para la esporulación (Fujita *et al.*, 2005). Ésta cascada de fosforilación puede estar provocada por la activación de KinD tal como lo proponen Chen *et al.*(2012).

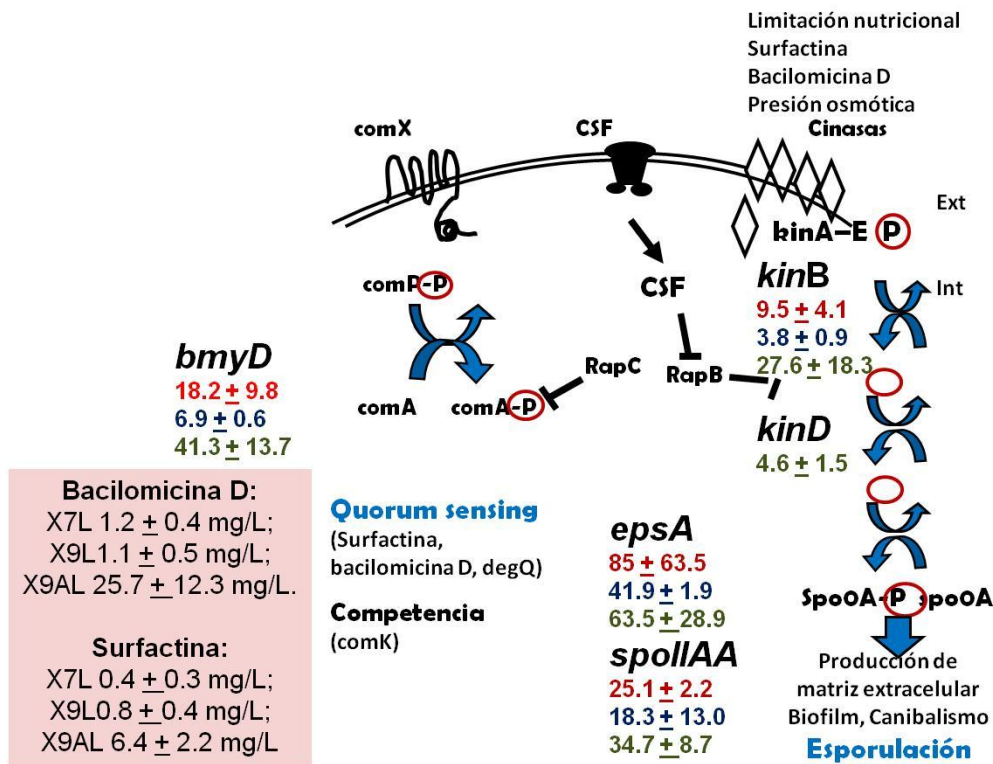


Figura 9.2 Expresión de genes a 30% esporulación. Genes sobreexpresados en Cultivos X7L (números rojo), X9L (números en azul) y X9AL (números verdes), relativos a la mitad de la fase exponencial de X7L (mínimo efecto de la densidad celular y la limitación nutricional).

Por otro lado, se analizaron los porcentajes de células esporuladas y células lisadas, con respecto a  $X_{max}$ . Se resalta que los cultivos X7L y X9AL alcanzan los mayores valores de células lisadas. Gonzalez-Pastor (2010) reportó que para *Bacillus subtilis*, las células que producen toxinas, destruyen a otras células y realizan esto, con el fin de obtener energía necesaria para el proceso de esporulación. Si bien en la cepa de trabajo no se han identificado genes que sintetizen toxinas involucradas en canibalismo, existió un porcentaje de células que al lisarse no dieron lugar a células que se diferenciaron a esporas y cuya lisis pudo sólo haber servido como material energético para el proceso de esporulación. En el caso del cultivo X9L este porcentaje de células lisadas fue menor, ésto sumado a que la acumulación de moléculas de *quorum sensing* asociadas a la densidad celular también fue menor en el cultivo X9L, podría explicar por qué a pesar de iniciar a alta densidad celular esta cepa presentó la menor velocidad de esporulación. A pesar de estos resultados para el cultivo X9L, menor velocidad de esporulación, cabe recordar que al tener menor porcentaje de células lisadas, presentó la mayor eficiencia de esporulación (porcentaje de esporas

con respecto a  $X_{max}$ ). Es decir de un total de células producidas al final de la fase de crecimiento, el  $59 \pm 8\%$  generaron esporas, lo cual es significativamente mayor a lo obtenido por los cultivos X7L y X9AL (ambos con un  $41 \pm 1\%$ ). Estos resultados nos indican que los cultivos que presentaron mayor producción de bacilomicina y surfactina, mayor número de células desviaron su diferenciación a tipos celulares como células caníbales y productoras de matriz polimérica y esto disminuyó la eficiencia de esporulación al haber menos células destinadas a esporular.

Finalmente, integrando los resultados de cinética de crecimiento, producción de lipopéptidos, viscosidad, niveles de expresión de genes involucrados con la diferenciación celular, con los resultados de esporulación y células lisadas, se puede observar como los cultivos X7L y X9AL son los que registran la mayor velocidad de esporulación lo cual podrían explicarse con la producción de metabolitos que, a concentraciones presentes en cultivos de alta densidad celular, permiten la activación de genes relacionados con la esporulación ya que por ejemplo, permiten la producción de bacilomicina D y surfactina; y éstas han sido reportadas como moléculas que afectan la diferenciación celular a células formadoras de matriz. Luo *et al.* (2015), demostraron que mutantes de bacilomicina y surfactina de *Bacillus subtilis*, disminuían su capacidad en colonizar plantas mientras que al agregarse estas moléculas se restauraba la colonización. Ellos concluyeron que el efecto de estas moléculas sobre la formación de *biofilm* era sinérgico.

En otras cepas de *Bacillus* como *Bacillus thuringiensis*, también se ha reportado la estrecha relación de la regulación por moléculas de *quorum sensing* y la diferenciación celular. Verplaetse *et al.* (2016) reportaron que dentro de un *biofilm* de *B. thuringiensis* se pueden encontrar tipos celulares como células virulentas controladas por PclR, células necrotróficas dependientes de NprR, y células en proceso de esporulación; éstas últimas pueden pasar por una etapa intermedia de células necrotróficas. Por su parte, Di Luccia *et al.* (2015) observaron que en un aislado marino de *Bacillus pumilus* los procesos de producción de matriz polimérica, pigmentación y esporulación están interconectados y regulados por un mecanismo molecular común.

Específicamente, en *Bacillus amyloliquefaciens*, Xu *et al.* (2013), también reportaron un efecto similar concluyendo que la bacilomicina afecta la expresión de genes involucrados en la formación de *biofilm*, y proponen que esta diferenciación podría iniciarse al activar la cinasa C. De la misma

manera, el exopolímero ácido poliglutámico producido por cepas de *Bacillus* ha sido considerado importante para la capacidad de desarrollar *biofilm* y colonizar, especialmente en aquellas cepas utilizadas para biocontrol de hongos fitopatógenos, (Liu *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2016; Stanley & Lazazzera, 2005).

Esta relación entre los lipopéptidos (bacilomicina y surfactina), ácido poliglutámico y la formación de *biofilm* nos indica que estas moléculas afectan la diferenciación celular hacia células productoras de matriz, cuya activación de genes hacia esa vía está controlada por el mismo regulador maestro que el de la esporulación, *spo0A* (Fujita *et al.*, 2005). Esto sumado a que los cultivos que mayor producción de lipopéptidos registraron mayor velocidad de esporulación, indicaría un efecto de la producción de lipopéptidos sobre la esporulación, lo cual se ve reflejado además en los niveles de expresión de *spoIIAA* aún cuando no hubo limitación nutricional.

Tradicionalmente, se asume que es la limitación nutricional el factor que desencadena la esporulación en las cepas de *Bacillus*. Cristiano (2012) observó en sus cultivos una fase de esporulación temprana. A partir de esta observación en el grupo surgió la interrogante sobre si realmente la densidad celular tiene un efecto sobre la esporulación tal que provoque su desencadenamiento aún bajo condiciones de no-limitación nutricional. En este trabajo se realizaron experimentos a diferentes densidades celulares y en ningún caso se observó esporas antes de haberse agotado la glucosa. Esta diferencia con respecto al trabajo de Cristiano (2012) pudo deberse a que en estos experimentos las células fueron lavadas. Es decir, se eliminaron las moléculas secretadas y se inocularon sólo células. Por el contrario, en los cultivos realizados en este trabajo a pesar de alcanzar altas densidades celulares no se observaron esporas antes de agotarse la glucosa. Todos los cultivos alcanzaron alta densidad celular de distinta forma, acumulando y produciendo en diferentes niveles, moléculas de *quorum sensing*, moléculas de reserva y células lisadas. Esta diferencia entre los procesos previos a la limitación nutricional tuvieron un efecto en la velocidad de esporulación en donde el cultivo que mayor compuestos produjo fue el cultivo que menor tiempo tomó en alcanzar el máximo nivel de esporulación (X7L) (Figura 8.3). Se propone que si bien la limitación nutricional es el factor que desencadena la esporulación en *Bacillus amyloliquefaciens* 83, esta cepa produce moléculas de *quorum sensing*, como surfactina, bacilomicina D y fuente de energía (ácidos orgánicos, exopolímero, y restos

celulares producto de lisis) que le permiten diferenciarse en células especializadas o de resistencia (esporas) en un menor tiempo. Una vez que las células se encuentran frente estrés nutricional debe decidir qué destino tomar y esta decisión va a ser temporal y de acuerdo a las condiciones externas (Shultz, 2016) (Figura 9.3).

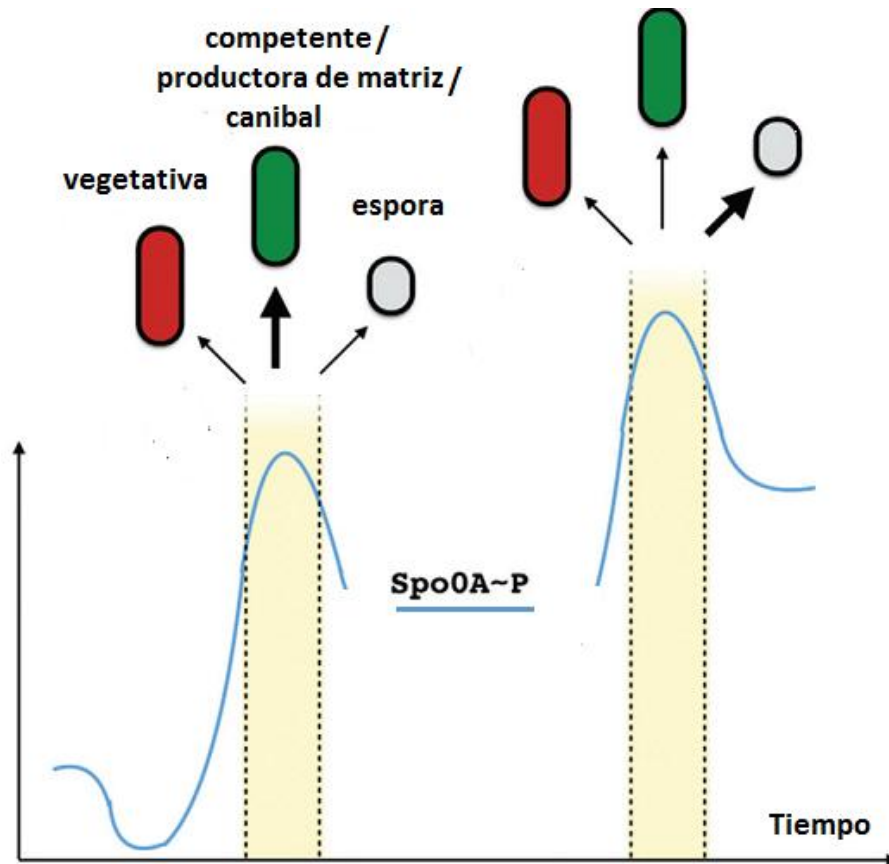


Figura. 9.3. Los eventos de decisión celular ocurren dependiendo de las condiciones a las que la célula se enfrenta, y esto a su vez varía con el tiempo. El nivel de spo0A-P es crucial para determinar si una célula se diferenciará y si lo hace, a una célula productora de matriz extracelular, caníbal o espora. Dentro de una población, existe heterogeneidad en la concentración de spo0A-P lo cual desencadena diferentes fenotipos. Figura modificada de Shultz (2016).

Por lo analizado en este trabajo, proponemos que no es la densidad celular por sí misma la que cumple un papel importante en la esporulación; sino la producción de moléculas de *quorum sensing* y lipopéptidos permitiendo que conforme estos se acumulen, inicie la diferenciación

celular; sin embargo, la producción de estas moléculas no se puede considerar como el factor más importante porque no es suficiente para que se evidencie la esporulación (proceso completo). Por otro lado, si bien el estrés nutricional determina el inicio de la población de esporas, las moléculas asociadas a la densidad celular y fuente de energía para desarrollar el proceso (ácidos orgánicos, exopolímero y restos celulares producto de lisis) son determinantes para la velocidad de esporulación.

## 10. CONCLUSIONES

- Los genes involucrados en el modelo de diferenciación celular, estudiado en *Bacillus subtilis* están conservados en *Bacillus amyloliquefaciens* 83 (70-90% de identidad) por lo que la red de diferenciación en *Bacillus subtilis* es un modelo adecuado para el estudio de la cepa de interés.
- *Bacillus amyloliquefaciens* 83 requiere de limitación nutricional para la diferenciación celular a esporas; sin embargo, las moléculas de *quórum sensing* permiten que se active el gen de la etapa II de la esporulación (*spoIIAA*). Además, la velocidad de esporulación depende de la acumulación de moléculas de *quórum sensing* y de reserva de energía.
- No hay correspondencia entre la síntesis de los lipopéptidos cuantificados (bacilomicina D y surfactina) y la expresión de los genes que codifican sus sintetetasas (*bmyD* y *srfAA*).

## 11. PERSPECTIVAS

- Estudiar el efecto de la adición exógena de los compuestos lipopéptidicos sobre la esporulación de *Bacillus amyloliquefaciens* 83 bajo condiciones de no limitación nutricional, con el objetivo de conocer si los lipopéptidos producidos por la cepa son suficientes para inducir la esporulación en *B. amyloliquefaciens* 83.
- Desarrollar estrategias de transformación y generación de una cepa mutante *B. amyloliquefaciens* 83  $\Delta kinA \Delta kinB$ , para evaluar la esporulación en una cepa disminuida en su capacidad de sensor limitación nutricional.
- Evaluar la producción del ácido- $\gamma$ -poliglutámico sintetizado por *Bacillus amyloliquefaciens* 83 y su influencia en la esporulación.



## 12. ANEXOS

### Ácidos orgánicos

#### Anexo1

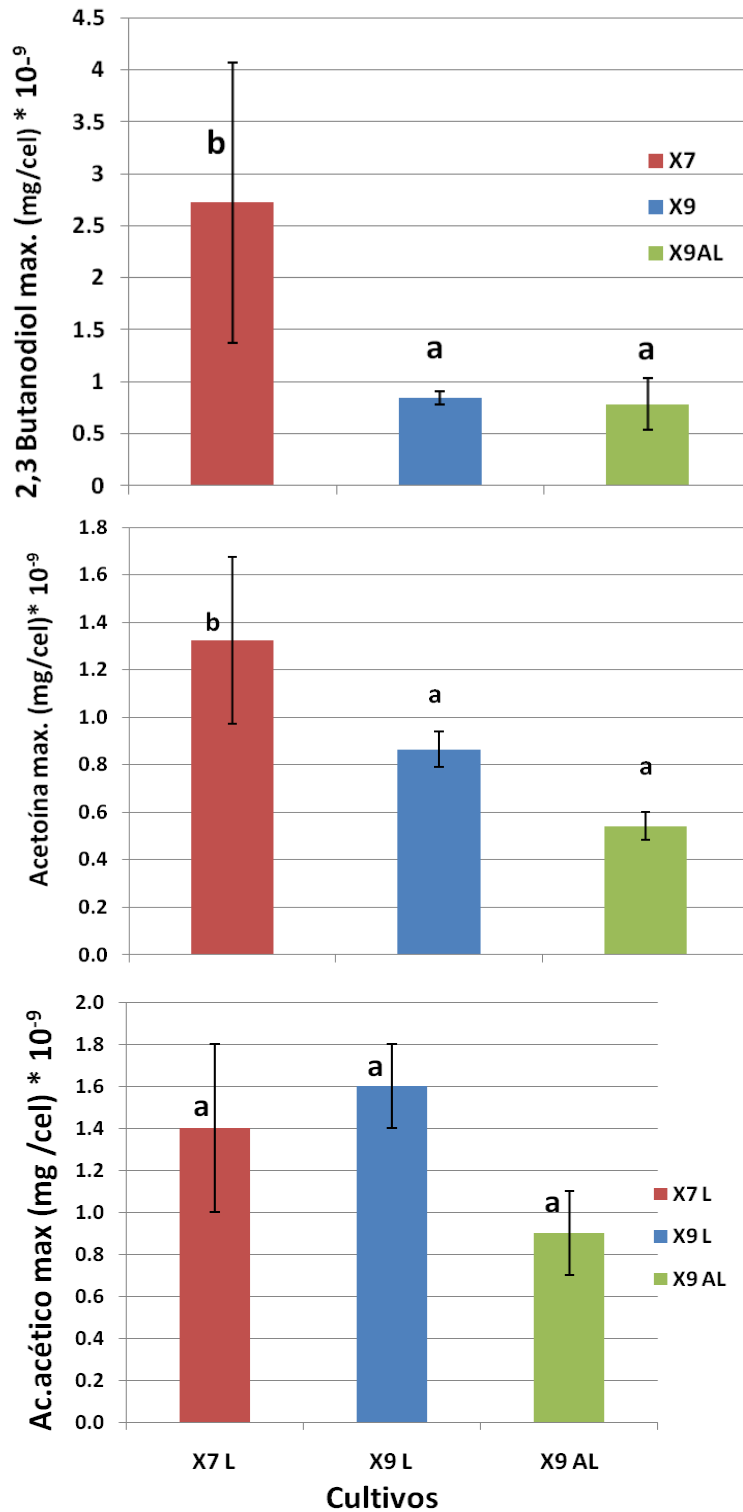


Figura A.1. Producción de ácidos orgánicos en los cultivos: X7L ( $X_0 = 9.6 \pm 0.3 \times 10^6$  cel/mL), Cultivo X9L ( $X_0 = 1.0 \pm 0.1 \times 10^9$  cel/mL) y cultivo X9AL ( $X_0 = 1.0 \pm 0.2 \times 10^9$  cel/mL). Se dividen los valores máximos alcanzados en cada cultivo entre la concentración celular correspondiente.

## Anexo 2

### Curvas estándar Surfactina

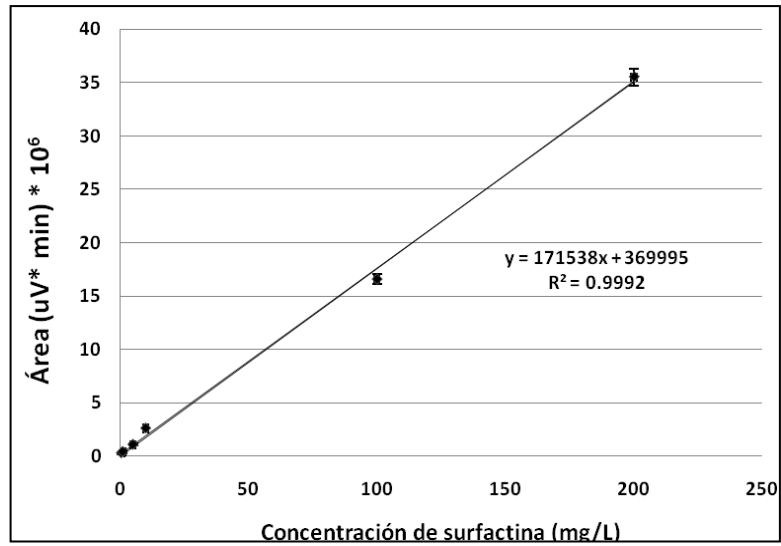


Figura A.2. Curva de calibración para la cuantificación de surfactina. Se prepararon estándares de acetoína: 0.5, 1, 5, 10, 100, 200 mg/L.

### Bacilomicina D

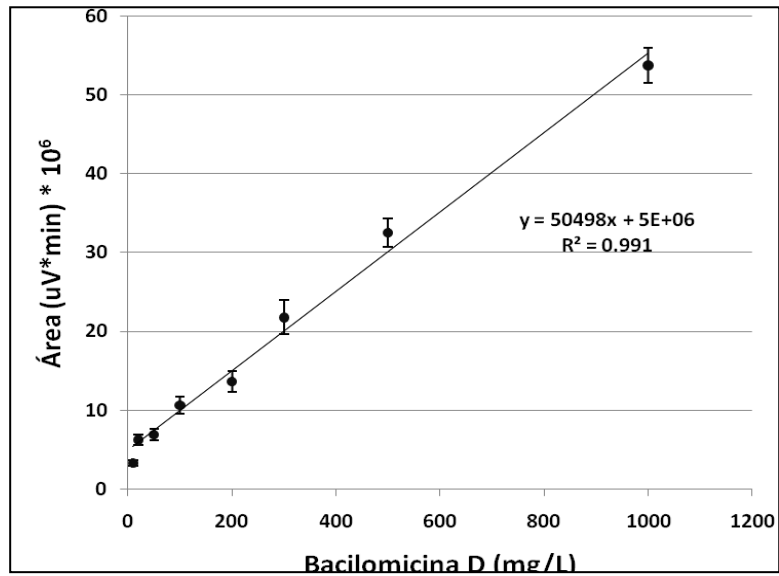
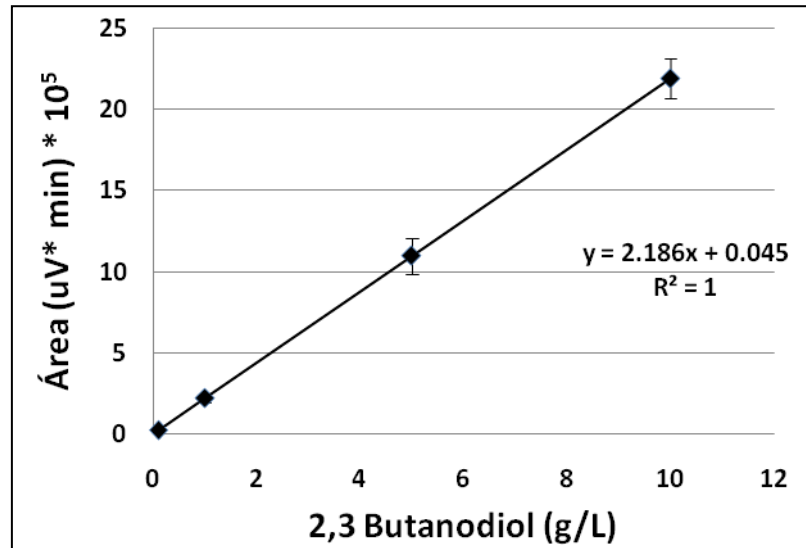


Figura A.3. Curva de calibración para la cuantificación de Bacilomicina D. Se utilizaron concentraciones conocidos de bacilomicina D: 0.5, 1, 5, 10, 100, 200 mg/L.

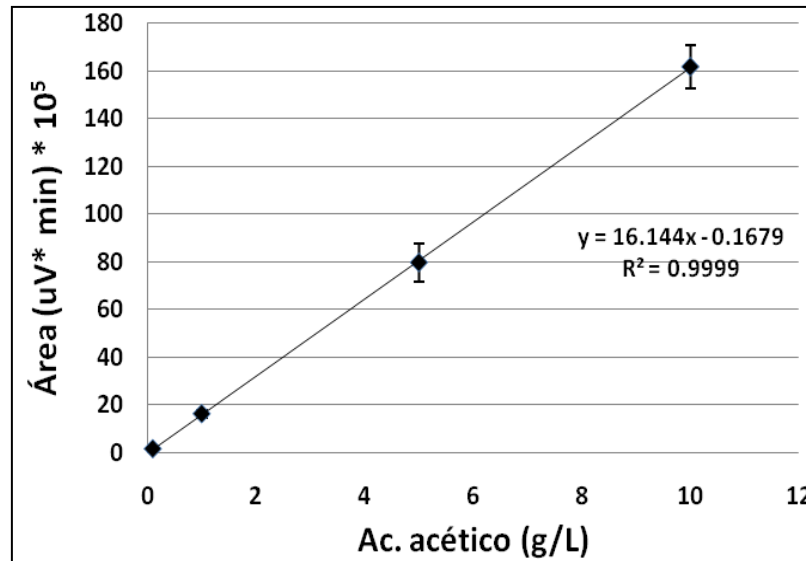
### Butanodiol

Figura A.4. Curva de calibración para la cuantificación de 2,3 butanodiol. Se prepararon estándares de acetoína: 0.1, 1, 5 y 10 g/L.



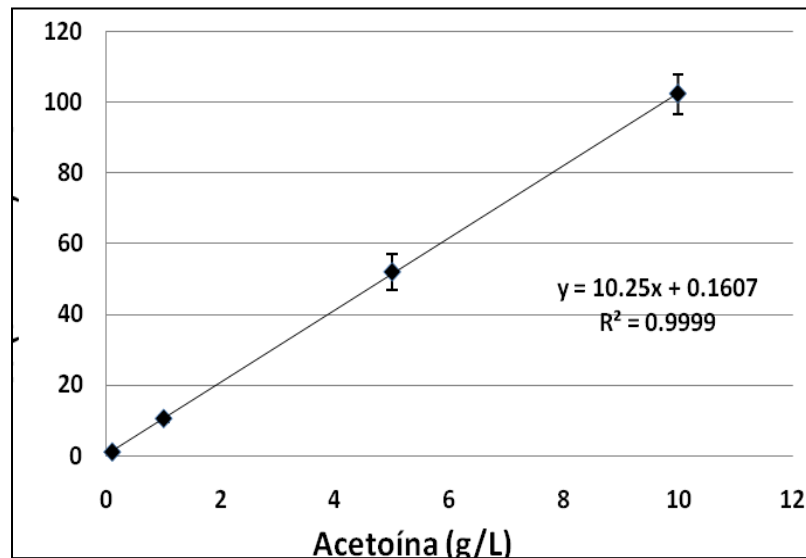
### Ácido acético

Figura A.5. Curva de calibración para la cuantificación de ácido acético. Se prepararon estándares de acetoína: 0.1, 1, 5 y 10 g/L.



### Acetoína

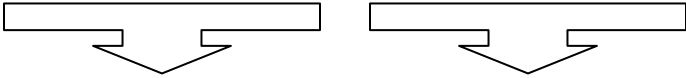
Figura A.6 Curva de calibración para la cuantificación de acetoína. Se prepararon estándares de acetoína: 0.1, 1, 5 y 10 g/L.



### Anexo 3

#### Cálculos del análisis transcripcional

En este trabajo se utilizó el método de doble delta para analizar la cuantificación relativa de la expresión génica utilizando PCR en tiempo real. El valor delta delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) muestra la diferencia entre  $\Delta Ct$  de la muestra en estudio y el  $\Delta Ct$  del calibrador (condición control):

$$\Delta\Delta Ct = (Cq \text{ objetivo} - Cq \text{ control interno}) - (Cq \text{ objetivo} - Cq \text{ condición control})$$


Cq muestra problema                      Cq muestra calibrador (condición control)

En la primera normalización (Cq muestra problema), se usó como control interno el valor de Cq del gen comX ya que mantuvo un nivel de expresión reproducible en todas las condiciones evaluadas.

En la segunda normalización, Cq condición control, se usaron los valores de Cq del gen objetivo correspondiente a la mitad de la fase exponencial del cultivo X7L ( $X_0 = 9.6 \pm 0.3 \times 10^6$  cel/mL).

Una vez realizada esta normalización de la expresión del gen y relativización a una condición control, la expresión está dada por:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Y se consideró como sobre expresado los niveles superiores a 2 y sub expresados los valores menores a 0.5.

### 13. REFERENCIAS

- Aguilar, C., Vlamakis, H., Guzman, A., Losick, R., and Kolter, R. (2010). Kin D is a checkpoint protein linking spore formation to extracellular-matrix production in *Bacillus subtilis* biofilms. *mBio* 1 (1), e00035-10.
- Aragón, W. (2012). Desarrollo de un marcador molecular específico para el agente de control biológico *Bacillus sp.*83. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología. UNAM, Cuernavaca, Morelos.
- Bacon-Schneider, K., Palmer, T., and Grossman, A. (2002). Characterization of *comQ* and *comX*, two genes required for the production of ComX pheromone in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 184 (2), 410-419.
- Cabrera-Valladares, N., Martínez, L.M., Flores, N., Hernández-Chávez, G., Martínez, A., Bolívar, F., and Gosset, G. (2012). Physiologic consequences of glucose transport and phosphoenolpyruvate node modifications in *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 22 (3), 177-197.
- Clarkson, J.; Campbell, L., and Yudkin, M. (2004). Efficient regulation of  $\sigma^F$ , the first sporulation-specific sigma factor in *B. subtilis*. *Journal of Molecular Biology* 342 (4), 1187-1195.
- Comella, N., and Grossman, A. D. (2005). Conservation of genes and processes controlled by the *quorum* response in bacteria: characterization of genes controlled by the *quorum-sensing* transcription factor ComA in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 57 (4), 1159–1174.
- Cristiano, S. (2012). Estrategias de cultivo en lote y lote alimentado para el crecimiento vegetativo y la producción de esporas de *Bacillus subtilis* 83. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología. UNAM, Cuernavaca, Morelos.
- Chen, Y., Cao, S., Chai, Y., Clardy, J., Kolter, R., Guo, J., and Losick, R. (2012). A *Bacillus subtilis* sensor kinase involved in triggering biofilm formation on the roots of tomato plants. *Molecular Microbiology* 85 (3), 418-430.
- De Vizio, Daniele (2011). Investigation of *quorum sensing* in *Bacillus licheniformis*. PhD thesis. School of sciences University of Westminster.
- Di Luccia, B., Riccio, A., Vanacore, A., Baccigalupi, L., Molinaro, A., and Ricca, E. (2015). Matrix production, pigment synthesis, and sporulation in a marine isolated strain of *Bacillus pumilus*. *Marine Drugs* 13 (10), 6472–6488.
- Errington J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology* 1 (2), 117-126.
- Eswaramoorthy, P; Duan, D; Dinh, J; Dravis, A, Devi S., and Fujita, M. (2010). The threshold level of sensor histidine kinase KinA governs entry into sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 192 (15),3870.
- Eswaramoorthy, P., Dravis, A., Devi, S. N., Vishnoi, M., Dao, H.-A., and Fujita, M. (2011). Expression level of a chimeric kinase governs entry into sporulation in *Bacillus subtilis* . *Journal of Bacteriology*, 193 (22), 6113–6122.
- Flores, N., Flores, S., Escalante, A., de Anda, R., Leal, L., Malpica, R., Georgellis, D., Gosset, G., and 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. *Metabolic Engineering* 7 (2), 70–78.

Fujita, M and Losick, R. (2005). Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Genes & Development* 19 (18), 2236-2244.

Fujita, M., González-Pastor, J.E., and Losick, R. (2005). High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 187 (4), 1357-1368b

Galindo, E., Carillo-Fasio, J.A., García, R., and Patiño-Vera, M. (2005). Tecnología para el control biológico de la principal enfermedad del mango (antracnosis) y el efecto en su calidad poscosecha. *Claridades Agropecuarias* 148, 50-59.

Gonzalez-Pastor, J.E. (2010). Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews* 35 (3), 415-424.

Grossman, A and Losick, R. (1988). Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85 (12), 4369–4373.

Idris, E; Iglesias, D; Talon, M., and Borriss, R. (2007). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20 (6), 619-26.

Jacques, P. (2011). Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. In: Soberón-Chavez, G (ed). Biosurfactants. *Springer*. pp: 57-91.

Kambourova, M., Tangney, M., and Pries, F. (2001). Regulation of polyglutamic acid synthesis by glutamate in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. *Applied and environmental microbiology* 67 (2), 1004-1007.

Koumoutsis, A., Chen, X.-H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., and 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., and Borriss, R. (2007). DegU and YczE positively regulate the synthesis of bacillomycin D by *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (21), 6953–6964.

Lazazzera, D. (2000). *Quorum sensing* and starvation: signals for entry into stationary phase. *Current Opinion in Microbiology* 3 (2), 177-182.

Liu, J., He, D., Li, X., Gao, S., Wu, H., Liu, W., Gao, X., and Zhou, T. (2010).  $\gamma$ -polyglutamic acid ( $\gamma$ -PGA) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* C06 promoting its colonization on fruit surface. *International Journal of Food Microbiology* 142 (1), 190–197.

Livak, K and Shmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using RealTime Quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>ΔΔCT method. *Methods* 25 (4), 402–408.

López, D., Vlamakis, H., and Kolter, R. (2009a). Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews* 33 (1), 152-163.

Lopez, D., Fischbach, M., Chu, F., Losick, R., and Kolter, R. (2009b). Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (1), 280-285.

Lopez, D and Kolter, R. (2010). Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews* 34 (2), 134-149.

Luo, C., Zhou, H; Zou, J., Wang, X., Zhang, R., Xiang., and Chen, Z. (2015). Bacillomycin L and surfactin contribute synergistically to the phenotypic features of *Bacillus subtilis* 916 and the biocontrol of rice sheath blight induced by *Rhizoctonia solani*. *Applied Microbiological Biotechnology* 99 (4), 1987-1910.

Luna, A. (2015). Evaluación del papel de los antibióticos lipopeptídicos producidos por *Bacillus* sp. 83 en la inhibición del crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* 09. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología. UNAM, Cuernavaca, Morelos.

Meissner, L., Kauffmann, K., Wengeler, T. Mitsunaga H, Fukusaki E., and 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 of Industrial Microbiology and Biotechnology* 42(9), 1203-15.

Metzner, A. B. and Otto, R. E. (1957), Agitation of non-Newtonian fluids. *AIChE Journal* 3 (1), 3–10.

Molle, V., Fujita, M., Jensen, S., Jense, S., Eichenberger, P., González-Pastor, J., Liu, J., and Losick, R. (2003). The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* 50 (5), 1683-1701.

Magnuson, J., Solomon, A., and Grossman, D. (1994). Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *Bacillus subtilis*. *Cell* 77 (2), 207-216.

Morales, D. (2007). Desarrollo de un proceso de alta densidad celular para la producción de *Bacillus subtilis* 83 con alta viabilidad. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología. UNAM, Cuernavaca, Morelos.

Nakano, M. M., Magnuson, R., Myers, A., Curry, J., Grossman, A. D., and Zuber, P. (1991). *srfA* is an operon required for surfactin production, competence development, and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 173(5), 1770–1778.

Piggot, P.J., and Hilbert, D.W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current in Microbiology* 7 (6), 579-586.

Pottathil, M., Jung, A., and Lazazzera, B. A. (2008). CSF, a species-specific extracellular signaling peptide for communication among strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus mojavensis*. *Journal of Bacteriology*, 190 (11), 4095–4099.

Quintero, R. (1981). Ingeniería Bioquímica: teoría y aplicaciones. Alhambra Mexicana, México D.F.

Quisel, J., Burkholder, William and Grossman, A. (2001). In vivo effect of sporulation kinase on mutant Spo0A proteins in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 183 (22), 6573-6578.

Raaijmakers, J., De Bruijn, I., and Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews* 34 (6), 1037-1062.

Rodríguez, L. (2005). Producción y formulación de esporas de *Bacillus subtilis* CPA como agente de control biológico. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología. UNAM, Cuernavaca, Morelos.

Rubinstein, S.M., Kolodkin-Gal, I., McLoon, A., Chai, L., Kolter, R., Losick, R., and Weitz, D.A. (2012). Osmotic pressure can regulate matrix gene expression in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 86 (2), 426-436.

Rutherford, S. T., and Bassler, B. L. (2012). Bacterial *Quorum Sensing*: Its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(11), a012427.

Shank, A.E and Kolter, R. (2011). Extracellular signaling and multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology* 14(6), 741–747.

Shemesh, M., and Chai, Y. (2013). A combination of glycerol and manganese promotes biofilm formation in *Bacillus subtilis* via histidine kinase KinD signaling. *Journal of Bacteriology* 195(12), 2747–2754.

Schultz, D. (2016). Coordination of cell decisions and promotion of phenotypic diversity in *B. subtilis* via pulsed behavior of the phosphorelay. *BioEssays* 38 (5), 440–445.

Solis, Y. (2010). Identificación parcial de antibióticos ciclo-lipopeptídicos termorresistentes producidos por *Bacillus subtilis* 83 con actividad antifúngica contra *Fusarium* spp. . Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos.

Solomon, J., Lazzazera, B., and Grossman, A. (1996). Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes & Development* 10 (16), 2014-2024.

Stanley, N. R. and Lazazzera, B. A. (2005). Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly- $\gamma$ -dl-glutamic acid production and biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 57 (4), 1143–1158.

Stephenson, K and Hoch, J.A. (2002). Evolution of signaling in the sporulation phosphorelay. *Molecular Microbiology* 46 (2), 297-304.

Tobisch, S., Zühlke, D., Bernhardt, J., Stülke, J., and Hecker, M. (1999). Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 181 (22), 6996–7004.

Tojo, S., Hirooka, K., and 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 (8), 1656–1665.

Tortosa, P., Logsdon, L., Kraigher, B., Itoh, Y., Mandic-Mulec, I., and Dubnau, D. (2001). Specificity and genetic polymorphism of the *Bacillus* competence *quorum-sensing* system. *Journal of Bacteriology* 183(2), 451–460.

Verplaetse, E., Slamti, L., Gohar, M., and Lereclus, D. (2016). Two distinct pathways lead *Bacillus thuringiensis* to commit to sporulation in biofilm. *Research in Microbiology* S0923-2508(16)30003-1.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), research0034.1–research0034.11.



Winnen B; Anderson, B; Cole, J; King, G., and Rowland, S. (2013). Role of the PAS sensor domains in the *Bacillus subtilis* sporulation kinase KinA. *Journal of Bacteriology* 195 (10), 2349-2358.

Xu, Z., Shao, J., Li, B., Yan, X., Qirong, S., and Zhang, R. (2013). Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* 79 (3), 808-815.

Zhu, F., Cai, J., Wu, X., Huang, J., Huang, L., Zhu, J., Zheng, Q, Cen, P., and Xu, Z. (2013). The main byproducts and metabolic flux profiling of Y-PGA producing producing strain *B. subtilis* ZJU-7 under different pH values. *Journal of Biotechnology* 164 (1), 67-74.

Zhou, H., Luo, C., Fang, X., Xian, Y., Wang, X., Zhang, R., and Chen, Z. (2016). Loss of GltB inhibits biofilm formation and biocontrol efficiency of *Bacillus subtilis* Bs916 by altering the production of  $\gamma$ -Polyglutamate and three lipopeptides. *PLoS ONE* 11 (5), e0156247.

Zerriouh, H., de Vicente, A., Pérez-García, A., and Romero, D. (2014). Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environmental Microbiology* 16 (7), 2196–2211.