

EL PAPEL DE LOS METABOLITOS PRODUCIDOS ANTES DE LA LIMITACIÓN NUTRICIONAL EN LA ESPORULACIÓN DE *Bacillus velezensis* 83

Esmeralda Y. Soriano Peña, Enrique Galindo Fentanes, Leobardo Serrano Carreón
Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología. Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología. Cuernavaca, Morelos, 62210. esmepena@ibt.unam.mx

Palabras clave: esporulación, metabolitos de sobreflujo de carbono, quorum sensing, lipopéptidos

Introducción. Las esporas de *Bacillus velezensis* 83 (Bv83) son el ingrediente activo del agente de control biológico Fungifree AB (1). La esporulación es una respuesta a la limitación nutricional que depende de la densidad celular y se han caracterizado varias moléculas en el sobrenadante de cultivo que impactan en la esporulación (2). Además, en trabajos previos encontramos que las condiciones iniciales de cultivo llevan a diferentes eficiencias y velocidades de esporulación, esto podría deberse a la producción diferencial de moléculas previa a la limitación nutricional.

El propósito de este trabajo fue estudiar el efecto individual y las interacciones entre: metabolitos de sobreflujo de carbono (MSC, acetoina y butanodiol), lipopéptidos (L, surfactina y bacilomicina) y el péptido CSF (Factor de Competencia y Esporulación, por sus siglas en inglés), sobre la esporulación de Bv83.

Metodología. Se llevó a cabo un diseño experimental 2³ de adición exógena, cuyos factores fueron los grupos de moléculas: MSC, CSF y L; y los niveles: presencia (en la concentración encontrada al momento del agotamiento de glucosa en cultivo lote, Fig. 1) y ausencia. Para ello se resuspendieron 5×10^9 c/mL células vegetativas lavadas (12 h en YPG) en 25 mL de medio mineral sin glucosa y suplementado las moléculas de interés. Se cuantificó la concentración celular (cámara de Neubauer) y las esporas (tinción con verde de malaquita). Se usaron MSC grado reactivo (Sigma), CSF sintetizado químicamente (Genscript) y L purificados de caldos agotados de Bv83. Se evaluó la esporulación como eficiencia ($E_{sp} = \frac{[Spo]_{max}}{[Cel]_{max}}$) y tiempo de esporulación ($t_{esp} = t_{final} - t_{1a\ esp}$), esta última como una medida de sincronización de la esporulación. Los valores se reportan como relativos a los obtenidos en un cultivo lote (41%, 8 h). Se evaluaron las diferencias con el programa Design-Expert V.8, mediante un análisis de ANOVA ($p=0.05$).

Resultados. El único factor que tiene una influencia significativa sobre la sincronización de la esporulación son los MSC (datos no mostrados). Tanto la acetoina y el butanodiol pueden ser usados como fuente de carbono que sustente el crecimiento celular por algunas cepas de *Bacillus*, esto retrasaría la respuesta a limitación nutricional en parte de la población resultando en una esporulación desincronizada (8 veces t_{esp} control). Por otro lado, los MSC proveen parte de la energía necesaria para la esporulación lo que permite el aumento de la E_{sp} , incluso por encima de lo alcanzado en un cultivo lote (Fig. 1A). Por su parte, los L tienen un efecto negativo sobre la E_{sp} , lo cual no concuerda con lo que se ha reportado sobre las vías de señalización en las que podrían estar involucrados (Fig. 1B). Una de las condiciones más interesantes es aquella en la que solo se suplementó con CSF, ya que se observa una restauración de E_{sp} , pero sin la presencia de otras fuentes de energía, lo que sugiere que hay un uso más eficiente de energía disponible (Fig.

1A). El gen precursor del péptido tiene dos promotores, uno que responde a la densidad celular y otro a la limitación nutricional, por lo que esta señal integra las expuestas a los dos factores involucrados en la esporulación, lo que podría evitar estadios intermedios como el canibalismo y el biofilm. A pesar de ello, sus interacciones con el resto de los metabolitos son mucho más complejas.

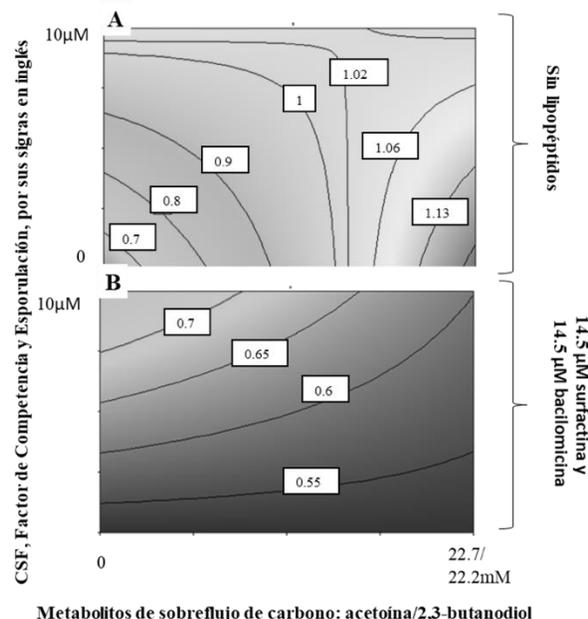


Fig. 1. Efecto de los MSC y de CSF la eficiencia de esporulación en ausencia (A) y presencia (B) de L.

Estos datos son de gran importancia ya que por un lado se busca obtener mayores títulos de esporas. Sin embargo, es importante evaluar su efecto en la calidad de estas, la cual parece relacionarse con la sincronización de la esporulación (3).

Conclusiones.

Los MSC y los L producidos previo a la limitación nutricional afectan negativamente la sincronización (t_{esp}) y la E_{sp} , respectivamente. Por su parte el efecto de CSF depende de la presencia o ausencia de los L. Estos metabolitos juegan un papel importante en el balance de concentración/calidad de las esporas producidas durante la limitación nutricional.

Agradecimientos. Proyecto CONACyT 240445.

Bibliografía.

- Galindo E *et al.* (2013). *Electron. J. Biotechnol* 16(6).
- López, D., Kolter, R. (2010). *FEMS Microbiol. Rev.* 34: 134-149.
- Mutlu *et al.* (2018). *Nat. Commun.* 9:69.

