



ESTUDIO DE AGREGACIÓN CELULAR Y LA ESPORULACIÓN DE *Bacillus* SP. 83, EN FUNCIÓN DE LA HIDRODINÁMICA DEL CULTIVO Y DE LA SUPLEMENTACIÓN CON AGENTES DISGREGANTES

Sergio Andrés Cristiano-Fajardo, Erick Flores-Olvera, Leobardo Serrano-Carreón y Enrique Galindo. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología. Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología. Cuernavaca, Morelos. Apdo. Postal 510-3, C.P.62210. sacristi@ibt.unam.mx
Palabras clave: *Bacillus*, esporulación, agregación celular.

Introducción. La producción de esporas de *Bacillus* sp. 83 es de gran importancia para el desarrollo y formulación de agentes de control biológico. En cultivos en lote y lote alimentado de *Bacillus* sp. 83, se ha observado la aparición de agregados celulares (*biofilms* en suspensión) de los cuales se cree que puedan activar el proceso de esporulación, a causa de limitaciones nutricionales locales dentro de estas estructuras. Se ha reportado que la suplementación del medio de cultivo con aceite de orégano (AO) y norespermidina (NE) a dosis no letales disminuye la formación de *biofilm* en *B. subtilis*. [1]. Sin embargo, es de interés conocer si su efecto es extrapolable a agregados celulares. El objetivo de este trabajo fue evaluar la formación de agregados celulares en función de la suplementación con agentes disgregantes y bajo diferentes condiciones de mezclado.

Metodología. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Bacillus* sp. 83 para AO y NE. Posteriormente se cuantificó la capacidad de formar *biofilms* en cultivos estáticos suplementados con dosis menores a la CMI (tinción con cristal violeta (CV)). La bacteria se cultivó en medio mineral suplementado con AO y NE en matraces convencionales y, para la evaluación del efecto hidrodinámico, se realizaron cultivos de la bacteria en matraces bafleados a una misma potencia ($P/V=0.5 \text{ KW/m}^3$) [2]. En cada ensayo se analizó el final de la fase exponencial (12 h) y la etapa de esporulación (24 y 32 h). Se determinó la concentración celular (Cámara de Neubauer), porcentaje de esporulación (tinción de Sheaffer-Fulton) y la agregación celular (análisis de imágenes).

Resultados. En la Figura 1 se presentan cultivos estáticos de *Bacillus* sp. 83 donde se observó una disminución en la síntesis de *biofilms* al suplementarse con NE a 1 y 2 mM y AO a 0.125 y 0.2 g/l. En matraces agitados, el crecimiento celular no se ve afectado (datos no mostrados). Sin embargo, al evaluar la formación de agregados celulares no se observó un efecto significativo de la suplementación en la agregación celular ni en la esporulación (Figura 2). No obstante, en los cultivos en matraces bafleados se presentó un incremento significativo en la fracción del número de células presentes en agregados de tamaños grandes (40-100 μm), respecto al total de la suspensión, tanto a las 12h como a las 32 h. También existe un efecto negativo en porcentaje de esporulación de la bacteria, el cual es tan solo 27% a las 32 h frente a un 72% del cultivo control. Se cree que un mayor nivel de mezclado y de oxigenación

promueve la formación de espuma en el matraz bafleado, lo que genera la migración de moléculas de señalización, a la interface aire líquido [3], disminuyendo por consiguiente la eficiencia de esporulación. Por otro lado, un gran tamaño de agregado somete a la bacteria a una alta limitación de oxígeno, la cual se conoce que afecta negativamente a la esporulación [4].

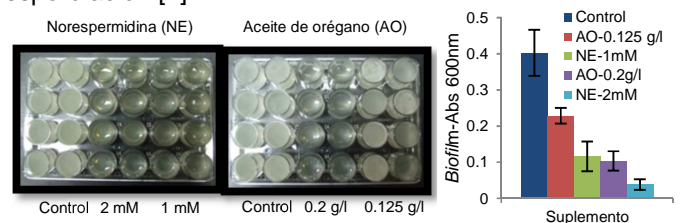


Fig 1. Inhibición de la formación de *biofilms* en *Bacillus* sp. 83. Fotografías de *biofilms* en cultivos estáticos suplementados con NE y AO (izq). Cuantificación de *biofilm* por medio de tinción con CV (der).

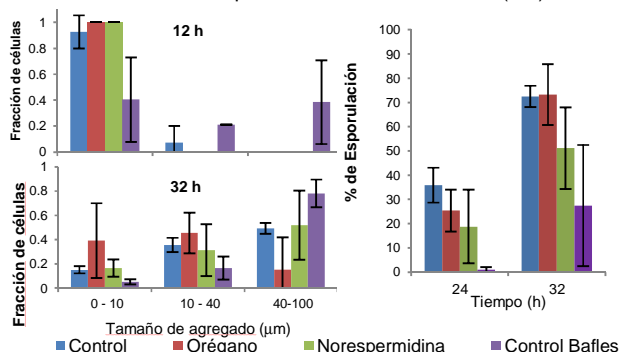


Fig 2. Fracción de células totales en función del tamaño de agregado. Final de la fase exponencial 12 h (arriba izq.) y final de la etapa de esporulación 32 h (abajo izq.) Porcentaje de esporulación del cultivo a las 24 h y 32 h (der).

Conclusiones. La suplementación del medio mineral con AO y NE permite modificar la formación de *biofilm*, mas no tiene un efecto en la disminución de agregados celulares. La hidrodinámica del cultivo es el principal factor que afecta positivamente la agregación celular y negativamente la esporulación.

Agradecimiento. Se agradece el soporte económico por parte de CONACyT y la beca de doctorado (290733).

Bibliografía. 1. Kolodkin-Gal, I., Cao, S., Chai, L., Böttcher, T., Kolter, R., Clardy, J., Losick, R. (2012). *Cell*. 149: 684-692.
2. Peter, C., Suzuki, Y., Rachinskiy, K., Lotter, S., Büchs, J. (2006). *Chem. Eng. Sci.* 61:3771-3779.
3. Davies, D.A., Lynch, H.C., Varley, J. (2001). *Enzyme Microb. Technol.* 28:346-365.
4. Monteiro, S., Clemente, J. J., Henriques, A. O., Gomes, R. J., Carrondo, M., Cunha, A. E. (2005). *Biotechnol. Prog.* 21:1026-1031.