

RUMBO A LA COMPRENSIÓN Y MANIPULACIÓN DE LA ESPORULACIÓN EN *Bacillus velezensis*

Luna-Bulbarela Agustín<sup>1\*</sup>, Arizmendi Sánchez Montserrat Alejandra<sup>2</sup>, Ilka B. Bischofs<sup>3</sup>, Enrique Galindo<sup>1,4</sup> y Leobardo Serrano Carreón<sup>1,4</sup>

1. Depto. Ingeniería celular y biocatálisis, Instituto de Biotecnología /UNAM. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, 62210, Cuernavaca. Morelos. 2. Instituto Tecnológico de Zacatepec TecNM. Calzada Tecnológico 27, 62780, Zacatepec de Hidalgo, Morelos. 3. Max-Planck-Institute for Terrestrial Microbiology, 35043. Marburg. 4. Agro&Biotecnia S. de R.L. de C.V., Limones 8, Amate Redondo, 62334, Cuernavaca, Morelos.

\*agustin.luna@ibt.unam.mx

Palabras clave: *Bacillus*, heterogeneidad fenotípica, fosfatasa RapA

**Introducción.** Las poblaciones de *Bacillus* se caracterizan por desarrollar múltiples subpoblaciones isogénicas, las cuales tienen fenotipos distintos y roles específicos. Entre ellas, se encuentran: células vegetativas (motiles, mineras, competentes, caníbales y productoras de matriz) y esporas. Estas últimas, se generan a través de un proceso de morfogénesis desencadenado por estrés nutricional y es activado a través de una compleja ruta de fosforilación<sup>1</sup>. Para fines biotecnológicos, lo anterior es relevante porque la heterogeneidad intrínseca de las poblaciones en *Bacillus* es una de las mayores limitantes para la producción de agentes de control biológico basados en esporas de este microorganismo. Poco se conoce poco de los factores que determinan la dinámica y eficiencia del proceso, así como la calidad de las esporas generadas. Se sabe que la concentración intracelular la fosfatasa RapA y la capacidad germinativa de las esporas son inversamente proporcionales<sup>2</sup>. RapA actúa como un regulador negativo que impide el proceso, por lo que esta proteína podría funcionar como un marcador molecular que permita comprender la esporulación para posteriormente manipularla.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la relación que existe entre la concentración de RapA en las diferentes subpoblaciones de *Bacillus* y el proceso de esporulación.

**Metodología.** Se utilizó citometría de flujo para monitorizar indirectamente la distribución de RapA dentro de distintas subpoblaciones de *Bacillus* durante condiciones de suficiencia y agotamiento de glucosa. Se utilizó la cepa reportera *B. velezensis* FBZ42PRapA\_mCherry<sup>2,3</sup>, la cual expresa una proteína roja fluorescente bajo el promotor de RapA.

**Resultados.** La población de *B. velezensis* presentó una inter e intra-heterogeneidad en el contenido de RapA puesto que su concentración dependiente de la subpoblación. La evidencia reveló que existe una marcada diferencia en el contenido promedio de RapA antes y después del agotamiento de la glucosa (Fig. 1). Bajo condiciones de suficiencia de glucosa, la proteína RapA se mantiene en un nivel basal en las células vegetativas mientras que durante la etapa de limitación nutricional (donde ocurre la esporulación) esta se

acumula y distribuye heterogéneamente dentro de las subpoblaciones. Durante la esporulación, existe una correspondencia entre el incremento en la frecuencia de esporulación y el contenido de RapA de las células vegetativas remanentes. Nuestros resultados demuestran que las células vegetativas remanentes utilizan la acetoina y butanodiol probablemente para evitar esporular y así mantener una población heterogénea con múltiples roles. En el caso de las esporas, estas presentaron un nivel de fluorescencia incluso menor a las células vegetativas presentes durante el crecimiento exponencial. Lo anterior hace preguntarnos, ¿cuál es el umbral mínimo de RapA que predispondrá a una célula vegetativa a convertirse en espora? Y más importante, ¿este podría ser manipulado? Interesantemente, las pre-esporas presentaron un contenido intermedio de RapA entre las células vegetativas (bajo limitación nutricional) y las esporas, lo cual sugiere que la proteína se segrega de forma desigual entre la célula madre y la espora.

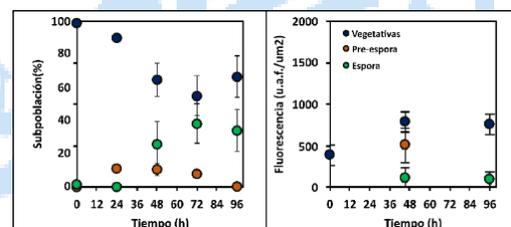


Fig. 1. Subpoblaciones en *B. velezensis* (izquierda) y su contenido de RapA (derecha) en el tiempo. La limitación de glucosa ocurrió entre las 24 y 27 h.

**Conclusiones.** La manipulación *ad hoc* de la concentración de RapA, puede resultar una estrategia interesante para aumentar la sincronización de las células vegetativas de cultivos industriales de *Bacillus* y por ende la rentabilidad de procesos para la producción de esporas.

**Agradecimiento** a PAPIIT-UNAM por el financiamiento al proyecto IG201021.

**Bibliografía.**

- Lopez D, Vlamakis H and Kolter R. (2009). FEMS Microbiol Rev. 33: 152–163.
- Mutlu A, Trauth S, Ziesack M, Nagler K, Bergeest J-P, Rohr K, Becker N, Höfer T and Bischofs I.B. (2018). Nat Commun. 9:69.
- Arizmendi Sánchez M.A. (2023). Tesis de licenciatura. TecNM. Zacatepec, Mor. 2023. En proceso de obtención de grado.