XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería
León, Guanajuato 23 al 28 de junio 2019
Resumen de Trabajos Libres

# EXPRESIÓN DE GENES de diferenciación de *Bacillus thuringiensis* EN CULTIVOS DE SUPERFICIE.

Daniel Pérez-Solís[1], Francisco Figueroa-Martínez [2], Ernesto Favela-Torres[2], Jorge Rocha-Estrada[3], Itzamná Baqueiro-Peña[4], Mayra de la Torre-Martìnez[4], Gustavo Viniegra-González[2], [1]Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Ciudad de México, 09340. [2]CIDEA-CONACYT, San Agustin Tlaxiaca, Hidalgo, 42162 [3]CIAD, Hermosillo, Sonora, 83304 vini@xanum.uam.mx.

*Palabras clave: Diferenciación en bacterias, cultivo superficial, heterogeneidad génica.*

**Introducción.** La diferenciación celular de *Bacillus* está controlada por un conjunto de genes reguladores que conllevan cambios en su expresión genética[1]. En *Bt*, la regulación de genes de diferenciación es poco conocida pero su entendimiento podría ser clave para optimizar los rendimientos de esporas y toxinas Cry. El uso de cultivos superficiales, es una alternativa para evaluar la diferenciación de *Bt,* por su fácil manejo en el laboratorio y sus posibles aplicaciones biotecnológicas. El objetivo de este trabajo es evaluar la expresión de genes de esporulación, biofilms, virulencia y necrotrofismo, a través de cepas reporteras con fusiones transcripcionales, determinar las subpoblaciones que entran en los diferentes procesos de diferenciación.

**Metodología**. Las regiones promotoras de genes de esporualcion (*spoIIA*, *sspB*), virulecia (*cry1ac*), biofilms (*sipW*, *sinI*) y necrotrofismo (*nprA*) se eligieron del genoma de *Bt* HD73 por medio del programa Artemis. Se diseñaron cebadores específicos para cada región promotora. La secuencia codificante de *gfp* fue amplificada del vector pMutin-*gfp.* Cada región promotora seleccionada fue ligada con el gen gfp, usando el método de Gibson[2]. Posteriormente estas construcciones fueron ligadas al vector pHT315.y cada una transformada en en *E. coli* TOP 10, y posteriormente a BtHD73. Como resultado, se obtienen cepas de *Bt* HD73 reporteras, para la expresión de cada uno de los genes seleccionados, así como 2 cepas control, un control positivo (fusión constitutiva (Pspac'gfp) y negativo (vector vacio). Con estas cepas se llevaron a cabo fermentaciones en cultivo superficial en tubos para centrífuga con medio *clean*[3] solidificado con agar, con 10 g/L de glucosa y una relación C/N= 5.1 Se evaluó el crecimiento y esporulación de *Bt* por medio de UFC totales y termorresistentes. La expresión relativa de los promotores con el gen reportero *gfp* de cada cepa fue evaluada por medio de un citómetro de flujo[4].

**Resultados**. Todas las cepas reporteras de *Bt* presentaron el mismo patrón de crecimiento que se describe en la Fig. 1. Se observó un punto máximo de crecimiento vegetativo y aparición de esporas a las 24 h. Se observo menos del 30 % de esporas libres en el máximo punto de esporulación (120 h). Con respecto a nuestros controles, la construcción pHT315 no presento fluorescencia, ya que el vector, no tiene clonado ninguna construcción, mientras que la expresión de la construcción $P_{spac}$'gfp, se mantuvo constante durante toda la cinética. La expresión de la construcción $P_{spoIIA}$'gfp, se empieza apropiadamente a la h 16, un par de horas antes que se observen la aparición de esporas, además se observa que su expresión se origina de manera ascendente, del mismo modo que las esporas (Tabla). La construcción $P_{nprA}$'gfp, se expresa en un alto porcentaje de células en cultivo superficial. La construcción $P_{sipw}$'gfp, se expresa en una subpoblación grande durante toda la fermentación y esto se atribuye a que el cultivo superficial propicia la formación de biopelículas sobre sustratos sólidos[4].

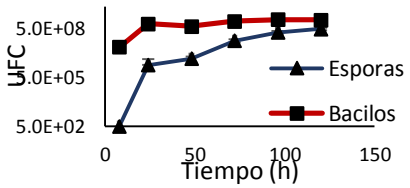


**Fig. 1.** Cinética de *Bt* en cultivo superficial (Bacilos y esporas). Los datos corresponden a la construcción $P_{spoIIA}$`gfp

**Tabla 1**. Porcentaje de células fluorescentes que expresan *gfp*, durante la cinética en cultivo superficial

| Tiempo (h) | spoIIA % | Pspac % | nprA % | Sipw % |
|---|---|---|---|---|
| 8 | 2.5± 1.5 | 37.2±20.2 | 0.9±0.4 | 7.0±10.4 |
| 16 | 27.5±8.2 | 96.7±2.7 | 76.9±10.1 | 66.4±7.4 |
| 24 | 32.7±14.3 | 97.0±1.1 | 56.1±3.0 | 60.4±3.8 |
| 36 | 44.2±9.5 | 89.8±2.5 | 30.1±3.9 | 73.9±3.2 |
| 48 | 15.6±3.8 | 85.1±4.6 | 26.2±3.5 | 77.3±3.7 |
| 72 | 58.3±5.5 | 89.1±3.0 | 75.0±2.7 | 78.0±2.0 |
| 96 | 60.4±12 | 82.3±2.9 | 73.4±1.8 | 69.5±4.0 |
| 120 | 65±13.2 | 90.1±1.4 | 58.2±16.3 | 79.8±0.2 |

**Conclusión.** El soporte estructural del cultivo superficial propicia que los genes relacionados a la formación de biopelículas se expresen en una subpoblación grande, y probablemente la formación de biopelículas simultáneamente genera heterogeneidad genética, lo que origina que un mismo cultivo coexistan células formadoras de esporas, y necrotróficas.

## Referencias

**1.**Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R., y Kolter, R. (2008). *Genes Dev. 22*(7), 945–953.

**2**.Gibson G., Young L., Chuang Y., Venter C., Hutchison A., y Smith O. (2009). *Nat. Methods,* 6, 343-345.

**3.** Dinoròn, J., Delgado, J., Corona, L. Montes, M., de la Torre, M., y Lòpez , E. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99(13), 5439-5450.

4.Verplaetse, E., Slamti, L., Gohar, M., y Lereclus, D. (2015). *mBio*, *6*(3), 1–10**.**