

## Índice de contenido

|  |    |
|--|----|
| Introducción.....  | 1  |
| La esporulación bacteriana como un proceso básico con proyección industrial..... | 8  |
| El proceso de esporulación en <i>Bacillus subtilis</i> .....                     | 9  |
| La germinación.....  | 18 |
| La movilidad.....  | 21 |
| Regulación de la matriz extracelular y formación de biofilms.....                | 25 |
| Multicelularidad.....  | 28 |
| Objetivos.....   | 33 |
| Materiales y Métodos.....  | 34 |
| 3.1. Cepas utilizadas para este trabajo.....                                     | 34 |
| 3.2. Medios de cultivo y soluciones.....   | 38 |
| 3.2.1. Medio de Luria-Bertani (LB).....  | 38 |
| 3.2.2. Medio Luria-Bertani con extracto de levadura (LBY).....                   | 38 |
| 3.2.3. Medio de esporulación (SM).....   | 38 |
| 3.2.4. Medio de crecimiento de cepas fúngicas (PDA).....                         | 39 |
| 3.2.5. Sales Spizizen (SPI).....   | 39 |
| 3.2.6. Antibióticos.....   | 39 |
| 3.2.7. Medios de crecimiento para transformación de <i>B. subtilis</i> .....     | 39 |
| 3.2.8. Solución TE.....  | 40 |
| 3.2.9. Solución TAE.....   | 40 |
| 3.2.10. Solución de siembra 10x de ADN en geles.....                             | 40 |
| 3.2.11. Medio para determinar la actividad $\beta$ -galactosidasa.....           | 41 |
| 3.2.12. Medios de germinación de esporas de <i>Bacillus</i> .....                | 41 |
| 3.3. Condiciones de crecimiento.....   | 41 |
| 3.4. Mantenimiento de las cepas bacterianas.....                                 | 41 |
| 3.5. Determinación del número de células vegetativas y esporas.....              | 42 |
| 3.6. Recolección de muestras y aislamientos de <i>Bacillus</i> .....             | 42 |
| 3.7. Crecimiento de cepas fúngicas en medio líquido.....                         | 43 |
| 3.8. Recuentos de cepas fúngicas.....  | 43 |
| 3.9. Mantenimiento de cepas fúngicas.....  | 44 |
| 3.10. Enfrentamiento con cepas fúngicas.....                                     | 44 |
| 3.11. Ensayo de formación de biofilm.....  | 44 |
| 3.12. Desplazamientos de las cepas en medio semi-sólido.....                     | 44 |

|   |    |
|---|----|
| 3.13. Obtención de esporas limpias.....   | 45 |
| 3.14. Germinación de esporas.....   | 45 |
| 3.15. Determinación del número de células vegetativas y esporas sobre la superficie de la hoja.....             | 45 |
| 3.16. Ensayos en mini-fardos (“ruleros”).....   | 46 |
| 3.17. Ensayo a mediana escala en “bandejas”.....  | 47 |
| 3.18. Transformación de <i>B. subtilis</i> .....  | 48 |
| 3.19. Construcción de cepas de <i>B. subtilis natto</i> (BSN).....  | 48 |
| 3.20. Extracción de ADN cromosomal.....   | 49 |
| 3.21. Electroforesis del ADN en geles de agarosa.....   | 50 |
| 3.22. Secuenciación de las muestras de ADN.....   | 50 |
| 3.23. Análisis del transcriptoma.....   | 51 |
| 3.24. Reacción en cadena de la polimerasa.....  | 52 |
| 3.25. Construcción de cepas de <i>Bacillus</i> .....  | 52 |
| 3.26. Clonación de genes kinB, kinC y mutagénesis sitio dirigida.....   | 52 |
| 3.27. Ensayo de la actividad $\beta$ -galactosidasa.....  | 54 |
| 3.28. Ensayos de la actividad $\beta$ -galactosidasa.....   | 55 |
| 3.29. Medición de la actividad $\beta$ -galactosidasa a partir de placas de Petri.....                          | 55 |
| 3.30. Observación de microorganismos en fresco.....   | 55 |
| 3.31. Tinción de flagelos.....  | 56 |
| 3.32. Fotos de microscopía.....   | 56 |
| 3.33. Experimentos de complementación.....  | 56 |
| 3.34. Estimulación de la actividad multicelular dependiendo de la cantidad de Spo0A activo.....                 | 56 |
| 3.35. Experimentos de colonización de raíces de plantas.....  | 57 |
| 3.36. Análisis de ácidos grasos.....  | 57 |
| 3.37. Preparación de extractos conteniendo ácidos grasos ramificados de <i>B. subtilis</i> .<br>.....           | 58 |
| Capítulo 1.....   | 59 |
| Desarrollo de un inoculante bacteriano.....   | 59 |
| 1.1. Aislamiento de cepas formadoras de esporas.....  | 62 |
| 1.2. Enfrentamiento de las cepas de <i>Bacilli</i> aisladas con las distintas cepas fúngicas fitopatógenas..... | 63 |
| 1.3. Ensayo preliminar de deshidratación de hojas de alfalfa.....   | 65 |
| 1.4. Ensayo a pequeña escala en “bandejas”.....   | 67 |

|  |     |
|--|-----|
| 1.5. Tipificación de las cepas seleccionadas por secuenciación del ADN codificante para el ARN ribosomal 16S.....                                    | 70  |
| 1.6. Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas seleccionadas.....   | 73  |
| 1.7. Observación macroscópica y microscópica de las cepas seleccionadas.....   | 74  |
| 1.8. Curvas de crecimiento.....  | 77  |
| 1.9. Recuento de células viables y esporas.....  | 78  |
| 1.10. Capacidad de formar biofilms sólidos y líquidos.....   | 79  |
| 1.11. Capacidad de desplazarse en medio semi-sólido.....   | 81  |
| 1.12. Ensayo de germinación de esporas sobre tejido vegetal.....   | 82  |
| 1.13. Ensayos con mini-fardos.....   | 88  |
| 1.14. Procesamiento de muestras de henos.....  | 90  |
| Capítulo 2.....  | 94  |
| Mecanismos de movimiento sobre superficie. Características del sliding.....  | 94  |
| Capítulo 3.....  | 107 |
| Genes involucrados en el sliding.....  | 107 |
| 3.1. Dilucidación de los componentes de la maquinaria del sliding: Análisis de transcritómica de <i>B. subtilis</i> bajo condiciones de sliding..... | 108 |
| 3.2. El sliding depende de la expresión de los genes <i>bslA</i> y <i>eps</i> .....  | 117 |
| 3.3. El papel de los componentes celulares de la maquinaria de sliding en <i>B. subtilis</i> .<br>.....  | 121 |
| Capítulo 4.....  | 131 |
| Regulación del sliding.....  | 131 |
| 4.1 El sistema de señalización del phosphorelay coordina múltiples comportamientos multicelulares en <i>B. subtilis</i> .....                        | 131 |
| 4.2. La señal de deslizamiento.....  | 135 |
| 4.3. El potasio constituye la señal para la interconexión fina entre el deslizamiento social y el desarrollo del biofilm.....                        | 146 |
| Capítulo 5.....  | 150 |
| El Modelo.....   | 150 |
| Conclusiones.....  | 161 |
| Capítulo 1:.....   | 161 |
| Capítulo 2:.....   | 162 |
| Capítulo 3:.....   | 163 |
| Capítulo 4:.....   | 163 |
| Capítulo 5:.....   | 164 |
| Resumen.....   | 166 |

|                     |     |
|---------------------|-----|
| Primera Parte:..... | 166 |
| Segunda Parte:..... | 167 |
| Referencias.....    | 174 |

## Índice de figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Distintos tipos de fardos.   | 2  |
| Figura 2: Control biológico contra distintos tipos de hongos   | 6  |
| Figura 3: Clasificación de las quinasas según su homología en el sitio de unión al ATP.                      | 10 |
| Figura 4: Phosphorelay.  | 11 |
| Figura 5: Regulación de SinR y AbrB.   | 14 |
| Figura 6: Eventos de la germinación de <i>B. subtilis</i> .  | 20 |
| Figura 7: Distintas formas de movilidad.   | 24 |
| Figura 8: Determinación del número de células vegetativas y esporas sobre la superficie de la hoja.          | 46 |
| Figura 9: Esquema de trabajo en mini-fardos.   | 47 |
| Figura 10: Bandejas con aproximadamente 100 gramos de alfalfa inoculada.                                     | 47 |
| Figura 11: Reacción enzimática de $\beta$ -galactosidasa.  | 54 |
| Figura 12: Cepas fúngicas que se deseaba controlar.  | 60 |
| Figura 13: Aislamiento de cepas salvajes.  | 62 |
| Figura 14: Enfrentamiento en placa de Petri de las cepas seleccionadas con <i>Aspergillus flavus</i> .       | 63 |
| Figura 15: Enfrentamiento en placa de Petri de las cepas seleccionadas con <i>Fusarium verticillioides</i> . | 64 |
| Figura 16: Enfrentamiento en placa de Petri de las cepas seleccionadas con <i>Penicillium</i> sp.            | 64 |
| Figura 17: Enfrentamiento en placa de Petri de las cepas seleccionadas con                                   | 65 |

*Mucor* sp.

|  |       |
|--|-------|
| Figura 18: Ensayo cualitativo de deshidratación en hojas.  | 66    |
| Figura 19: Selección preliminar de cepas.  | 67    |
| Figura 20: Bandejas con aproximadamente 100 gramos de alfalfa inoculadas.  | 68    |
| Figura 21: Porcentaje de humedad al cabo de 72 h.  | 68    |
| Figura 22: Muestras de ADN cromosomal.   | 70    |
| Figura 23: Ejemplo de fragmento de secuencia obtenida del producto de PCR.   | 71    |
| Figura 24: Árbol filogenético de las cepas aisladas.   | 73    |
| Figura 25: Caracterización de la morfología macro y microscópica de las cepas seleccionadas.   | 75/76 |
| Figura 26: Curva de crecimiento de las cepas seleccionadas comparadas con JH642.   | 77    |
| Figura 27: Capacidad de formar biofim.   | 79/80 |
| Figura 28: Cuantificación de biofilms formados por las cepas salvajes ya seleccionadas.  | 80    |
| Figura 29: Ensayo de movilidad en medio semisólido.  | 81/82 |
| Figura 30: Germinación de esporas con AFGK.  | 84    |
| Figura 31: Germinación de las esporas sobre tejido vegetal y evolución del crecimiento y esporulación.   | 86/87 |
| Figura 32: Recuento de cepas fúngicas obtenido luego de la inoculación con distintas concentraciones de las cepas de <i>Bacilli</i> seleccionadas. | 89    |
| Figura 33: Hongos contaminantes de los fardos.   | 90    |
| Figura 34: Hongos contaminantes de los fardos.   | 91    |
| Figura 35: Enfrentamiento con hongos aislados.   | 92/93 |
| Figura 36: Origen de la cepa NCIB3610.   | 97    |
| Figura 37: Presencia de flagelo y movilidad en placa de Petri.   | 98    |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 38: Movimiento en superficie de distintas cepas de <i>B. subtilis</i> .   | 99  |
| Figura 39: Regulación genética de la movilidad tipo sliding en <i>B. subtilis</i> .  | 102 |
| Figura 40: Ensayo con IPTG de cepas Spo0A Sad67 <sup>+</sup> y derivadas.  | 103 |
| Figura 41: El regulador clave de comportamiento multicelular, Spo0A, controla el sliding en <i>B. subtilis</i> .   | 104 |
| Figura 42: El rol fundamental de Spo0A para el sliding en la colonización de las raíces de plantas.  | 105 |
| Figura 43: Esquema con los posibles genes con funciones en la movilidad de deslizamiento <i>B. subtilis</i> .  | 118 |
| Figura44: Capacidad de deslizamiento de <i>B. subtilis</i> natto y sus mutantes, de izquierda a derecha: tipo salvaje, <i>tasA</i> , <i>epsG</i> y <i>bsIA</i> .   | 119 |
| Figura 45: Capacidad de deslizamiento de <i>B. subtilis</i> NCIB3610 con sus mutantes y <i>B. subtilis</i> NCIB3610 <i>hag</i> con sus dobles mutante <i>hag-tasA</i> , <i>hag-epsG</i> y <i>hag-bsIA</i> .                  | 120 |
| Figura 46: Rol de la surfactina en el desplazamiento sobre superficies.  | 121 |
| Figura 47: Hidrofobicidad de cepas de <i>B. subtilis</i> .   | 123 |
| Figura 48: Complementación entre cepas incapaces de deslizarse.  | 124 |
| Figura 49: Efecto de la cerulenina en el swarming y sliding.   | 125 |
| Figura 50: Efecto dosis/respuesta dependiente de las concentraciones sub-CIM de cerulenina de las cepa de tipo salvaje de NCIB3610 en el swarming y sliding y de sus mutantes en <i>bsIA</i> y <i>hag</i> , respectivamente. | 126 |
| Figura 51: La suplementación con ácidos grasos de cepas tratadas con concentraciones sub-CIM de cerulenina.  | 127 |
| Figura 52: El perfil de ácidos grasos <i>de novo</i> sintetizado por las células de tipo salvaje <i>B. subtilis</i> RG4365 en condiciones de crecimiento planctónicas en LB líquido y sliding activo en placas LB agar soft. | 128 |
| Figura 53: El agregado de AG exógenos ramificados, pero no AG lineales (ácidos palmítico (C16:0) y oleico (C18:1)) restauran la capacidad del sliding de <i>B. subtilis</i> .  | 129 |
| Figura 54: Funciones propuestas para de la surfactina, EPS, TasA y BslA en el deslizamiento social de <i>B. subtilis</i> .   | 130 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 55: Las quinasas sensoras del phosphorelay, KinB y KinC, son las responsables de la movilidad social tipo sliding en <i>B. subtilis</i> .                                   | 132 |
| Figura 56: Fenotipo de sliding completamente deficiente de cepas <i>spo0A</i> , <i>spo0F</i> y doble mutante <i>kinB-KinC</i> de <i>B. subtilis</i> natto.                         | 132 |
| Figura 57: Cinética de la movilidad de deslizamiento de diferente mutantes en el phosphorelay a distintos tiempos.   | 133 |
| Figura 58: Complementación de las cepas <i>kinB</i> y <i>kinC</i> en el sliding.   | 133 |
| Figura 59: La esporulación, biofilm y movilidad de deslizamiento son dependientes de Spo0A en <i>B. subtilis</i> que es regulado por duplas de quinasas sensoras del phosphorelay. | 134 |
| Figura 60: Esquema de participación de las quinasas en los distintos comportamientos multicelulares de <i>B. subtilis</i> .  | 135 |
| Figura 61: El potasio como señal fisiológica que regula la movilidad tipo sliding en <i>B. subtilis</i> .  | 137 |
| Figura 62: El potasio estimula el deslizamiento de cepas competentes en KinB (de tipo salvaje y cepas mutantes <i>kinC</i> ) pero no en células KinB <sup>-</sup> .                | 138 |
| Figura 63: Una representación de la topología de membrana de un canal de potasio típico procarionta.   | 141 |
| Figura 64: Secuencia de KinB que podría poseer un motivo sensor de K <sup>+</sup>  | 141 |
| Figura 65: Esquema representativo de la topología de KinB.   | 143 |
| Figura 66: KinB alberga un dominio de detección de potasio con homología al filtro de selectividad de los canales de potasio.  | 144 |
| Figura 67: La mutación en la secuencia de selectividad de potasio en KinB abolió la capacidad de <i>B. subtilis</i> para deslizarse en respuesta a la adición de potasio.          | 146 |
| Figura 68: Regulación espacio-temporal de las quinasas que inducen el inicio del sliding.  | 148 |
| Figura 69: Regulación espacio temporal de las quinasas KinB y KinC.  | 149 |
| Figura 70: Dos modelos posibles para la regulación temporal y espacial de la multicelularidad (sliding, biofilms y cuerpos fructíferos) en <i>B. subtilis</i> .                    | 153 |
| Figura 71: Medidas de la expresión del gen <i>abrB</i> y dos modelos para la progresión de la pluricelularidad en <i>B. subtilis</i> .   | 154 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura72: Estimulación del comportamiento social de <i>B. subtilis</i> en respuesta a la concentración de IPTG en placa de Petri.             | 156 |
| Figura73: Un modelo de trabajo para la regulación espacio-temporal de las diferentes conductas sociales en <i>B. subtilis</i> .               | 157 |
| Figura 74: Migraciones o movilidades (traslocaciones) y asentamientos o ciudades (biofilm) como atributos de la vida bacteriana en comunidad. | 160 |

## Índice de Tablas

|   |     |
|---|-----|
| <i>Tabla 1: Cepas utilizadas en este trabajo.</i>   | 34  |
| <i>Tabla 2: Cepas bacterianas aisladas para este trabajo.</i>   | 37  |
| <i>Tabla 3: Cepas fúngicas utilizadas en este trabajo.</i>  | 37  |
| <i>Tabla 4: Tratamientos aplicados a los mini-fardos.</i>   | 46  |
| <i>Tabla 5: Oligonucleótidos usados en este trabajo.</i>  | 53  |
| <i>Tabla 6: Enfrentamiento con cepas fúngicas y deshidratación. Resumen</i>   | 69  |
| <i>Tabla 7: Detalle de bases secuenciadas y cebadores utilizados para cada muestra.</i>   | 71  |
| <i>Tabla 8: Resultados de alineamientos de secuencias ensambladas.</i>  | 72  |
| <i>Tabla 9: Recuento de células viables y de esporas.</i>   | 78  |
| <i>Tabla 10: Recuento en mini-fardos.</i>   | 88  |
| <i>Tabla 11: Análisis del microarray de células tipo salvaje bajo condiciones de sliding permisivas y no permisivas</i>                 | 110 |
| <i>Tabla 12: Análisis del microarray de células mutantes en spo0A y células de tipo salvaje bajo condiciones permisivas de sliding.</i> | 112 |
| <i>Tabla 13: Recuento de células viables y esporas ante el agregado de potasio.</i>   | 139 |
| <i>Tabla 14: La esporulación y la capacidad de sliding son funciones separadas de KinB.</i>   | 153 |

### Introducción

En nuestro país existen entre 5 y 6 millones de hectáreas implantadas con alfalfa. Aproximadamente el 35% de esa superficie tiene alfalfa como única especie y en el resto de los casos, la alfalfa se encuentra consociada con otras forrajeras.

El primer destino del forraje producido es el pastoreo o suministro en fresco y aproximadamente el 35% se destina a la elaboración de forrajes conservados como una estrategia de traslado de excedentes de forrajes desde una época de abundancia (primavera/otoño), a una de escasez (invierno y ocasionalmente verano).

Además, el desarrollo de la soja y su posterior revalorización frente a los demás cultivos generó el desplazamiento de otros cultivos, como ser la alfalfa, para transformarse en el principal monocultivo en nuestro país. A partir de entonces se redujo el pastoreo directo y consecuentemente la ocupación de la superficie por parte del animal.

Sin embargo la demanda de forraje permaneció vigente y es respondida con forraje almacenado, conservado fuera del lote productivo. Así, los forrajes conservados debieron mejorar su calidad, para justificar un mayor costo de elaboración que el simple pastoreo, y cubrir los requerimientos de animales. Se debe tener en cuenta también, el aumento de la demanda de carnes y leche, que, al mismo tiempo incrementa la demanda en la cría continua de animales.

Existen dos formas principales de conservación del forraje: la henificación y el silaje. El primero actúa por deshidratación y el segundo por acidificación.

La henificación, en sus distintas variantes, es la principal forma de conservar alfalfa pura o consociada absorbiendo cerca del 85% de la superficie destinada a este fin. Así, entre 1,8 y 2 millones de hectáreas son henificadas con una producción promedio estimada de 10 millones de toneladas. La mayor proporción del forraje conservado es consumido por el mismo productor o empresa que lo elaboró, y aproximadamente un 25% del heno está dirigido al mercado interno de transacción.

## *Introducción*

La principal variable en el proceso de henificar forraje obteniendo una calidad óptima es la humedad. La reducción drástica de la humedad resulta clave una vez que el forraje ha sido cortado y conduce a la conservación de una mayor proporción del valor nutritivo original (Romero, 2004). Cuando este propósito no se logra, disminuye de manera drástica el valor nutricional del heno obtenido. Por lo tanto, es de suma importancia reducir lo más rápidamente posible el contenido de humedad a valores en que la respiración del tejido vegetal y el desarrollo de microorganismos indeseables deben permanecer casi nula. Esta desecación permite conservar el heno por largos periodos sin que se produzcan pérdidas muy significativas de su valor nutricional.

El contenido de humedad en alfalfa al momento de corte puede rondar el 80-85%, luego del período de oreo y exposición en el campo debe estar como máximo en el rango de 14-18%, dependiendo de la especie forrajera involucrada y el método elegido. Los umbrales máximos de humedad tolerados varían con el método de henificar adoptado, asociado a la capacidad de continuar disipando humedad de cada uno de ellos. Así, los fardos prismáticos permiten ser confeccionados con el mayor contenido de humedad, mientras que los megafardos constituyen el otro extremo, con el umbral mínimo (Rossi y col., 2008).



*Figura 1: Distintos tipos de fardos.*

## Introducción

Cuando se procesa heno por encima de estos umbrales máximos, el forraje es susceptible a calentamiento o proliferación de hongos, y deterioro severo de su calidad, inclusive hasta la pérdida total por incendio del propio fardo. Si por el contrario, el forraje se procesa con menos humedad, habrá una importante pérdida de hojas, y empobrecimiento relativo del valor nutricional del mismo.

En Argentina el proceso de deshidratación del forraje cortado se hace a campo, es decir por simple exposición a condiciones ambientales. La deshidratación artificial por tratamiento térmico resulta económicamente inviable. El objetivo fundamental es entonces reducir a la mínima expresión el lapso durante el cual el forraje cortado debe quedar expuesto a la intemperie, hasta alcanzar la humedad máxima tolerable para la conservación del heno.

Ese lapso depende del clima en general: la temperatura, humedad relativa ambiente, regímenes de precipitaciones y velocidad del viento en particular, pero obviamente son variables hasta el momento no controlables. Por lo tanto, el deshidratado depende también de la región donde es producido, el tiempo de secado varía de dos días a una semana o inclusive más, y durante ese lapso existe una pérdida de calidad continua por respiración, insolación e incidencia de lluvias. Como ejemplo, mencionemos que por cada 3 mm de precipitación se puede llegar a perder hasta un 5% de los nutrientes digestibles totales. Además, las horas de exposición a luz solar reducen drásticamente el color del forraje, y con esto su calidad.

Por último, pero de máxima importancia, cabe señalar que la persistencia de elevada humedad permite el desarrollo y proliferación de hongos, en especial del género *Penicillium* sp, *Fusarium* sp y *Aspergillus flavus* los cuales consumen nutrientes del forraje en proceso y lo contaminan con potenciales micotoxinas depresoras del consumo y la performance animal.

Queda explícita la importancia de la velocidad de la deshidratación, pero resta considerar aún, que los distintos componentes del forraje, básicamente hojas y tallos, no tienen la misma capacidad para perder agua ni tampoco el mismo valor nutricional. Las hojas pueden contener hasta 70% de los azúcares solubles y proteína de un forraje y se deshidratan muy rápidamente. Una vez

superado el umbral mínimo de humedad, las hojas se desprenden y caen al suelo resultando imposible su recuperación y pasando a constituirse en pérdida muy importante en el valor nutricional y la calidad del forraje (Ventroni y col., 2008).

Por lo tanto, la humedad para henificar es una solución de compromiso entre el valor mínimo de humedad en hojas antes de desprenderse y el valor máximo de humedad tolerable en los tallos que no provoquen calentamiento y proliferación de hongos en los henos elaborados.

Resulta evidente entonces la importancia de un producto que permita, por un lado acortar el tiempo de deshidratación del forraje cortado, poder procesar henos con mayor grado de humedad de manera tal de retener más nutrientes al tener mayor contenido de hojas, y por otro lado, prevenir el desarrollo y proliferación de hongos.

Si bien la calidad del heno nunca será superior a la de la pastura que le dió origen, una óptima confección y conservación de ese heno garantiza una mayor producción de carne y leche. De aquí, se desprende la importancia de productos que:

- (i) permitan acortar los tiempos de secado de la alfalfa cortada antes de henificar
- (ii) poder confeccionar henos con mayor grado de humedad de manera tal de retener más nutrientes (menor respiración vegetal), mayor contenido de hojas (mayor valor nutricional y mejor palatabilidad)
- (iii) prevenir, al mismo tiempo, del ataque por hongos.

Adicionalmente, estos henos así confeccionados producirán un efecto beneficioso sobre la nutrición del animal que redundará en una mayor producción de carne o leche.

Actualmente existen dos alternativas para reducir el período de secado a campo. Una de ellas es el uso de compuestos químicos con el objetivo de acelerar el proceso de secado y preservar el forraje del deterioro bacteriano y fúngico, tales como el carbonato de potasio o carbonato de sodio, aunque la efectividad de estos productos está muy condicionada por las condiciones climáticas al momento del tratamiento. El amoníaco anhidro también fue

## *Introducción*

utilizado para el secado y prevención del ataque por hongos, sin embargo, requiere cuidados especiales en su manipuleo y puede generar sustancias residuales tóxicas para el ganado. Otro ejemplo es el ácido propiónico, que es un excelente conservante químico pero su tratamiento es corrosivo y sumamente costoso. Su uso ha quedado restringido a resolver situaciones de coyuntura ante un pronóstico de precipitación y cuando solo existe un pequeño desvío del tenor de humedad necesario para procesar el heno (Bruno y col., 1997).

La otra posibilidad es el tratamiento con agentes biológicos, lo cual constituye una alternativa más respetuosa del medio ambiente y al mismo tiempo eficaz, tal cual demuestra la experiencia internacional en países como Estados Unidos, Canadá y Australia.

Los inoculantes para heno desarrollados hasta el momento en el mundo utilizan bacterias del género *Bacillus*, habitantes normales del suelo, de las superficies de las plantas, los forrajes y del ambiente intestinal tanto de animales como del ser humano. Otra característica fundamental de este género es la producción de sustancias bioactivas como distintos antibióticos naturales efectivos contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas tales como bacilicina, subtilina, micobacilina, amicoumacina, etc. y contra hongos y virus surfactina e iturina (Stein, 2005; Singh y Cameotra, 2004). En la siguiente figura se muestra un ejemplo del poder antifúngico que poseen estos bacilos.

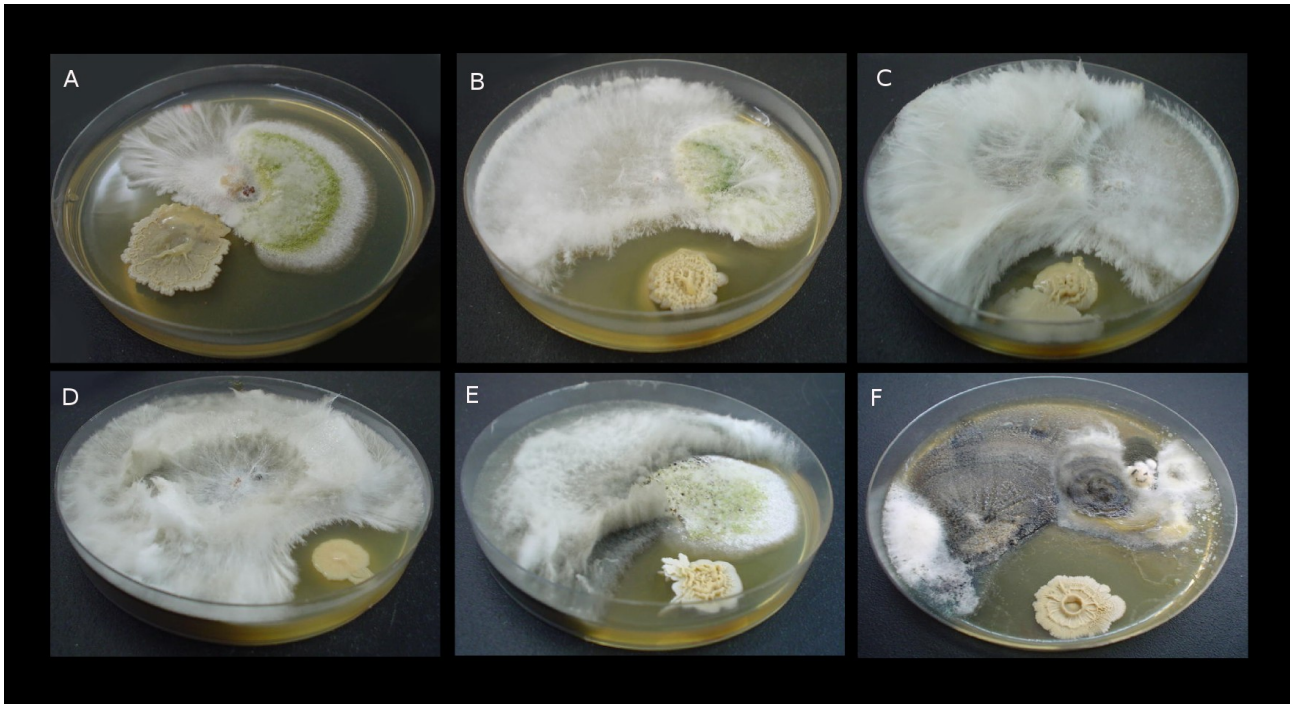


Figura 2: Control biológico de diferentes cepas de *Bacillus* contra distintas cepas fúngicas: A-B: *Sclerotium rolfsii*, *Aspergillus flavus*. C-E: *Macrophomina sp.*, *Aspergillus flavus*, F: *Fusarium verticillioides*, *Penicillium sp.*, *Bipolaris sp.*, *Coletotrichum sp.*

La adopción de este tipo de tecnología, junto al adecuado manejo del cultivo y las buenas prácticas de manufactura para la elaboración de heno, pueden ofrecer los siguientes beneficios:

1. conservan el valor nutricional del forraje;
2. reducen la posibilidad de intoxicaciones de los animales y personal en contacto con los mismos.
3. extienden la época y la región adecuada para la producción de forrajes conservados.
4. reducen los tiempos de operación de la maquinaria, mejorando su retorno económico.
5. son económicos y respetuosos del medio ambiente.

En particular, los inoculantes más importantes producidos hasta el momento están elaborados en base a *Bacillus amyloliquefaciens* (Becker Underwood-Australia) o *Bacillus pumilus* (Pioneer-EE.UU). Estos géneros bacterianos producen una serie de sustancias con poder antimicrobiano en

## Introducción

general antifúngico, que sustentan su efectividad en el tratamiento de los forrajes a henificar. Poseen además la capacidad de esporular y resultar, en consecuencia, muy estable a los procesos de producción industrial, al almacenaje e inclusive a tolerar insolación durante su aplicación en el campo.

Hasta el momento, no existen en nuestro país inoculantes de este tipo que sea de origen nacional. Más aún, tampoco se comercializan estos productos a base de *Bacillus*, existiendo sólo un trámite de inscripción para un producto importado en base a *B. amyloliquefaciens*.

Como antecedentes de inoculantes a base de esporas de especies del género *Bacillus* para henos encontramos 2 productos comerciales:

(1) Hay Rite®, o Henosilo® en algunos países, de Becker Underwood – Australia, cuyo principio activo es *Bacillus amyloliquefaciens*.

(2) Un producto en base a *Bacillus pumilus* de Pioneer, EE.UU.

(3) También existen otros productos en base a *Bacillus* sp, para el tratamiento de semillas y la protección de diversos cultivos producidos por: AgraQuest, Inc., USA, Growth Products, Ltd., USA, Novozymes, Dinamarca, Gustafson LLC, USA, Micro-Flo Company LLC, USA, de 4, Earth Biosciences Inc., USA, etc.

No obstante, es importante volver a remarcar que hasta el momento no existen en el país productos de origen nacional, ni tampoco importados, que utilicen este género como su principio activo.

La utilización de esta herramienta, como ya mencionamos anteriormente, constituye una alternativa natural, económica, eficiente y ecológica. Es económica y ecológica puesto que es más “respetuosa del medio ambiente”, frente al uso de desecantes y ácidos orgánicos que además de su mayor costo son corrosivos para la maquinaria y potencialmente tóxicos para el operador. Es natural porque se basa en el agregado de microorganismos, en este caso bacterias seleccionadas por sus efectos beneficiosos, que normalmente se encuentran conviviendo con el animal y la pastura en su hábitat natural. Por último se trata de una estrategia eficiente ya que permite mantener el valor nutricional del forraje al disminuir los tiempos de secado, evitando los daños ocasionados por lluvias (lixiviación de nutrientes), mantener un alto contenido de hojas en relación con el contenido de tallo, inhibir el proceso de respiración

vegetal que consumiría nutrientes necesarios para el animal, mejorar las propiedades organolépticas del forraje (olor, color, sabor) e inhibir simultáneamente el desarrollo de hongos que además de producir la putrefacción del forraje pueden llegar a producir un tipo particular de micotoxinas (aflatoxinas) peligrosas para la salud del animal y el hombre.

Comparativamente, los desecantes químicos y los ácidos orgánicos preservantes son desproporcionadamente caros, corrosivos para la maquinaria y potencialmente tóxicos para el operador.

### **La esporulación bacteriana como un proceso básico con proyección industrial.**

Los productos biológicos desarrollados basados en bacterias del género *Bacillus* han visto facilitado su éxito por su característica de formación de esporas resistentes, que no necesitan condiciones especiales de almacenaje y toleran condiciones desfavorables al momento de ser aplicados (altas temperaturas, insolación) sin reducir su capacidad colonizadora del sustrato a tratar. Esta importante característica, tiene un particular interés comercial, puesto que facilita, como se mencionó anteriormente, el embalaje y su posterior distribución.

El interés aplicado o biotecnológico en la esporulación bacteriana reside en el hecho de que varios miembros del género *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, etc.) (Bottone y col., 2003; Ongena y col., 2007; Chen y col., 2009) producen sustancias naturales para su aplicación en el biocontrol de plagas tales como insectos, hongos, parásitos, bacterias y virus.

La formación de endosporas en miembros del género *Bacillus* se encuentra altamente conservada tanto desde el punto de vista morfológico, fisiológico y de la regulación génica. *Bacillus subtilis* representa el organismo modelo a este respecto y sus propiedades pueden ser extrapolables a otros miembros del género *Bacillus*.

## **El proceso de esporulación en *Bacillus subtilis*.**

Cuando la carencia de nutrientes se vuelve muy severa, *B. subtilis* no necesariamente muere, sino que posee una estrategia adicional final, la capacidad de formar mediante un proceso complejo, estructuras quiescentes conocidas como esporas (Sonenshein, 2000). Esta habilidad está casi exclusivamente restringida a bacterias Gram-positivas de los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermoactinomyces*, *Sporolactobacillus*, *Sporasarcinas* y *Streptomyces* (Sonenshein, 2000). Durante el proceso de formación de la spora a partir de una célula vegetativa se desencadenan una serie de eventos fisiológicos y moleculares, los cuales conducen progresivamente a la diferenciación celular de *B. subtilis* (Stragier y Losick, 1996).

En una perspectiva a largo plazo, la formación de la spora le permite a la célula sobrevivir a una gran diversidad de cambios en el ambiente. La esporulación es un proceso irreversible que conduce a la formación de una célula metabólicamente quiescente, capaz de soportar condiciones ambientales adversas y períodos prologados e indefinidos de hambre (Sonenshein, 2000).

El inicio de la esporulación de *B. subtilis* se encuentra bajo el control de un sistema de dos componentes expandido, denominado "phosphorelay" compuesto por histidin-quinasas sensoras y un grupo de proteínas llamadas Spo0 (Spo0F y Spo0B), las cuales transmiten la señal a un regulador de respuesta (Spo0A). Hasta la fecha se ha reportado la identificación de cinco proteínas de la esporulación con posible o comprobada actividad histidin-quinasas (KinA, KinB, KinC, KinD y KinE). Estas quinasas se clasificaron en grupos basándose en comparación de la región alrededor de la histidina que se convierte en fosforilada, el sitio de unión a ATP. Las quinasas de *B. subtilis* fueron clasificadas dentro del grupo IIIB, siendo estas las quinasas del phosphorelay (Fabret y col., 1999).

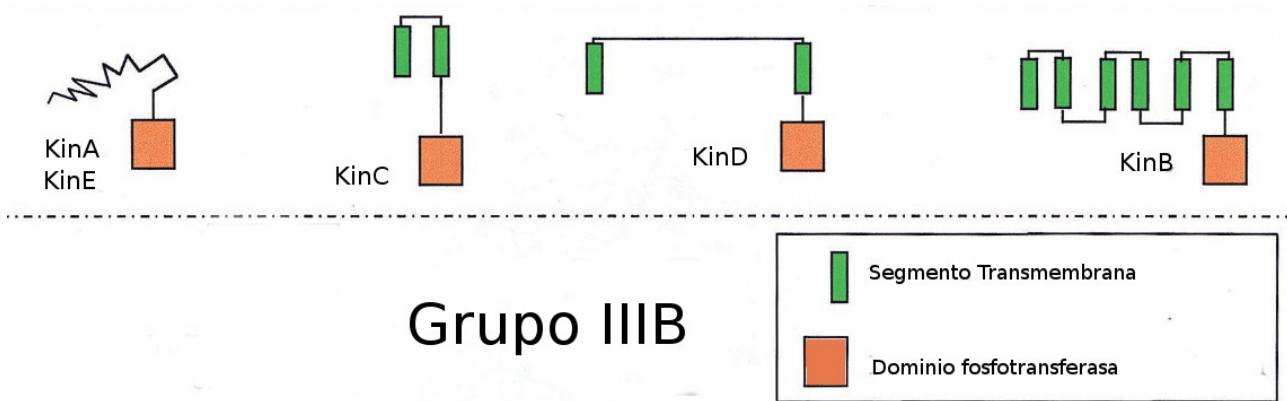


Figura 3: Clasificación de las quinasas según su homología en el sitio de unión al ATP.

Después de la activación de las quinasas, el fosfato es transferido al regulador de respuesta Spo0F (Burbulys y col., 1991), que es un punto de integración de diferentes señales provenientes del metabolismo celular o del medio ambiente circundante; luego Spo0F transfiere el fosfato a la fosfotransferasa Spo0B, la cual finalmente transfiere el fosfato al regulador transcripcional clave del inicio de la esporulación y de distintos comportamientos de multicelularidad, Spo0A, como se muestra en la siguiente figura (Ireton y col., 1993).

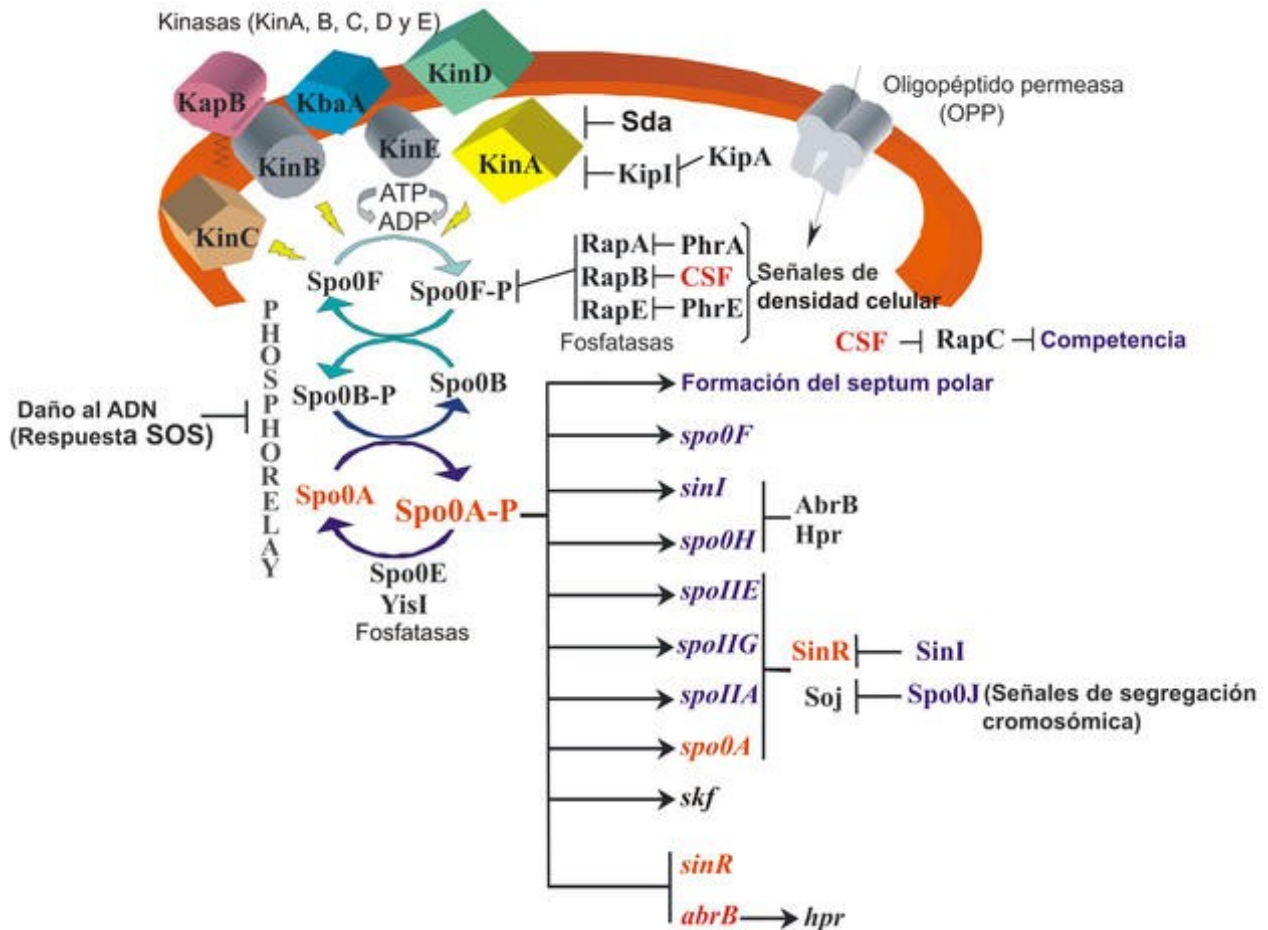


Figura 4: Phosphorelay.

Cuando Spo0A-P se acumula en altos niveles, comienzan a transcribirse los genes implicados en los cambios morfológicos que transforman a la célula vegetativa en una espora, ejemplo *spoIIE*, *spoIIA* y *spoIIG* (Piggot y col., 2004). Spo0A-P (Spo0A fosforilado) reprime la transcripción de *sinR* y *abrB*, este último codifica un regulador transcripcional que activa el gen *hpr*, cuyo producto es un represor de genes necesarios para la esporulación (Strauch y Hoch, 1993; Strauch y col., 1989). AbrB es también un represor transcripcional y, entre los genes que reprime se encuentra el codificante para el factor  $\sigma^H$ , el cual es indispensable para la esporulación pero no exclusivo de ella. Este factor sigma alternativo es responsable de la transcripción de *kinA* y de los altos niveles de Spo0A necesarios para desatar (luego de su activación por fosforilación) la esporulación, ya que *spo0A* tiene dos promotores, uno

dependiente de  $\sigma^A$  responsable de los bajos niveles durante la fase vegetativa y otro dependiente de  $\sigma^H$  implicado en el incremento de Spo0A al inicio de la esporulación (Chung y col., 1994). La regulación negativa del flujo de fosfatos a través del "phosphorelay" está ejercida por dos grupos de fosfatasa (RapA/RapB/RapE y Spo0E/YisI) las cuales son responsables de la desfosforilación de Spo0F-P o de Spo0A-P ante diversos estímulos, respectivamente e interfiriendo de esta manera el flujo de fosfatos por el "phosphorelay". Esto, le permite a las células otras alternativas menos drásticas como por ejemplo entrar en competencia, antes de que se inicie el proceso de esporulación (Schultz y col., 2009; Perego y col., 2001).

*B. subtilis* sensa señales aún desconocidas relacionadas con la ausencia de nutrientes, el ciclo celular y la densidad celular, determinando el nivel de fosforilación del regulador maestro Spo0A. La cantidad de Spo0A-Pi constituye la clave que determina la ruta que *B. subtilis* emprenderá para adaptarse y sobrevivir a un medio ambiente cambiante. Niveles bajos de Spo0A-P son insuficientes para gatillar la esporulación, pero inducen respuestas alternativas como producción antibióticos y de exo-enzimas hidrolíticas (que degradan proteínas y polisacáridos), las cuales prolongan la supervivencia (Schultz y col., 2009).

La proteína AbrB (Figura 4) inhibe, además de la formación de esporas, la expresión de genes vinculados a la producción de antibióticos, exoenzimas, competencia, formación de biofilms, inhibe el "canibalismo" de *B. subtilis* hacia otras bacterias, formación de cuerpos fructíferos, producción de antimicrobianos, incluyendo antifúngicos, etc. Todos estos procesos son alternativos a la esporulación y le brindan a la bacteria mejores posibilidades de sobrevivir sin iniciar el camino irreversible de la formación de la espora si las condiciones medio ambientales no son demasiado severas. Si las condiciones ambientales no son extremas y esporula la bacteria perdería la oportunidad de colonizar un dado nicho, dejándolo libre para otros colonizadores. Si por el contrario "espera" demasiado en comenzar a esporular podría quedarse sin energía (nutrientes) suficiente para dar lugar a la

## Introducción

formación de la espora madura y por ende morir en ese ambiente hostil (Higgins y Dworkin., 2012). De aquí, la importancia de un balance estricto y fino de la formación de Spo0A–P, bajo el control del phosphorelay y sus reguladores.

Las proteínas AbrB, SinR y diversas fosfatasas (familias Rap y Spo0E) (figura 4) son responsables de esta represión de respuestas de adaptación de fase estacionaria de manera directa e indirecta. AbrB, además activa la expresión de *hpr*, cuyo producto Hpr (también llamado ScoC) es un represor directo de genes necesarios para la adaptación en fase estacionaria (producción de exoenzimas y antibióticos), formación de biofilms y la esporulación misma. Es decir, AbrB y Hpr se potencian mutuamente como represores de la formación de esporas y de la producción de antimicrobianos y biofilms.

Así, los bajos niveles de Spo0A–P formados (principalmente a expensas de la activación de KinB) cuando el cultivo alcanza la fase logarítmica tardía son suficientes para reprimir la expresión de *abrB*, lo cual bloquea la expresión de *hpr* y desreprime la transcripción de *spo0H* dando lugar a las respuestas alternativas como ser producción de sustancias bioactivas ya mencionadas.

Si estas respuestas resultan no ser suficientes para la adaptación y la supervivencia del *Bacillus*, otras señales continuarán impactando sobre las histidin quinazas sensoras, que ahora (a merced principalmente a la activación de KinA) llevarán a la formación de mayores niveles de Spo0A–P, para poder activar la transcripción de genes tempranos específicos de la esporulación (*spoIIA*, *spoIIE*, *spoIIG*, etc.) (Figura 4) e incluso *spo0F* y *spo0A* (retroalimentación positiva). Como resultado, el cultivo en hambreado o en alta densidad celular abandonará definitivamente la fase vegetativa de crecimiento e iniciará el camino de la esporulación.

Además de AbrB y Hpr el otro regulador clave de la expresión diferencial de genes de fase estacionaria es la proteína SinR. Este regulador transcripcional actúa activando genes vinculados a la motilidad (swimming y swarming) (Kearns y Losick, 2003; Kearns, 2010) la competencia genética; y

## Introducción

reprime la expresión de los genes de esporulación, formación de biofilms y síntesis de sustancias bioactivas (bio-antifúngicos y bio-insecticidas). La regulación de SinR se produce a nivel post-traducciona l y se encuentra a merced de la interacción proteína-proteína con su antagonista, SinI. La transcripción de *sinI*, a diferencia de *sinR*, está regulada por Spo0A~P que activa la transcripción de *sinI* a partir de T<sub>0</sub>. Así, al llegar al comienzo de la fase estacionaria los niveles de SinI aumentan mientras que los de SinR se mantienen sin grandes modificaciones, se forma el complejo SinI:SinR que inactiva a SinR y por ende se desbloquea la producción de antimicrobianos, la esporulación y la formación del biofilms, ver figura 1.5.

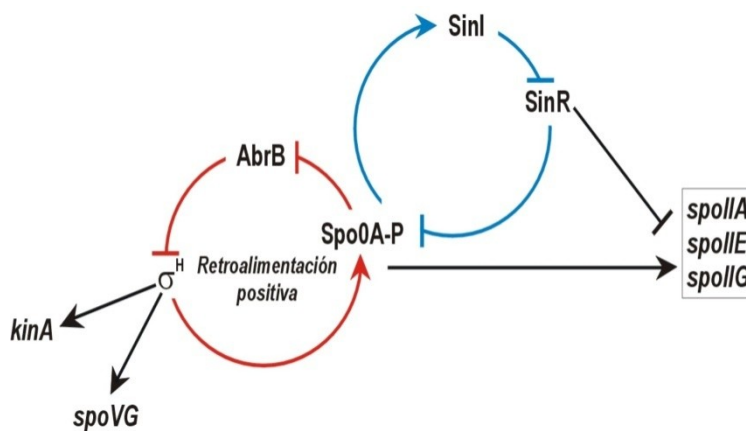


Figura 5: Regulación de SinR y AbrB.

A su vez, SinR es una proteína de acción pleiotrópica de unión al ADN que es esencial para procesos de la fase tardía del crecimiento como movilidad y competencia, y además es un represor de la esporulación, síntesis de subtilisina y formación de biofilms (Kearns y col., 2005). Esta represión de la esporulación se debe a que actúa reprimiendo la expresión de los genes *spo0A*, *spo0F* y genes del estadio II de la esporulación (*spoII*) entre otros (Mandic-Mulec y col., 1995; Schultz y col., 2009).

Por lo dicho, *B. subtilis* es capaz de desplegar un amplio repertorio de respuestas adaptativas para enfrentarse con circunstancias medioambientales adversas. Varias de estas respuestas tales como la formación de esporas, el canibalismo y la formación de biofilms, requiere de la misma proteína regulatoria Spo0A (Banse y col., 2011).

## Introducción

Cuando Spo0A se fosforila puede actuar como activador o represor de alrededor de 120 genes regulados directamente y otros 500 genes regulados indirectamente. También se indicó que la fosforilación masiva de Spo0A es gobernada por el "phosphorelay", sin embargo se desconoce la naturaleza de las señales que regulan a las quinasas (McLoon y col., 2011).

Como se mencionó en párrafos anteriores, *B. subtilis* posee cinco quinasas sensoras (KinA-KinE) (figura 4) de las cuales dos de ellas son solubles (KinA y KinE) y las tres restantes son de membrana (KinB, KinC KinD). Estas quinasas se autofosforilan a expensas de ATP ante el influjo de señales metabólicas y/o ambientales aun no identificadas pero vinculadas indefectiblemente al agotamiento de nutrientes, la densidad celular y señales del hospedador (Perego y col, 1996).

Esta autofosforilación de la proteína sensora siempre ocurre en un residuo de histidina altamente conservado de una región fosfotransferasa, para luego transferirse el fosfato a un residuo de aspartato, también altamente conservado en todos los reguladores de respuesta. En este caso la proteína Spo0F que, a diferencia de otros reguladores de respuesta "típicos" de los sistemas de dos componentes, carece del dominio C-terminal de unión a ADN. En un segundo paso de esta cascada de fosforilación, Spo0F-P transfiere el grupo fosforilo al residuo de aspartato de Spo0B que finalmente lo transfiere al residuo histidina del regulador maestro Spo0A. Este phosphorelay además se encuentra altamente regulada, como ya se describió anteriormente.

Cuatro quinasas del phosphorelay se dividen en 2 grupos de redundancia, KinA-KinB y KinC-KinD (McLoon y col., 2011). La quinasa KinA es conocida como la principal quinasa de esporulación junto con KinB mientras que, KinC y KinD son las quinasas principales reportadas para la formación de biofilms. En cuanto a la actividad de KinE no hay reportado ningún fenotipo hasta este momento.

Las quinasas KinA y KinB son capaces de mantener el nivel de Spo0A-P necesario para gatillar la esporulación en respuesta a condiciones de nutrientes limitadas y un determinado grado de estrés oxidativo. En la ausencia de KinA y KinB, las quinasas KinC y KinD son capaces de mantener un moderado nivel de

## *Introducción*

Spo0A-P. Aunque estos bajos niveles de Spo0A-P son insuficientes para desencadenar la esporulación, son capaces de inducir la expresión de los genes implicados en la formación de biofilms (Chen y col., 2012).

La surfactina (lipopéptido con propiedades tensoactivas) constituye una señal parácrina que indirectamente activa KinC, el cual podría fosforilar directamente el regulador maestro Spo0A, sin necesidad de pasar ese fosfato a través de Spo0F, y conducir a la producción de biofilms a través de la vía de SinI-SinR (Leñini C. trabajo doctoral en ejecución).

Como se ha reportado en la literatura, KinD posee una doble función, por un lado actúa como una fosfatasa de Spo0A-P cuando los grupos fosforilos provienen de KinA y KinB, mientras el biofilm aún no se ha formado y actúa como una quinasa cuando el biofilm ya se ha desarrollado y se encuentra presente el EPS, que inhibe la actividad fosfatasa de KinD. De esta manera queda desbloqueada la formación de espora KinA y KinB dependiente.

Además, se ha reportado que el ácido málico a una concentración de 5 mM estimula la formación de biofilm dependiente de KinD bajo condiciones de laboratorio. Sin embargo, en el mismo trabajo se indica que esa concentración de ácido málico es muy superior a la que se encuentra en la rizósfera. Sobre KinC, no se conoce ninguna señal activadora y solo está reportado el efecto inhibitorio del potasio sobre la misma (Chen y col., 2012).

Mientras que KinA y KinB son particularmente importantes para la entrada en la esporulación, KinC y KinD contribuyen al gatillado de la formación de biofilms (McLoon y col., 2011).

De esta manera, durante los estadios iniciales de la formación del biofilm, los bajos niveles de Spo0A-P serían suficientes para el desarrollo del biofilm formado por acción directa de KinC mientras que los niveles elevados de formación de Spo0A-P, necesarios para el inicio de la esporulación, que se encuentran bajo el control del "phosphorelay" son inhibidos por la acción de KinD.

Una vez que el biofilm llegó a etapas avanzadas de su desarrollo, por ejemplo al constituirse la matriz extracelular del mismo, uno de sus componentes principales, el exopolisacárido, directa o indirectamente, inhibiría

la actividad fosfatasa de KinD sobre Spo0F-P y/o KinA-P / KinB-P lo cual, permitiría ahora la formación de esporas dentro de la estructura del biofilm maduro (McLoon y col., 2011).

La actividad de KinA además está sujeta a inhibición por otras dos proteínas: Sda y KipI (Figura 4). Ambas proteínas se unen a KinA, por lo tanto bloqueando su autofosforilación. La síntesis de Sda es inducida en respuesta al daño de ADN, evitando la esporulación si la replicación del cromosoma está desmejorada. La producción de KipI parece estar conectada a la disponibilidad de sustancias nitrogenadas (Wang y col., 1997; Cunningham y col., 2009).

La actividad de KinB también es influenciada por la interacción con otras proteínas. Sda además de inhibir KinA también inhibe la autofosforilación de KinB. Para ser funcional KinB requiere de la presencia de la lipoproteína KapB y se ha sugerido que forman un complejo en la membrana citoplasmática (Dartois y col., 1997).

Por otro lado, las células que activan Spo0A en respuesta a limitación de nutrientes producen auto-toxinas, entre ellas están el factor de muerte ("killing factor") y una proteasa retardadora de la esporulación ("sporulation delay factor") que matan a sus células hermanas las cuales no habían aún activado a Spo0A, esto se conoce como canibalismo (López y col., 2009-a). Las células que exhiben canibalismo están retrasadas en esporulación. Se piensa que esto ocurre porque la liberación de nutrientes de las células muertas retrasa la esporulación por revertir o hacer más lenta la activación masiva de Spo0A en las células que están produciendo las auto-toxinas. La proteasa retardadora de la esporulación y el factor de muerte son producidas por los operones *sdp* y *skf* respectivamente. Ambos operones están bajo el control indirecto de Spo0A vía AbbA y AbrB.

Además, Spo0A-P se une directamente y activa el promotor *skf* a bajos niveles y actúa como un represor directo a altos niveles (Banse y col., 2011). La sub-población de células que producen estas toxinas son las mismas que producen la matriz extracelular del biofilm y mantienen las células unidas. Adicionalmente, esta sub-población de células se genera en respuesta a antimicrobianos producidos por otros microorganismos, lo cual podría constituir

un mecanismo de defensa que protegería a *B. subtilis* de la acción de antibióticos en la naturaleza (López y col., 2009-a; Kovács, 2014).

Sin embargo, cuando todos los mecanismos de supervivencia fallan el phosphorelay se desbloquea, los niveles de Spo0A-P sobrepasan el umbral de activación, comienza la esporulación. Las células que comienzan a esporular ya no se dividen simétricamente para dar origen a dos células hijas indistinguibles (ciclo vegetativo), sino que las células que empiezan a esporular se dividen asimétricamente. La división polar desencadena una expresión génica temporal y espacialmente dirigida. La esporulación comienza al final del crecimiento exponencial de la bacteria y comprende un proceso irreversible. Así que, una vez iniciado el proceso (una vez formado el septum polar) la célula debe seguir hasta el final o morir en el intento de formar una spora (Stragier y Losick, 1996).

El mecanismo de control de la expresión génica durante la esporulación está gobernado por la acción sucesiva de cuatro factores sigma ( $\sigma^F$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^G$ ,  $\sigma^K$ ). En estadios tempranos cuando ambos compartimientos, la célula madre y la pre-espora, coexisten uno al lado del otro, la transcripción génica es controlada por  $\sigma^F$  en la pre-espora y  $\sigma^E$  en la célula madre. Una vez que la pre-espora queda libre en el citoplasma de la célula madre después de ser engullida,  $\sigma^F$  y  $\sigma^E$  son reemplazados por los factores sigma tardíos  $\sigma^G$  y  $\sigma^K$  respectivamente (De Hoon y col., 2010). Esta activación es compartimentalizada y siempre requiere una señal proveniente del compartimiento opuesto. La cascada de comunicación célula-célula que se genera garantiza la sincronización del proceso de diferenciación de la pre-espora y de la célula madre (Higgins y Dworkin., 2012).

### **La germinación**

La germinación de las esporas bacterianas en la naturaleza está usualmente conducida por nutrientes llamados germinantes que son de bajo peso molecular y relativamente específicos para cada especie. Éstos incluyen aminoácidos, derivados de purinas y azúcares. Proteínas específicas del coat

## *Introducción*

facilitan el pasaje de estos germinantes exógenos a través de la membrana externa de la espora (Setlow, 2003; Paredes-Sabja y col., 2011).

La germinación generalmente comienza cuando receptores de germinantes reconocen sus afines e inician una serie de eventos biofísicos. Estos incluyen el movimiento a través de la membrana de cationes monovalentes ( $H^+$ ,  $Na^+$  y  $K^+$ ) y la liberación del depósito de ácido dipicolínico, DPA, presente en la espora en una relación 1:1 con cationes divalentes en especial  $Ca^{++}$  ( $Ca^{++}$ -DPA).

El remplazo del DPA por agua provoca un incremento en la hidratación de la zona del nucleoide y causa, una disminución de la resistencia al calor seco, si bien este incremento de la actividad acuosa no es suficiente aún para la movilidad de las proteínas y para la acción de las enzimas en el citosol de la espora. La liberación de DPA conduce a la hidrólisis del córtex de la espora, esta degradación remueve la restricción física de la expansión del citosol permitiendo así completar la germinación. Luego, se produce una hinchazón del citosol de la espora por absorción de más agua y se expande la pared celular germinante. Sólo después de este incremento adicional en la hidratación del citosol, vuelve a hacerse efectiva la movilidad de las proteínas permitiendo la acción de las enzimas pre-existentes en la espora (Setlow, 2003; Paredes-Sabja y col., 2008; Paredes-Sabja y col., 2011).

Estos eventos se llevan a cabo sin el consumo de energía metabólica detectable. El inicio de la actividad de las enzimas en el citosol es seguido de la síntesis de macro-moléculas que convierte la espora germinativa en una célula en crecimiento (outgrowth) (Setlow, 2003).

Además, durante la germinación y antes de reanudar el crecimiento se reanudan la síntesis de ATP y el metabolismo oxidativo, el daño del ADN es reparado y las SAPS que acomplejaban el ADN son degradadas, lo que genera una fuente de aminoácidos para la obtención de nitrógeno y energía (ATP) para la célula (Moir y col., 2002; Setlow, 2003).

Adicionalmente a los nutrientes, la espora también puede germinar mediante agentes que incluyen lisozimas, altas presiones y surfactantes catiónicos.

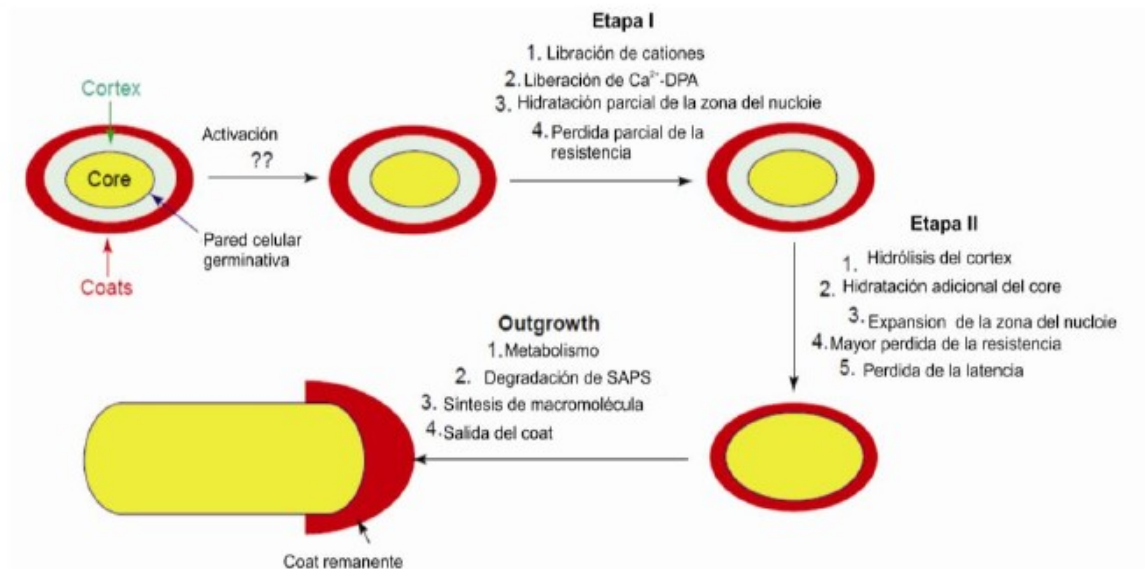


Figura 6: Eventos de la germinación de *B. subtilis*. (Setlow, 2003).

Las esporas de *Bacillus* como ya mencionamos se pueden encontrar en suelos, arena y agua así como en el aire, incluso pueden entrar en el sistema gastrointestinal de los animales y el hombre mediante la ingestión de comida, por ejemplo.

En el laboratorio, las esporas de *Bacillus* son preparadas de manera relativamente sencilla cultivando las bacterias generalmente a 37 °C en un medio líquido para esporulación (Nicholson y col., 2000). Sin embargo, poco se conoce sobre las condiciones de crecimientos, esporulación y germinación de *Bacillus* en la naturaleza. El crecimiento de las bacterias formadoras de esporas en la naturaleza generalmente es más lento, probablemente tiene lugar en microcolonias sobre o dentro de substratos sólidos, está sujeta a variaciones en la temperatura, radiación incidente, nutrientes, agua, etc. y probablemente ocurre en competición directa con otros macro o microorganismos. (Nicholson y col., 2000).

## **La movilidad**

El movimiento bacteriano sobre las superficies es una herramienta que utilizan las bacterias para migrar, adherirse y dispersarse sobre distintas superficies tanto bióticas como abióticas. La movilidad bacteriana ha sido objeto de estudio debido su relación con la capacidad de distintas cepas patógenas para colonizar un hospedador. Pero la misma es necesaria para la interacción beneficiosa planta-bacteriana. Esta característica le permite al microorganismo desplazarse hasta la zona de la raíz, donde puede colonizarla y formar biofilms, aumentando esta interacción, y así evitar la colonización por algún fitopatógeno (Ongena y Jacques, 2008). De la misma manera, se puede pensar esta interacción para el caso de *Bacillus* probióticos donde la unión se daría en regiones preferenciales de la mucosa gastrointestinal humana. (Sanders, 2003) (Vidyalaxma y col., 2014).

Independientemente del mecanismo de movilidad que utilicen, la mayoría de los microorganismos usan un sistema sensorial complejo que controla el movimiento en respuesta a la estimulación y eso los ayuda a migrar hacia ambientes más óptimos (Harshey, 2003; Jarrell y col., 2008). Además, durante su translocación las bacterias secretan polisacáridos y pequeñas moléculas que forman parte fundamental de la formación del biofilm y que promueven tanto la adhesión bacteriana, la comunicación y el movimiento.

Las bacterias se mueven por diversos mecanismos a través de líquidos o superficies húmedas. Hasta el momento se han identificado y caracterizado, en diversos géneros bacterianos, al menos cinco tipos distintos de movimientos: swimming, swarming, gliding, twitching y sliding. Los movimientos pueden involucrar apéndices, como los flagelos que giran (swimming y swarming), pili que empujan (twitching) o "piernas" (gliding) en los micoplasmas que "caminan". Otras estructuras internas, tales como el citoesqueleto y vesículas de gas, están involucrados en ciertos tipos de movimientos.

Muchos estudios han permitido comprender acerca de las cuatro primeras formas de movilidad. Se sabe que sólo el swimming y swarming están relacionados con la presencia de flagelos mientras que se ha demostrado

## Introducción

que el twitching requiere del pili tipo IV, al igual que ciertos tipos de gliding. Sin embargo poco se conoce sobre el mecanismo del sliding, el cual se ha considerado como un tipo de movimiento "pasivo".

El swimming de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* constituye un movimiento en medio líquido y, en el caso de estas dos cepas, ha sido estudiado con gran detalle en las últimas décadas. Típicamente, entre cinco y ocho flagelos peritricos se encuentran sobre la superficie celular y cada uno es impulsado por un motor en su base. El motor actúa como un dispositivo de rotación reversible, utilizando el potencial transmembrana de protones (fuerza motriz de protones) como la fuente de energía. Cada flagelo se compone de un filamento helicoidal largo, una estructura curvada corta llama gancho (hook), y un cuerpo basal que consiste en una varilla central y varios anillos. El cuerpo basal está "incrustado" en la superficie celular, mientras que el gancho y el filamento son externos a la célula. El filamento flagelar constituye normalmente una hélice de longitud variable. La rotación del motor provoca una onda helicoidal para ejercer un movimiento que empuja a la bacteria. La red de transducción de señales de quimiotaxis modula el cambio entre los giros del motor tanto a la derecha como a la izquierda, determinando de esta manera una trayectoria en el desplazamiento. En un entorno constante una célula normalmente "nada" en un paseo aleatorio (Henrichsen y col., 1972).

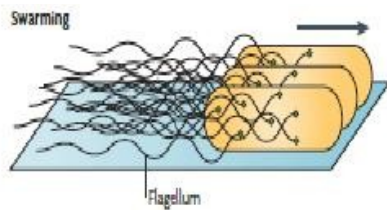
Mientras que el swarming representa un comportamiento individual, el swarming constituye un comportamiento social, son las bacterias moviéndose como grupo. Hauser y col., describieron por primera vez el movimiento tipo swarming de *Proteus* en 1885. Desde entonces se ha demostrado que es un movimiento generalizado entre las bacterias flageladas, lo que sugiere que este modo de translocación sobre superficie debe desempeñar un papel importante en la colonización de ambientes naturales por microorganismos ya que está ampliamente conservado en distintos tipos de géneros bacterianos. En el laboratorio la concentración del agar utilizado para el medio es crítico para el swarming, debe rondar entre 0,5% y 0,8%, probablemente debido a que es necesario un cierto nivel de humedad para poder llevar a cabo este movimiento. Además, se necesitan más flagelos para el swarming sobre una

superficie, el cual es mayor que el necesario para el nado en medio líquido, tal vez debido a la fricción superficial o a la mayor viscosidad. Sin embargo, ciertas bacterias tienen sólo un flagelo que se usa tanto para el swimming o el swarming y algunas especies tienen flagelos diferentes para los dos tipos de movilidad. El crecimiento de una colonia bacteriana que se encuentra realizando swarming conduce a una diferenciación de las células vegetativas que componen la colonia.

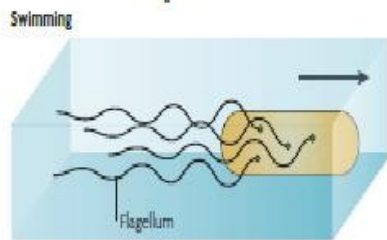
El Twitching se definió originalmente como un movimiento intermitente y desigual realizado predominantemente por las células individuales. Esta forma de la motilidad se produce en una amplia variedad de bacterias, requiere una superficie húmeda, y permite a las células moverse hacia adelante y hacia atrás a velocidades de unas pocas décimas de micrómetro por segundo. Se propone que este movimiento se da por la extensión y retracción activo del pili tipo IV, que por lo general se encuentran en uno o ambos polos celulares (Henrichsen y col., 1972).

El gliding se define como un movimiento suave de las células, generalmente a lo largo del eje longitudinal de la célula. Este tipo de movilidad se presenta en diversos tipos bacterianos con ser mixobacterias y cianobacterias. En *M. xanthus* esta forma de movilidad también se conoce como la motilidad de aventura. Los bordes de avance de estas bacterias deslizantes parecen similares a los de swarming y el twitching. Se han propuesto muchos modelos diferentes para explicar la movilidad tipo gliding, incluyendo la propulsión por transporte de macromoléculas tales como polisacáridos, movimiento de los componentes de la membrana externa por complejos de proteínas en la membrana citoplasmática, así como la contracción de las fibrillas en las paredes celulares. Sin embargo, no hay evidencia clara de apoyo cualquier modelo específico, y es posible que varios mecanismos diferentes estén involucrados. Los micoplasmas son bacterias parasitarias que carecen de la capa de peptidoglicano. Muchos de ellos tienen una polaridad celular distinta y se deslizan sobre el vidrio y otras superficies sólidas. Se proponen orgánulos de fijación que sobresalen de la membrana

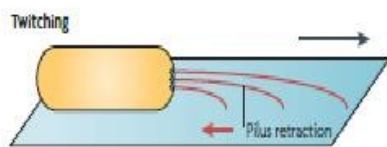
alrededor de los "cuellos" de estas bacterias para jugar un papel en la movilidad de deslizamiento (Islam y col., 2015).



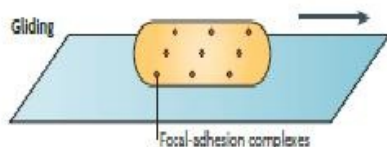
**Swarming:** Es un movimiento multicelular y coordinado de las bacterias a través de las superficies y es accionado por flagelos helicoidales.



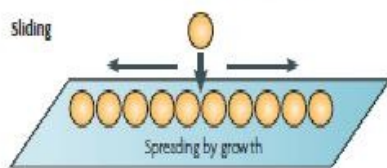
**Swimming:** Es el movimiento de bacterias individuales en medio líquido, generalmente impulsado por rotación de flagelos.



**Twitching:** Es un movimiento individual o social sobre superficies de las bacterias, accionado por extensiones de pili, que "ataca" las superficies y consecutivamente se contrae, impulsando la célula cerca del sitio que atacó.



**Gliding:** es un movimiento individual o social "activo" sobre la superficie que no requiere ni flagelos ni pili que involucra complejos de adhesión focal y complejos proteicos de membrana que se



deslizan sobre la superficie.

**Sliding:** es una translocación "pasiva" social o colectiva, sobre la superficie que sería impulsada por el crecimiento cooperativo de las células y facilitada por la producción de surfactante.

Figura 7: Distintas formas de movilidad. (Jarrell y col., 2008).

¿Cómo se mueven las bacterias de un lugar a otro en nichos naturales? La mayoría de las bacterias son capaces de nadar en los ambientes acuáticos impulsadas por la rotación de los flagelos, pero además, hay una gran variedad de mecanismos, como los mencionados anteriormente, que han evolucionado y

han sido seleccionadas para facilitar la movilidad de las bacterias sobre superficies (Calvio y col., 2005).

Aunque los mecanismos de swarming, twitching, y gliding han sido ampliamente estudiados, poco se sabe sobre el mecanismo de sliding, su regulación y su importancia. Desde su definición original, hace más de cuatro décadas, el concepto de deslizamiento como una translocación pasiva de superficie impulsado por fuerzas expansivas en la colonia no ha variado mucho. (Henrichsen y col., 1972) Sin embargo, el sliding representa un mecanismo ampliamente utilizado por diferentes agentes patógenos de importancia mundial (*Bacillus anthracis*, *Salmonella entérica*, *Staphylococcus aureus*; *Legionella pneumophila* y *micobacterias*) (Shrout, 2015; Park y col., 2015)

Diferentes cepas de *B. subtilis* silvestres (wt) y no domesticadas tienen efectos beneficiosos estimulantes del crecimiento sobre las plantas (Ongena y Jacques, 2008) y los animales, así como efectos probióticos en seres humanos (Sanders, 2003; Vidyaxma y col., 2014). Si la capacidad de formar biofilms y el movimiento activo sobre superficies son antagónicos, y a su vez atributos importantes de una bacteria, ¿cómo es entonces que se toma la decisión colectiva de moverse sobre o permanecer unido a una superficie? Esta es una pregunta básica, pero de gran importancia que trataremos de contestar durante el desarrollo de este trabajo de Tesis.

### **Regulación de la matriz extracelular y formación de biofilms.**

Los biofilms son agregados organizados y multicelulares de bacterias. Aunque las especies bacterianas tienen diferentes estructuras y tipos de regulación de la formación del biofilm, la mayoría de los biofilms bacterianos comparten tres propiedades en común. La primera es que los biofilms están estabilizados por una matriz extracelular compuesta de varias combinaciones de polisacáridos, proteínas y ADN. Segundo, las células pierden la movilidad flagelar (si la presentan) cuando entran al estado del biofilm. Tercero, una serie compleja de proteínas regulatorias gobierna la transición del estado

planctónico a la formación del biofilm (Kolter y Greenberg, 2006; Vlamakis y col., 2013).

En el laboratorio, los biofilms de *B. subtilis* se manifiestan como películas que flotan por encima del líquido o como colonias de una arquitectura compleja que crecen por encima de superficies sólidas. Estos biofilms son estabilizados por una matriz extracelular ensamblada por dos componentes estructurales: un polisacárido extracelular (EPS) de naturaleza aún no definida y la proteína TasA (Branda y col., 2006). El EPS es ensamblado por enzimas codificadas dentro del operón *epsA-O* de 15 genes, de los cuales 14 codifican para proteínas requeridas para la biosíntesis del exopolisacárido. La proteína TasA es codificada por el miembro terminal o distal del operón *yqxM*. Este operón también codifica para la peptidasa señal SipW requerida para la secreción de TasA y la proteína YqxM (actualmente denominada TapA) requerida para la localización de TasA en la matriz extracelular (Winkelman y col., 2009). Las células incapaces de sintetizar tanto EPS como TasA producen películas frágiles y colonias con una textura lisa, es decir son defectivas en la formación de biofilms líquidos y sólidos, respectivamente.

La proteína reguladora maestra SinR se une a estos promotores y reprime la expresión de los operones *eps* y *yqxM* (Kearns y col., 2005). La desrepresión de la formación de biofilms es compleja y muchos reguladores actúan en un camino por debajo de SinR (Chu y col., 2006).

El camino comienza cuando el factor sigma alternativo de la ARN polimerasa SigH, cuyo gen es reprimido por AbrB, es activado en la entrada a la fase estacionaria cuando los niveles del represor disminuyen, para dirigir la expresión del regulador maestro de la esporulación Spo0A. El regulador Spo0A es activado a un bajo nivel por fosforilación, el cual depende, aparentemente, de la quinasa KinC de una manera independiente del phosphorelay, y KinD actuaría como fosfatasa de Spo0F-P bloqueando la esporulación. Spo0A-P, a su vez, reprime la expresión del represor de la formación del biofilm AbrB (este reprime la formación del biofilm por represión de la expresión del promotor  $P_{yqxM}$ ) y activa la expresión de una proteína pequeña llamada SinI en una subpoblación de células. SinI se une directamente a SinR para antagonizar la

unión de SinR al ADN y de este modo disminuir la represión de los operones involucrados en la formación del biofilm (Kearns y col., 2005; Winkelman y col., 2009). Estos reguladores están integrados de tal forma de asegurar que el accionar de SinR sea temporal y espacialmente controlado dentro de la estructura tridimensional del biofilm (Vlamakis y col., 2008).

Dos reguladores de la formación de biofilms, SlrR y EpsE, actúan por debajo del control de SinR. SlrR es requerida para la máxima expresión del operón *yqxM*. La expresión del gen que codifica a SlrR es reprimida por SinR (Kobayashi y col., 2012).

Por otro lado, EpsE es una proteína homóloga a glicosil transferasa codificada dentro del operón *eps* que inhibe la movilidad de la bacteria actuando de manera semejante a un embrague flagelar. EpsE interactúa sobre los componentes del motor flagelar (FliG) y desconecta el rotor de la fuente de poder, por lo tanto evitando la rotación flagelar (Blair y col., 2008). La inhibición de la movilidad por EpsE podría estabilizar la estructura del biofilm. De tal manera que, las células mutantes en *sinR* están hiper-agregadas por des-represión constitutiva de los operones que codifican los componentes que forman la matriz del biofilm (Kearns y col., 2005), y además no son móviles debido a la desrepresión de la proteína EpsE (Winkelman y col., 2009).

Además de los operones *yqxM* y *eps*, otros genes y operones han sido descritos como involucrados en el desarrollo propio del biofilm (Kovács y Kuipers, 2011). Entre ellos los genes *yuaB* (*bsIA*) e *yvcA* fueron identificados a través de análisis del rol de DegU-P, el cual activa la transcripción de ambos, los cuales son necesarios para el desarrollo del biofilm (Verhamme y col., 2009). DegU es un regulador de respuesta que necesita ser fosforilado por DegS (su quinasa sensora asociado) para activar la formación del biofilm.

A su vez, *bsIA* e *yvcA* son regulados negativamente a nivel transcripcional por AbrB y SinR, respectivamente. El primero de ellos actúa a través de la unión directa del mismo a sus promotores, y el segundo actúa indirectamente a través de la síntesis del exopolisacárido; este último (EPS) estimula la síntesis de ambos genes (Verhamme y col., 2009).

BslA es una proteína pequeña secretada que se localiza en la pared celular y que funciona sinérgicamente con los componentes de la matriz del biofilm para facilitar el ensamblaje de los mismos (Ostrowski y col., 2011).

Las proteínas que regulan la expresión de los genes de la matriz del biofilm en *B. subtilis* indirectamente nos indican sobre el tipo de estimulación medioambiental que controla la formación del biofilm. Por ejemplo, en fase estacionaria proteínas tales como SigH y Spo0A son parte de un camino que involucra la represión de AbrB y SinR o la des-represión de los operones *yqxM* y *esp*, y los genes *bslA* e *yvcA*, e indican que señales como el hambreado y la alta densidad celular juegan un rol importante en la estimulación de la formación del biofilm (Kearns y col., 2005).

### **Multicelularidad.**

Dos estudios independientes (Branda y col., 2001; Hamon y Lazazzera, 2001) reportaron por primera vez la capacidad de *B. subtilis* de desplegar estrategias de multicelularidad tales como la formación de biofilms y cuerpos fructíferos, las cuales mostraron estar bajo el control del regulador maestro Spo0A, mientras que el desplazamiento comunitario como el swarming está asociado a la presencia de flagelo y es independiente de Spo0A.

La multicelularidad es una de las innovaciones evolutivas más prevalentes (Lyons y Kolter, 2015). Debido a su accesibilidad experimental y una amplia y basta variedad de datos genómicos disponibles, las bacterias nos permiten estudiar los aspectos fundamentales de los orígenes de multicelularidad.

Para dar lugar a un organismo multicelular o comportamiento multicelular se debe cumplir con dos premisas básicas: adhesión célula-célula para formar una nueva unidad evolutiva, y la comunicación intercelular que conduce a la actividad coordinada.

Muchos ejemplos de especies y ciclos de vida ponen esta definición de multicelularidad a prueba. Los principales son los ejemplos que provienen del dominio bacteriano. Considerado durante mucho tiempo como los organismos unicelulares arquetípicos, las bacterias se han vuelto populares como sistemas modelo ideal para explorar este fenómeno. La multicelularidad bacteriana es

mucho más sencilla de estudiar en el laboratorio, debido a que son ejemplos sencillos de esta innovación evolutiva. El estudio de ejemplos simples u orígenes alternativos nos permite llegar a la esencia de lo que permite a los avances evolutivos fundamentales, con el fin de intentar comprender modos evolutivos más complejos. Por lo tanto, la multicelularidad bacteriana se abre a cuestionar seriamente los grandes temas sobre qué fuerzas selectivas conducen a los seres a comportarse de manera multicelular, las bases genéticas y su historia evolutiva, y por qué este salto en particular en el nivel de organización es tan recurrente.

Hay tres clases muy generales de comportamiento pluricelular en bacterias. El primero se compone de bacterias filamentosas, que son largas cadenas de células unidas de extremo a extremo que a menudo comparten un periplasma o incluso citoplasma. Los miembros más estudiados de esta clase son las cianobacterias y los actinomicetos, pero se han encontrado numerosos ejemplos de otras especies capaces de formar filamentos (Justice y col., 2008; Flores y Herrero, 2010). Los filamentos pueden formar capas lineales o ramificadas, individuales o múltiples, y se derivan de un origen clonal. Los microbios filamentosos fueron probablemente los primeros organismos con propiedades multicelulares en la Tierra ya que es el primer ejemplo conocido de diferenciación celular y data de hace unos 3000 millones de años. (Amard y col., 1997; Srivastava, 2005).

Otra clase de bacterias capaces del comportamiento multicelular incluye a aquellas que se ensamblan como un organismo multicelular a través de la agregación. Estos agregados incluyen la formación de biofilms y el swarming, y también se encuentran en todo el dominio bacteriano. Esta clase de multicelularidad no es mutuamente excluyente con la primera clase, sino que está ampliamente distribuido dentro del mundo bacteriano. Los biofilms han sido muy bien caracterizados en las últimas décadas debido a su papel en la producción de enfermedades y pueden ser el marco principal en el que existen muchas bacterias en la naturaleza (López y col., 2009-a; Vlamakis y col., 2013). Algunas especies incluso forman estructuras complejas similares a las que forman los hongos y cuerpos fructíferos que contienen esporas que

funcionan como una especie de línea germinal (Goldman y col., 2007). Como el nombre de esta categoría indica, estos organismos forman a través de la agregación de muchas células que se mantienen juntas a través de una matriz extracelular compuesta por lo general de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos (Flemming, 2010), mientras que las células en swarming también pueden estar unidos por sus numerosos flagelos. Debido a que estas estructuras están formadas por agregación, estos grupos no tienen por qué ser clonales lo que lo hace más atractivo para el estudio evolutivo y sobre como es posible el mantenimiento de la cooperación, el altruismo y el mutuo reconocimiento (West y col., 2006). A pesar de los problemas asociados con la agregación no clonal, su prevalencia puede deber en parte a las ventajas que implica la variabilidad genómica.

La tercera clase de comportamiento bacteriano multicelular es la menos estudiada, esta clase de bacterias es la única verdaderamente obligada a la multicelularidad reportada hasta el momento. Este grupo se conoce como los procariotas magnetotácticas multicelulares (MMP), llamadas así porque casi todos los ejemplos descubiertos son en bacterias magnetotácticas. Estas MMPs, son delta-proteobacterias aisladas por todo el mundo, y tienden a ser esferas o elipsoides de 5-10  $\mu\text{m}$  de diámetro que contiene aproximadamente 20-60 células (Abreu y col., 2006; Abreu y col., 2007; Chen y col., 2015). Las células poseen forma de tetraédricas y están dispuestos en una sola capa con su base expuesta al medio ambiente flagelada y sus extremos más estrechos hacia adentro creando una cavidad hueca similar a la formada por las algas *Volvocaceae*. Por microscopía electrónica de las células de un MMP parecen estar conectadas por uniones intercelulares estrechas similares a epitelios de animales (Abreu y col., 2014). El desprendimiento de las células individuales conduce a la pérdida de la movilidad, lo que sugiere que estos organismos sólo pueden funcionar como una unidad multicelular. Los MMP son el único organismo conocido de una bacteria sin fase unicelular en su ciclo de vida, sin embargo muy poco se conoce acerca de su ciclo de vida.

Las ventajas de la pluricelularidad son numerosos, algunos ejemplos que se pueden mencionar son resistencia a las tensiones físicas y químicas, la

mejora en la adquisición de los recursos, la protección contra la depredación, la colonización más eficiente de los nuevos territorios, mayor probabilidad de supervivencia en los conflictos intermicrobiales y la oportunidad para la diferenciación celular y por lo tanto la especialización entre los diferentes tipos de células. Muchos de estos beneficios surgen principalmente de la adhesión física de las células para crear una unidad más protegida y más grande. La resistencia a las tensiones ambientales parece ser la ventaja más común que poseen las bacterias multicelulares. La lista de desafíos físicos-ambientales contra el cual la pluricelularidad proporciona una defensa es larga y variada incluyendo la temperatura, el pH, presión osmótica, la oxidación, la desecación, la toxicidad de metales, y las fuerzas mecánicas. La matriz extracelular es responsable de gran parte de esta resistencia, pero gran parte de la eficacia de la matriz puede ser consecuencia de sus orígenes comunes, una población de células individuales de manera coordinada secretan esta matriz. La evolución de pluricelularidad como una respuesta al estrés es una idea atractiva e intrigante, ya que la coloca en una categoría compartida con otros avances evolutivos significativos. Por ejemplo, la meiosis en eucariotas puede haber sido originalmente una respuesta a las condiciones adversas o aumentos accidentales en ploidía. Del mismo modo el ADN, las enzimas de recombinación que evolucionaron para reparar daños fueron cooptados para compartir genes de ADN y de orden aleatorio dentro de una población, lo que acelera considerablemente la tasa de evolución.

Los organismos multicelulares también son más aptos en la utilización de nutrientes. En las bacterias depredadoras, el desplazamiento coordinado en swarming hace que las células sean más eficientes al capturar y consumir presas, otras células que se encuentren solitarias.

Otra fuerza selectiva fuerte con un efecto directo sobre la supervivencia multicelular de los organismos unicelulares es la depredación, tanto en las relaciones clásicas entre depredadores y presas, así como la fagocitosis por las células del sistema inmune del hospedador. Muchos estudios han encontrado que las bacterias filamentosas pueden sobrevivir intracelularmente una vez

fagocitadas. Además, *Streptomyces coelicolor actinobacterium* sufre desarrollo multicelular tras la exposición al depredador *Myxococcus xanthus*.

La última ventaja de la pluricelularidad es una de las razones de que este fenómeno sea muy interesante de estudiar: la especialización celular que ofrece la diferenciación. La división del trabajo (van Gestel y col., 2015), ya sea dentro de un organismo o una sociedad, conduce a una producción más eficiente y la utilización de los recursos. El ejemplo clásico de esto viene de los filamentos formados por la cianobacteria *Anabaena*, que puede llevar a cabo tanto la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno. Debido a la incompatibilidad química de estos dos procesos, esta cianobacteria los debe separar espacialmente en células especializadas para cada propósito. Un ejemplo aún más extremo es la muerte celular programada que se produce en el desarrollo de muchas bacterias. La muerte de algunas células puede servir a los intereses de la comunidad en general, por ejemplo para proporcionar nutrientes adicionales, crear estructuras elevadas que aumenten la superficie y la exposición a los nutrientes, o para crear propágulos de esporas que tengan mayor probabilidad de dispersarse. Además, la división del trabajo permite que un grupo de células que actúan con un interés común participen en las estrategias que optimicen la supervivencia de la comunidad.

### Objetivos

Esta Tesis se divide en dos partes: una parte netamente aplicada y otra de desarrollo básico.

En la primera etapa el objetivo se centró en el desarrollo de un producto, basado en esporas del género *Bacillus* para aplicar sobre el cultivo al momento del corte o inmediatamente antes del mismo, con el fin de favorecer y acelerar el secado del forraje a ser henificado y que además tenga una vez formado el heno capacidad inhibitoria del desarrollo fúngico. De este modo se espera alcanzar un aumento de la calidad nutricional del heno obtenido, a través de una disminución del período de oreo o deshidratado a campo y del procesamiento con tenores de humedad superiores a los recomendados hasta el momento, sin la amenaza del desarrollo de hongos.

En una segunda etapa, con metas enfocadas en la investigación básica, el objetivo se centró en el estudio del comportamiento multicelular de *Bacillus subtilis*, los cuales podrían contribuir a sus propiedades de biocontrol en el forraje henificado. Entre las distintas propiedades de interés analizaremos la capacidad de desplazarse sobre superficies y proponer un modelo que logre explicar el mecanismo de sliding llevado a cabo por bacterias desprovistas de flagelos.

## Materiales y Métodos.

**3.1. Cepas utilizadas para este trabajo.**

Las tres cepas de *B. subtilis* parentales utilizadas en este trabajo de tesis fueron la cepa domesticada, JH642 usada como cepa de referencia en muchos laboratorios y las dos cepas no domesticadas *B. subtilis*, cepas NCIB3610 (cepa Marburg) y RG4365 (cepa *B. subtilis natto*). Estas cepas, y sus derivados isogénicos (tabla 1), se cultivaron en los medios de cultivos correspondientes para cada ensayo.

Tabla 1: Cepas utilizadas en este trabajo

| Cepa     | Genotipo relevante                   | Fuente                               |
|----------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| JH642    | <i>trpC2 pheA1</i>                   | Kearns y Losick, 2003.               |
| RG4365   | Cepa salvaje.                        | Lombardia y col., 2006               |
| NCIB3610 | Cepa salvaje.                        | Bacillus Genetic Stock Center (BGSC) |
| GP901    | 168 <i>hag::aphA3</i>                | Laboratorio de Jörg Stülke,          |
| RG4387   | Natto <i>hag::aphA3</i>              | GP901—>RG4365                        |
| TB24     | 3610 <i>hag::aphA3</i>               | GP901—>3610                          |
| RG551    | 642 <i>srfAA::cat</i>                | Laboratorio Lazazzera                |
| RG4390   | natto <i>srfAA::cat</i>              | RG551—>RG4365                        |
| RG4391   | 3610 <i>srfAA::cat</i>               | RG551—>3610                          |
| SS995    | $\Delta spo0A::ery$                  | Molle y col., 2003                   |
| RG4370   | natto $\Delta spo0A::ery$            | SS995—>RG4365                        |
| RG4399   | 3610 $\Delta spo0A::ery$             | SS995—>3610                          |
| RG432    | 642 <i>sinR::pheo</i>                | Abee y col., 2011                    |
| RG4373   | natto <i>sinR::pheo</i>              | RG432—>RG4365                        |
| RG4392   | 3610 <i>sinR::pheo</i>               | RG432—>NCIB3610                      |
| RG19148  | 642 <i>spoIIAC::kan</i>              | Molle y col., 2003                   |
| RG4372   | natto <i>spoIIAC::kan</i>            | RG19148—>RG4365                      |
| RG4380   | natto $\Delta spo0A::ery sinR::pheo$ | RG4370—>RG4373                       |
| RG12607  | 642 <i>abrB::spc</i>                 | Molle y col., 2003                   |

*Materiales y Métodos*

|         |  |                                |
|---------|--|--------------------------------|
| RG12617 | natto <i>abrB::spc</i>                                   | RG12607—>RG4365                |
| RG4381  | natto $\Delta spo0A::ery$ <i>abrB::spc</i>               | RG4370—>RG12607                |
| SIK31   | 642 $\Delta spo0A::ery$ $P_{spac}$ - <i>spo0A</i> sd67   | Arabolaza y col., 2003         |
| RG4382  | natto $\Delta spo0A::ery$ $P_{spac}$ - <i>spo0A</i> sd67 | SIK31—>RG4365                  |
| RG4385  | 3610 $\Delta spo0A::ery$ <i>hag::aphA3</i>               | RG4399—>TB24                   |
| AGS207  | 168 <i>tasA::spc</i>                                     | Stöver, 1999                   |
| NRS1502 | 3610 <i>epsG::pBL601</i>                                 | Fujita y Losick, 2005          |
| NRS2097 | 3610 <i>bslA::cat</i>                                    | Fujita y Losick, 2005          |
| TB21    | natto <i>bslA::cat</i>                                   | NRS2097—>RG4365                |
| TB22    | natto <i>epsG::pBL601</i> (spc)                          | NRS1502—>RG4365                |
| TB23    | natto <i>tasA::spc</i>                                   | AGS207—>RG4365                 |
| TB25    | 3610 <i>bslA::cat</i> , <i>hag::aphA3</i>                | NRS2097—>TB24                  |
| TB26    | 3610 <i>epsG::pBL601</i> (spc),<br><i>hag::aphA3</i>     | NRS1502—>TB24                  |
| TB163   | 3610 <i>tasA::spc</i>                                    | AGS207—>NCIB3610               |
| TB228   | 3610 <i>hag::aphA3 tasA::spc</i>                         | ADS207—>TB24                   |
| JH12638 | <i>kinA::ery</i>   | Wang y col., 1997              |
| RG5000  | natto <i>kinA::ery</i>                                   | JH12638—>RG4365                |
| JH19980 | <i>kinB::tet</i>   | Wang y col., 1997              |
| RG5001  | natto <i>kinB::tet</i>                                   | JH19980—>RG4365                |
| BAL393  | <i>kinC::spc</i>   | Laboratorio de B.<br>Lazazzera |
| RG5002  | natto <i>kinC::spc</i>                                   | BAL393—>RG4365                 |
| BAL691  | <i>kinD::cat</i>   | Laboratorio de B.<br>Lazazzera |
| RG5003  | natto <i>kinD::cat</i>                                   | BAL691—>RG4365                 |
| BAL692  | <i>kinE::cat</i>   | Laboratorio de B.<br>Lazazzera |
| RG5004  | natto <i>kinE::cat</i>                                   | BAL692—>RG4365                 |
| RG5005  | natto <i>kinB::tet kinC::spc</i>                         | RG5002—>RG5001                 |
| BAL370  | <i>spo0F::cat</i>  | Laboratorio de B.<br>Lazazzera |
| RG4371  | natto <i>spo0F::cat</i>                                  | BAL370—>RG4365                 |

## Materiales y Métodos

|         |  |                        |
|---------|--|------------------------|
| TB40    | 168 <i>amyE::kinB</i> kan                                    | Este trabajo           |
| TB41    | 168 <i>amyE::kinB(ΔK*)</i> kan                               | Este trabajo           |
| TB42    | 168 <i>amyE::kinB(K*→A)</i> kan                              | Este trabajo           |
| TB43    | 168 <i>amyE::kinC</i> kan                                    | Este trabajo           |
| RG5011  | natto <i>kinB::tet amyE::kinB</i> kan                        | TB40→RG5001            |
| RG5012  | natto <i>kinB::tet amyE::kinB(K*→A)</i> kan                  | TB42→RG5001            |
| RG5013  | natto <i>kinB::tet amyE::kinB(ΔK*)</i> kan                   | TB41→RG5001            |
| RG5021  | natto <i>kinC::spc amyE::kinC</i> (wt)kan                    | TB43→RG5002            |
| RG5051  | natto <i>kinB::tet kinC::spc amyE::kinB(wt)</i> kan          | TB40→RG5005            |
| RG5052  | natto <i>kinB::tet kinC::spc amyE::kinB(K*→A)</i> kan        | TB42→RG5005            |
| RG5053  | natto <i>kinB::tet kinC::spc amyE::kinB(ΔK*)</i> kan         | TB41→RG5005            |
| RG5006  | natto <i>kinA::ery kinB::tet</i>                             | RG5000→RG5001          |
| RG5061  | natto <i>kinA::ery kinB::tet amyE:→&gt;&gt;:kinB(wt)</i> kan | TB40→RG5001            |
| RG5062  | natto <i>kinA::ery kinB::tet amyE::kinB(K*→A)</i> kan        | TB42→RG5001            |
| RG5063  | natto <i>kinA::ery kinB::tet amyE::kinB(ΔK*)</i> kan         | TB41→RG5001            |
| RG12604 | natto <i>amyE::abrB-lacZ</i> cat                             | Lombardía y col., 2006 |

Tabla 2: Cepas bacterianas aisladas para este trabajo.

| <i>Bacillus</i> aislados y seleccionados. |  |   |
|---|--|---|
| HS  | Cepa Heno Silo®.<br><i>Bacillus amyloliquefaciens</i>                  |   |
| PR2                                       | Cepa silvestre.<br><i>Bacillus amyloliquefaciens</i><br>(este trabajo) | <u>Lugar:</u><br><u>Tipo de muestra:</u> heno                               |
| PR33                                      | Cepa silvestre.<br><i>Bacillus subtilis</i> (este trabajo)             | <u>Lugar:</u> Ferrér<br><u>Tipo de muestra:</u> tierra rizosférica          |
| PR39                                      | Cepa silvestre.<br><i>Bacillus amyloliquefaciens</i><br>(este trabajo) | <u>Lugar:</u> Teodelina.<br><u>Tipo de muestra:</u> tierra rizosférica.     |
| PR40                                      | Cepa silvestre.<br><i>Bacillus amyloliquefaciens</i><br>(este trabajo) | <u>Lugar:</u> Alejo Ledesma.<br><u>Tipo de muestra:</u> tierra rizosférica. |

Tabla 3: Cepas fúngicas utilizadas en este trabajo.

| <b>Cepa fúngica</b>             | <b>Procedencia</b>  |
|---------------------------------|---|
| <i>Aspergillus flavus</i>       | Centro de Referencia en Micología (CEREMIC-UNR)<br>(CCC 172-06) |
| <i>Fusarium verticillioides</i> | CEREMIC-UNR (CCC 143-05)  |
| <i>Mucor</i> sp                 | CEREMIC-UNR (CCC 128-09)  |
| <i>Penicillium</i> sp           | CEREMIC-UNR (CCC 129-09)  |
| <i>Sclerotium</i> sp            | Colección del Laboratorio                                       |
| <i>Macrophomina</i> sp          | Colección del Laboratorio                                       |
| <i>Bipolaris</i> sp             | Colección del Laboratorio                                       |
| <i>Coletotrichum</i> sp         | Colección del Laboratorio                                       |

### **3.2. Medios de cultivo y soluciones.**

#### **3.2.1. Medio de Luria-Bertani (LB)**

Medio de enriquecimiento y propagación cuya composición en gramos por litro es la siguiente:

|                        |          |
|------------------------|----------|
| Peptona de carne       | 10,0 g/L |
| Extracto de levadura   | 5,0 g/L  |
| NaCl                   | 5,0 g/L  |
| Medio sólido: Con agar | 15,0 g/L |

#### **3.2.2. Medio Luria-Bertani con extracto de levadura (LBY)**

Medio rico para estimular la formación de biofilm. Su composición es la siguiente:

|                        |          |
|------------------------|----------|
| Peptona de carne       | 10,0 g/L |
| Extracto de levadura   | 45,0 g/L |
| NaCl                   | 5,0 g/L  |
| Medio sólido: Con agar | 15,0 g/L |

#### **3.2.3. Medio de esporulación (SM)**

Medio utilizado para obtener un alto rendimiento de esporas de *Bacillus*. La composición de este medio en gramos por litro es la siguiente:

|                                      |          |
|--------------------------------------|----------|
| Nutrient Broth Difco                 | 8,0 g/L  |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0,25 g/L |
| KCl                                  | 1,0 g/L  |

Después de su esterilización se agregan las siguientes soluciones salinas previamente esterilizadas por separado: 1 mL de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1 mM), 1mL de MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (10 mM) y 1 mL de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (1 M) por cada litro de medio.

### **3.2.4. Medio de crecimiento de cepas fúngicas (PDA)**

El agar de papa y dextrosa es el medio más utilizado para el crecimiento de hongos y levaduras que atacan a las plantas vivas o materia vegetal muerta en descomposición. Para prepararlo se deben pesar 300 g de papas por cada litro de medio de cultivo. Estas se cortan en trozos pequeños y se las hacen hervir durante media hora, luego se cuelean y se reserva el líquido. Por último, se suplementa con 20 g de dextrosa. A este medio, se le adicionan antibióticos o ácidos para inhibir el crecimiento bacteriano, en caso de ser necesario. Además se suplementa con el agregado de EDTA 1 mM, usado para realizar recuentos de colonias fúngicas, puesto que de esta manera se limita la propagación de la colonia.

### **3.2.5. Sales Spizizen (SPI)**

Medio base salino, para una concentración 10X:

|   |           |
|---|-----------|
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 20,0 g/L  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | 140,0 g/L |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 60,0 g/L  |
| Citrato de sodio                                | 10,0 g/L  |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O            | 2,0 g/L   |

### **3.2.6. Antibióticos**

Los antibióticos empleados fueron preparados según se describe en Maniatis y col. (1982).

|                         |           |
|-------------------------|-----------|
| Eritromicina (Ery)      | 1 µg/mL   |
| Kanamicina (Kn)         | 2 µg/mL   |
| Fleomicina (pm)         | 0,1 µg/mL |
| Espectinomomicina (spc) | 100 µg/mL |
| Tetraciclina (Tc)       | 10 µg/mL  |
| Cloranfenicol (Cm)      | 5 µg/mL   |

### **3.2.7. Medios de crecimiento para transformación de *B. subtilis***

GMI:

|                      |            |
|----------------------|------------|
| Glucosa              | 0,5 % V/V  |
| Casamino-ácidos      | 0,02 % P/V |
| Extracto de levadura | 0,01% P/V  |

Fenilalanina 0,5 µg/mL

Triptófano 0,5 µg/mL

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 5 mM

Sales Spizizen 10X 1X

GMI:

Glucosa 0,5 % V/V

Casamino-ácidos 0,02 % P/V

Fenilalanina 0,005 µg/mL

Triptófano 0,005 µg/mL

MgSO<sub>4</sub> 5 mM

Sales Spizizen 10X 1X

El uso de los aminoácidos Triptofano y Fenilalanina es para la transformación de la cepa JH642, la cual posee esas auxotrofías.

### **3.2.8. Solución TE**

Tris-HCl (pH=8) 10 mM

EDTA (pH=8) 1 mM

### **3.2.9. Solución T.A.E.**

Tris-HCl (pH=8) 10 mM

Acetato 1 mM

EDTA (pH=8) 1 mM

### **3.2.10. Solución de siembra 10x de ADN en geles**

Azul de bromofenol 0,25% P/V

Xilene-cyanol 0,25% P/V

Glicerol 30% V/V

### **3.2.11. Medio para determinar la actividad $\beta$ -galactosidasa**

Buffer Z

|  |                                  |
|--|----------------------------------|
| Fosfato ácido de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )   | 0,06 M                           |
| Fosfato diácido de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) | 0,04 M                           |
| Cloruro de potasio (KCl)                               | 0,01 M                           |
| Sufato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ )                 | 0,001 M                          |
| $\beta$ -mercapto-etanol                               | 0,05 M                           |
| ONPG   | 4,5mg/mL de $\text{H}_2\text{O}$ |

### **3.2.12. Medios de germinación de esporas de *Bacillus***

Tabla III.4: AFGK:

|                |            |
|----------------|------------|
| Alanina        | 10 mM      |
| Glucosa        | 0,5 % V/V  |
| Fructosa       | 0,02 % P/V |
| Buffer Tris-Cl | 10 mM      |
| KCl            | 10 mM      |

### **3.3. Condiciones de crecimiento.**

Los cultivos en medios líquidos de *Bacillus* fueron crecidos inoculando 4 o 5 colonias aisladas desde medio sólido (previamente inoculado desde congelado) a erlenmeyers de 250 mL con 30 mL de medio de cultivo, y colocados en agitador a 210 rpm, para permitir una buena aireación, a la temperatura de 37° C. Los cultivos en medio sólido o semisólido fueron crecidos en estufa (37° C).

### **3.4. Mantenimiento de las cepas bacterianas.**

Para la preservación de las cepas bacterianas se procedió a crecerlas en un medio rico (LB o SM) hasta una densidad óptica alta ( $\text{D.O.}_{525\text{nm}} \sim 1,2-1,8$ ).

Luego se las congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$ , empleando glicerol a una concentración final 15 % (V/V) como agente crioprotector.

### **3.5. Determinación del número de células vegetativas y esporas.**

Para determinar el número de células viables por mL de cultivo se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  del mismo y se la diluyó en un tubo con 900  $\mu\text{L}$  de agua estéril, luego se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de dicha dilución y se diluyó nuevamente en 900  $\mu\text{L}$  de agua estéril, y así sucesivamente (dilución seriada de 1/10). Después de realizadas las diluciones, se tomó 100  $\mu\text{L}$  de cada tubo y se plaqueó con espátula de Drigalski sobre placas de Petri conteniendo medio sólido SM o LB y se incubó a las placas así sembradas durante toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente, se contaron las colonias formadas sobre la placa (el número de colonias por placa, para que el resultado sea estadísticamente significativo, debe ser mayor a 30 UFC/placa (unidades formadoras de colonias), y no mayor a 500 UFC/placa para poder contarlas, que no se superpongan, de lo contrario se puede cometer un error por defecto en el recuento). Para determinar el número de esporas se procedió de la misma manera que para el recuento de células viables, pero antes de la etapa de plaqueado se sometió a las distintas diluciones a un tratamiento con calor,  $80^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos; que tiene por objeto inactivar irreversiblemente (matar) a las células vegetativas de manera que sólo las esporas presentes den, colonias luego de germinar en las placas de SM o LB.

### **3.6. Recolección de muestras y aislamientos de *Bacillus*.**

Las muestras de suelo provenían de suelos rizosféricos de campos agrícolas sembrados con soja, trigo y maíz de acuerdo a la época del año. Mientras que las muestras de materia fecal de rumiantes se recolectaron de zonas en las que se encuentran animales pastando libremente. Además las muestras de alfalfa fueron provistas por Biotay S.A. (que cofinanció la beca y Foncyt que permitió trabajar en esta tesis).

Las muestras fueron recolectadas en bolsas plásticas (tres muestras por región). En cada caso, 50 g de suelo fueron añadidos a 100 mL de agua estéril

en una botella de 250 mL, homogeneizado por agitación vigorosa durante 1 hora a temperatura ambiente. Volúmenes de 1 mL fueron sometidos a tratamiento térmico (20 minutos a 80° C) a los fines de seleccionar microorganismos formadores de esporas. De manera similar se procesó las muestras de materia fecal y de henos, siendo las masas pesadas 5 g y 10 g respectivamente.

A partir de estas muestras, se sembraron 3 (tres) diluciones seriadas ( $10^2$ - $10^3$ - $10^4$ ) de los homogeneizados con espátula de Drigalzyk en placa de Petri conteniendo medio sólido SMA, con el objetivo de seleccionar aquellas cepas que se encontraban en mayor abundancia natural. Tras una incubación de 24 h a 37°C se examinaron y contaron las colonias crecidas, seleccionándolas según su morfología y fenotipo en placa y por la formación de esporas en medio líquido.

### **3.7. Crecimiento de cepas fúngicas en medio líquido.**

En botellas de 125 mL con 20 mL de LB suplementado con glucosa 1 %, cloranfenicol 5 µg/mL, tetraciclina 10 µg/mL y ampicilina 100 µg/mL se inocula con conidios del hongo obtenidos a partir de placa PDA suplementada de la misma manera. Esta se la hace crecer con agitación (180 rpm) durante 72 hs (Chang y col., 2007).

### **3.8. Recuentos de cepas fúngicas.**

Para determinar el título en el cual se encuentra la cepa fúngica por mL de cultivo se tomó una alícuota de 100 µL del mismo y se la diluyó en un tubo con 900 µL de agua estéril, luego se tomaron 100 µL de dicha dilución y se diluyó nuevamente en 900 µL de agua estéril, y así sucesivamente (dilución seriada de 1/10). Después de realizadas las diluciones, se tomó 100 µL de cada tubo y se plaqueó con espátula de Drigalski sobre placas de Petri conteniendo PDA o LBA, suplementada con los antibióticos mencionados anteriormente y EDTA 0,1 mM (el cual desestabiliza la membrana fúngica limitando la velocidad de crecimiento). Las placas así sembradas fueron incubadas durante 72 hs a 28° C. Se cuentan las colonias formadas sobre la

placa, el número de colonias por placa, para que el resultado sea estadísticamente significativo, debe ser mayor a 30 UFC/placa, y no mayor a 500 UFC/placa, de manera similar a como se describió para el recuento bacteriano.

### **3.9. Mantenimiento de cepas fúngicas.**

Para la preservación de las cepas fúngicas se las hace crecer en tubos conteniendo picos de flauta con PDA, con el agregado de antibióticos para evitar el desarrollo bacteriano, hasta que el hongo cubra la superficie del medio de cultivo. Una vez que el hongo se ha desarrollado en el tubo, éste se cubre con vaselina líquida estéril y se conserva a 4° C. Cada 6 meses debe realizarse un chequeo de la viabilidad de los mismos y hacer los correspondientes repiques de ser necesario.

### **3.10. Enfrentamiento con cepas fúngicas.**

Los enfrentamientos se realizaron en placas de Petri con PDA. En el centro de la placa se inoculó con el hongo a testear y en un extremo se realizó una estría o se colocó una gota con la cepa bacteriana a ser testada.

### **3.11. Ensayo de formación de biofilm.**

A fin de verificar la formación de biofilm por partes de las distintas cepas de *Bacillus* ensayadas, se inocularon tubos y/o receptáculos o pocillos de microplacas con el medio de cultivo usado para estimular la esporulación, LBY, y se incubó a la temperatura adecuada durante el tiempo indicado para cada ensayo. Luego se retira con cuidado el medio de cultivo de cada pocillo. Los restos de biofilm adheridos sobre la superficie se resuspende en agua para luego medir la DO<sub>550</sub>.

### **3.12. Desplazamientos de las cepas en medio semi-sólido.**

Para llevar a cabo este ensayo se prepararon placas de LB al 0,7% de agar. Luego de que el agar gelifica, las placas son secadas en la estufa durante 40 (cuarenta) min para finalmente inocularlas con 3 µL de las cepas seleccionadas. Estas placas se incuban a 37° C monitoreándolas en el tiempo.

### **3.13. Obtención de esporas limpias.**

En una primera etapa se hizo crecer las cepas hasta obtener cerca de un 100% de esporas, como se describió en apartados anteriores. Luego, los erlermeyers fueron calentados durante 20 min a 80 °C, a fin de eliminar aquellas células no esporuladas. Una vez obtenida la solución de esporas, se lleva a cabo la etapa de lavado de las mismas, en el cual en primer lugar se descarta el medio de cultivo y se lo reemplaza por agua estéril, mediante sucesivos pasos de centrifugaciones y enjuagues, según se describe en "Molecular Biological Methods for *Bacillus*" de Harwood y Cutting (1990).

### **3.14. Germinación de esporas.**

A partir de una solución de esporas limpias de *Bacillus*, se prepara una solución de esporas en buffer Tris-Cl 0,1M pH=8, con una DO<sub>550</sub> inicial de aproximadamente 1. Luego se mide la caída de DO<sub>550</sub>, ante el agregado de germinantes tales como AFGK (Harwood y Cutting, 1990; Igarashi y col., 2004). Puesto que las esporas son refráctiles, su DO<sub>550</sub> es mayor que el mismo título de células en estado vegetativo, por lo tanto cuando la espora germina la DO<sub>550</sub> de la suspensión disminuye. Para realizar este ensayo la densidad óptica se monitorió cada 15 min.

### **3.15. Determinación del número de células vegetativas y esporas sobre la superficie de hoja.**

Para determinar el número de células viables y esporas sobre la superficie de la hoja se inocularon hojas de trigo con una cantidad de esporas determinadas previamente. Esto se llevó a cabo en hojas de plantas germinadas en esterilidad, usando como soporte sólido vermiculita estéril y semillas sanitizadas. Una vez que la plántula alcanzó una altura apropiada las hojas se cortaron en trozos, manteniendo siempre la esterilidad y se inocularon con una determinada cepa de *Bacillus* aislada. Luego, a distintos tiempos, el segmento se colocó en un tubo tipo eppendorf con agua estéril y se plaqueó con espátula de Drigalski sobre placas de Petri conteniendo medio sólido SM o LB con el fin de determinar el número de células viables y esporas. Estas se

## Materiales y Métodos

incubaron durante toda la noche a 37° C. De ser necesario se llevó a cabo una dilución seriada. Al día siguiente, se contaron las colonias formadas sobre la placa. Para determinar el número de esporas se procedió de la misma manera que para el recuento de células viables, pero antes de la etapa de plaqueado se sometió a las distintas diluciones a un tratamiento con calor, 80°C durante 20 min; que tiene por objeto inactivar irreversiblemente (matar) a las células vegetativas de manera de que sólo las esporas viables presentes den colonias en las placas de SM o LB.

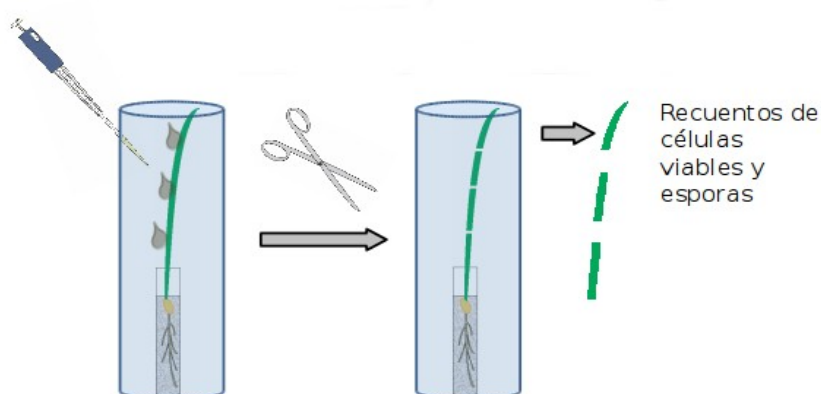


Figura 8: Determinación del número de células vegetativas y esporas sobre la superficie de hoja.

### 3.16. Ensayos en mini-fardos ("rulers").

Se prepararon pequeños fardos con alfalfa y a estos se le realizaron distintos tratamientos. Se pesaron 15 g de alfalfa (*Medicago sativa*) con concentraciones fijas de *F. verticillioides* (H) y concentraciones variables de las cepas de *Bacillus* aisladas. Como cepa control se usó HenoSilo® (producto comercial).

Se realizaron recuentos del hongo al cabo de los 15 días.

Los tratamientos fueron los que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 4: Tratamientos aplicados a los mini-fardos.

| Enfrentamiento en mini-fardos                      | HS [ufc]            | JH642 [ufc]         | PR2 [ufc]           | PR33 [ufc]          | PR39 [ufc]          | PR40 [ufc]          |
|--|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Medicago sativa</i> + <i>F. verticillioides</i> | 1 x 10 <sup>5</sup> | 1 x 10 <sup>5</sup> | 1 x 10 <sup>5</sup> | 1 x 10 <sup>5</sup> | 1 x 10 <sup>5</sup> | 1 x 10 <sup>5</sup> |
| <i>Medicago sativa</i> + <i>F. verticillioides</i> | 1 x 10 <sup>6</sup> | 1 x 10 <sup>6</sup> | 1 x 10 <sup>6</sup> | 1 x 10 <sup>6</sup> | 1 x 10 <sup>6</sup> | 1 x 10 <sup>6</sup> |
| <i>Medicago sativa</i> + <i>F. verticillioides</i> | 1 x 10 <sup>7</sup> | 1 x 10 <sup>7</sup> | 1 x 10 <sup>7</sup> | 1 x 10 <sup>7</sup> | 1 x 10 <sup>7</sup> | 1 x 10 <sup>7</sup> |



*Figura 9: Esquema de trabajo en mini-fardos.*

### **3.17. Ensayo a mediana escala en “bandejas”.**

Para este ensayo se pesaron 100 gr de alfalfa para cada tratamiento, las cuales fueron inoculadas con las esporas de las cepas seleccionadas usando la concentración recomendada para el producto comercial, Henosilo. Estos pequeños fardos inoculados fueron incubados a 28 °C. Se monitoreó el peso de cada bandeja al menos dos veces al día y por último se calculó el porcentaje de humedad en la muestra al cabo de 3 días. El ensayo mostrado en la sección de resultados correspondientes, es el más representativo de 4 ensayos individuales, cada ensayo se realizó por triplicado.



*Figura 10: bandejas con aproximadamente 100 gr. de alfalfa las cuales fueron inoculadas con los distintos tratamientos y se monitoreó su peso.*

### **3.18. Transformación de *B. subtilis*.**

Bajo determinadas condiciones metabólicas *B. subtilis* tiene la capacidad de adquirir material genético, ADN, exógeno. Esta competencia natural la desarrolla generalmente en la fase de crecimiento logarítmica tardía dependiendo de factores medioambientales, que actualmente se conoce que regulan la actividad del sistema de dos componentes ComP-ComA. Anagnostopolos y Spizizen en 1961, desarrollaron la siguiente técnica para transformar a *B. subtilis*, la cual fue utilizada en este trabajo para construir las distintas cepas. Brevemente, la cepa receptora a utilizar se creció durante toda la noche a 37°C en placa de LBA suplementada con los antibióticos correspondientes. A partir de ésta, al día siguiente se inocularon en 2,5 mL de medio GMI, hasta ligera turbidez, y se creció a 37° C durante 5 horas o hasta observar desarrollo de movilidad en los bacilos a 37° C con agitación. Luego, 100 µL de este cultivo se diluyeron en 900 µL del medio GMII (volumen final 1 mL) y se adicionaron 5-10 µL de ADN. Se incubó durante 90 min en GMII a 37° C con agitación. Este es el momento en el cual *B. subtilis* toma el ADN exógeno, transformándose. Posteriormente se sembraron en placas con medio selectivo. Se realizaron dos controles: en uno, luego de la dilución en GMII no se agregó el ADN (control negativo) y se incubó tal cual lo descrito, para el otro control se agregó el ADN a 1 mL de GMII sin células y se incubó (control de pureza del ADN empleado).

### **3.19. Construcción de cepas de *B. subtilis natto* (BSN).**

Las cepas de BSN con deficiencias génicas o mutantes en distintos genes, fueron construidas en una primera instancia, mediante técnicas de ingeniería genética convencionales colocando un cassette de resistencia a antibiótico dentro del gen de interés de modo de generar una ruptura e inactivación del mismo (Harwood y Cutting, 1990). Luego, de obtenerse los ADN cromosomales de las cepas de *Bacillus*, con los que luego se transformó las cepas salvaje como ser a BSN con el mismo método de transformación natural descrito anteriormente, con algunas modificaciones. En primer lugar el volumen de GMI usado fue 5 mL, en lugar de 1mL que es el utilizado en la técnica tradicional de

JH642, debido a su baja eficiencia para transformar de manera natural; además se agregó 5 veces más extracto de levadura (concentración final 0,05%) y finalmente se sembró todo el volumen de GMII.

### **3.20. Extracción de ADN cromosomal.**

Las cepas utilizadas para la extracción de ADN cromosomal se cultivaron en 20 mL de LB líquido durante 10 h con agitación a 30° C. Luego se obtuvieron las células por centrifugación durante 10 minutos a 7000 rpm.

El pellet obtenido fue procesado de la siguiente manera:

1. Resuspensión del pellet en 1 mL de solución amortiguadora TE.
2. División del contenido de cada tubo en dos partes de 500 µL en tubos tipo eppendorf. Agregado de una punta de escarbadiante de Lisozima de clara de huevo (Sigma Co.) y 4 µL de ARNasa (Biodynamics) 10 mg/mL.
3. Incubación durante 30 min a 37 °C.
4. Agregado de 10 µL de proteasa 92 mg/mL (de *Bacillus licheniformis*, 9,8 U/mg, Sigma-Aldrich Co.).
5. Incubación durante 15 min a 37 °C.
6. Agregado de 50 µL de SDS 20 % p/v, inversión suave hasta clarificación del contenido del tubo.
7. Agregado de 250 µL de fenol y 250 µL de cloroformo, agitación vigorosa,
8. Centrifugación durante 10 min a 10000 rpm.
9. Extracción de fase superior.
10. Agregado de un volumen de cloroformo igual al contenido del tubo, agitación vigorosa.
11. Centrifugación durante 4 min a 10000 rpm.
12. Extracción de fase superior.
13. Repetición de los pasos 10, 11 y 12 una vez. La interfase debe ser límpida.

14. Agregado de un volumen de etanol absoluto a 4°C en proporción 2,5:1 y acetato de sodio 3 M pH 5,4 en proporción 1:10, inversión suave.
15. Incubación toda la noche a -20° C.
16. Centrifugación durante 20 min a 13000 rpm.
17. Descarte de sobrenadante.
18. Secado a 37° C hasta eliminación total de etanol.
19. Agregado de 200 µL de agua desionizada estéril.
20. Incubación durante 1 h a temperatura ambiente.
21. Almacenamiento a -20° C.

### **3.21. Electroforesis del ADN en geles de agarosa.**

La separación de moléculas de ADN se realizó por electroforesis en geles de agarosa utilizando el sistema tipo submarino. La concentración de agarosa utilizada fue del 1 % (P/V) en Solución TAE 1X (TAE 50X: Tri-acetato 2M pH 8, EDTA 50 mM pH 8) en presencia de 0,4 ug/mL de bromuro de etidio. Las muestras se sembraron mezcladas en una proporción 9:1 con Solución de Siembra 10X para ADN (Azul de bromofenol 0,25% P/V, Xilene cyanol 0,25 P/V, Glicerol 30% V/V). La corrida se llevó a cabo en Solución TAE 1X a una intensidad de corriente de 40 mA y las bandas de los fragmentos de ADN y plásmidos se visualizaron por fluorescencia en un transiluminador de luz ultravioleta (302 nm) (UVP modelo M-20, potencia 48 W).

### **3.22. Secuenciación de las muestras de ADN.**

Los fragmentos de ADN fueron secuenciados con cebadores específicos, en el Servicio de Secuenciación del Institut Pasteur Montevideo, para el gen codificante del ARN ribosomal 16S.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las depositadas en la base de datos "GenBank", utilizando la herramienta BLAST

([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)), y en la base de datos "RibosomalDatabase Project" (<http://rdp.cme.msu.edu/>), empleando la función "Seqmatch".

Empleando el programa "TreeBuilder", disponible en la página web de "RibosomalDatabase Project" (<http://rdp.cme.msu.edu/>), se construyó el árbol filogenético relacionando las secuencias de los genes para el ARN ribosomal 16S de las cepas en estudio con secuencias de cepas depositadas previamente del género *Bacillus*.

### **3.23. Análisis del transcriptoma.**

Dos  $\mu\text{L}$  de cultivos crecidos durante toda la noche a 37 °C de *B. subtilis natto* (RG4365) y su derivado *spo0A* (RG4370) se inocularon en el medio de placas de LB que contenían 0,7% o 1,5% de agar, aquí se sembró con ansa y se tomaron varias colonias. La biomasa bacteriana se removió de las placas con una espátula después de 24 horas de crecimiento y las muestras fueron almacenadas a -80 °C. Se incluyeron al menos tres réplicas biológicas independientes. Estas células se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron. La extracción de ARN se realizó con el protocolo de Macaloide/Roche con dos pasos adicionales de lavado con fenol-cloroformo. La concentración de ARN y la pureza se evaluó a con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). La muestras de ARN se pasaron a ADNc mediante transcripción inversa utilizando el kit SuperScript III de transcriptasa inversa (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) y marcado con Cy3 o Cy5 no reactivo (GE Healthcare, Amersham, Holanda). Las muestras de ADNc marcado y purificado (Extracto Nucleospin II, Biokè, Leiden, Holanda) se hibridaron en buffer #1 Ambion Slidehyb (Ambion Europe Ltd) a 48 °C durante 16 h. Los arrays se construyeron como se describe en la bibliografía (Baldi y col., 2001; Kuipers y col., 2002; van Hijum y col., 2003-a; van Hijum y col., 2003-b). Después de la hibridación, los portaobjetos se lavaron durante 5 min, en 2 X SSC con 0,5% SDS, 2 veces por 5 min en 1 x SSC con 0,25% SDS, 5 min en 1 x SSC 0,1% SDS, se secó por centrifugación (2 min, 2.000 rpm) y escaneado en GenePix 4200AL (Axon Instruments, CA, EE.UU.). Las señales de

fluorescencia se cuantificaron utilizando ArrayPro 4.5 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, EE.UU.) y posteriormente se procesó y normalizó con Microprep (5). Se utilizó CyberT 6 para llevar a cabo el análisis estadístico. Se consideraron los genes con un valor de p de Bayes de  $\leq 1,0 \times 10^{-4}$  como afectados significativamente.

### **3.24. Reacción en cadena de la polimerasa.**

Las reacciones de PCR se realizaron usando la enzima *Taq* (de Biotools). El medio de reacción estaba compuesto por  $MgCl_2$  3,5 mM, dNTPs 0,5 mM de cada uno, cebadores 0,2  $\mu M$  de cada uno y 2,5 U de la enzima para un volumen final de 50  $\mu l$  de la solución tampón (1X) provista por el fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en termociclador Techgene, programado de acuerdo a las características de cada par de oligonucleótidos, y la naturaleza y el tamaño del ADN a amplificar.

### **3.25. Construcción de cepas de *Bacillus*.**

Las cepas de *B. subtilis* en los genes de interés (por ejemplo quinasas y fusiones *lac-Z*) fueron construidas en una primera instancia, mediante técnicas convencionales de ingeniería genética que consistieron en el clonado de un gen de resistencia a antibiótico dentro del gen de interés de modo de generar una ruptura e inactivación del mismo y en el caso de las fusiones *lac-Z* el promotor del gen del cual interesa medir su nivel de expresión, se insertó por delante del gen para la enzima  $\beta$ -galactosidasa, el cual recombina en la región del gen de la enzima amilasa dentro del cromosoma de *B. subtilis* (Harwood y Cutting, 1990).

### **3.26. Clonación de genes *kinB*, *kinC* y mutagénesis sitio dirigida.**

Las regiones codificantes de *kinB* y *kinC* fueron amplificados con los pares de oligos oTB56-oTB57 y oTB61-oTB62, respectivamente (las secuencias de los oligonucleótidos se indican en la Tabla 5. Los productos de PCR fueron digeridos con enzimas *Bam*HI y *Eco*RI y se clonó en los sitios correspondientes del plásmido pTB16, vector de integración en *amyE* con el gen de resistencia a

## Materiales y Métodos

kanamicina. Este plásmido pTB16, fue creado mediante la amplificación el gen de resistencia a la kanamicina de pDG782 con primers oDG1 y oDG2, cortado con las enzimas *StuI* y *BamHI* y ligado en los sitios correspondientes del vector de amplificación por PCR obtenido con oX1 y oX2. Las mutaciones sitio dirigidas al gen *kinB* se obtuvieron utilizando un método de solapamiento de fragmentos de PCR, usando la enzima polimerasa (Roboklon GmbH, Berlín, Alemania). La región 5' de *kinB* se amplificó con los oligonucleótidos oTB56-oTB58, mientras que las regiones 3', que contienen mutaciones para el intercambio de 3 aminoácidos (S<sup>383</sup>A, T<sup>386</sup>A y G<sup>388</sup>A) o la delección de 7 aminoácidos (S<sup>383</sup>-T<sup>389</sup>), se obtuvo con los oligonucleótidos oTB59-oTB57 o oTB60-oTB57, respectivamente. Los fragmentos de PCR se utilizaron como moldes en una segunda ronda de reacción de PCR usando los oligonucleótidos oTB56-oTB57 y los fragmentos de fusión se clonaron como se hizo con el gen *kinB* salvaje. Las construcciones de plásmidos obtenidos fueron secuenciadas antes de la transformación para la integración en el locus *amyE* de *B. subtilis*.

Tabla 5: Oligonucleotidos usados en este trabajo.

| Nombre | Secuencia   | Gen target  |
|--------|---|-------------|
| oTB56  | 5' -CATGGGATCCTGGCGGAGAAGGATTTATG-3'                                    | <i>kinB</i> |
| oTB57  | 5' -CACGGAATTCTGTCTCAAACGTGCTCATC-3'                                    | <i>kinB</i> |
| oTB58  | 5' -ATAATAAGGTTCCGCCGAGTTTTTGC-3'                                       | <i>kinB</i> |
| oTB59  | 5' GCAAAAACCTCGGCGAACCTTATTATGGACTCGGCCTCAC<br>CGTAACCTTTTCC-3'         | <i>kinB</i> |
| oTB60  | 5' GCAAAAACCTCGGCGAACCTTATTATGCCTTAAAAGCGAA<br>CGCAACGGGACTCGGCCTCAC-3' | <i>kinB</i> |
| oTB61  | 5' -CATGGGATCCATTACGCTAAGCCCTGAG-3'                                     | <i>kinC</i> |
| oTB62  | 5' -CACGGAATTCTTGTGCCAGCAAATGATG-3'                                     | <i>kinC</i> |
| oDG1   | 5' -AGGCCTCGAGATCTATCGATA-3'  | pDG782      |
| oDG2   | 5' -GGATCCATATGACGTCGACGCG-3'   | pDG782      |
| oX1    | 5' - GGATCCGCTCAACGGCCTCAACCTACTACTG-3'                                 | pX          |
| oX2    | 5' - AGGCCTGCCGGTCGCTACCATTACCAG-3'                                     | pX          |

### 3.27. Ensayo de la actividad $\beta$ -galactosidasa.

Este ensayo (Lombardia y col., 2006) basado en la hidrólisis del compuesto incoloro o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido (ONPG) por parte de la enzima  $\beta$ -galactosidasa (producto del gen *lacZ*) a 28°C y pH 8, dando lugar al producto coloreado o-nitrofenol que puede ser medido espectrofotométricamente a 420 nm, de acuerdo con la siguiente reacción:

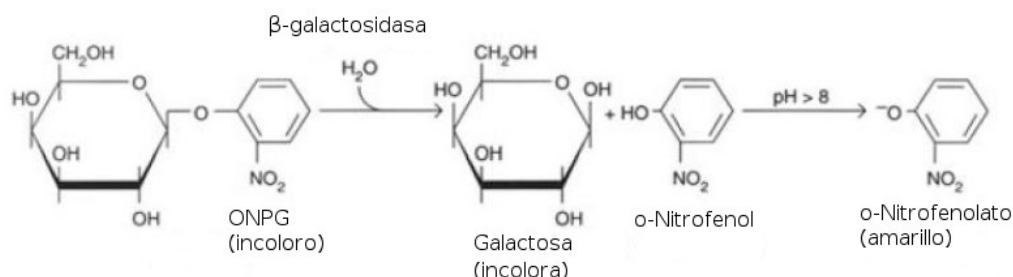


Figura 11: Reacción enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa.

Para llevar a cabo este ensayo primero se debe realizar una curva de crecimiento bacteriano a fin de registrar la densidad óptica y tomar muestras para medir la actividad enzimática de la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

1. Centrifugar un volumen de muestra, que depende de la fuerza del promotor bajo la cual se construyó la fusión *lacZ*, a fin de utilizar solo las células.
2. Resuspender en el mismo volumen usando BufferZ.
3. Llevar a un volumen final de 730  $\mu$ L con BufferZ.
4. Agregar 10  $\mu$ L de Lisozima (una punta de espátula/mL).
5. Incubar por 30 min a 37 °C.
6. Agregar 10  $\mu$ L de Triton X-100 al 10%.
7. Agregar 100  $\mu$ L de ONPG 0,45 g/L.
8. Incubar 15 min a 28 °C.
9. Agregar 150  $\mu$ L de  $Na_2CO_3$  1,2 M.
10. Leer absorbancia a 420 nm.

11. Calcular la actividad enzimática en Unidades Miller (UM), utilizando la siguiente fórmula:

$$UM = DO_{420} \times 66,7 \times DO_{525} \times (x \cdot mL)$$

Nota:  $x \text{ mL}$  = a la cantidad de muestra tomada para hacer la determinación de la actividad enzimática, esto a su vez depende de la fuerza del promotor.

### **3.28. Ensayos de la actividad $\beta$ -galactosidasa.**

Los ensayos de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de cultivos líquidos se realizaron como se describió anteriormente (Kearns y Losick, 2003; Pedrido y col., 2013). En el caso de los ensayos de la actividad  $\beta$ -gal conducido a partir de colonias, las células se resuspendieron a una concentración final de  $3 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> antes de medir la actividad  $\beta$ -galactosidasa (Kearns y Losick, 2003; Pedrido y col., 2013)

### **3.29. Medición de la actividad $\beta$ -galactosidasa a partir de placas de Petri.**

Se inocularon 5  $\mu$ L de un cultivo O.N. de la cepa RG4382 (*PabrB-lacZ*) y se inocularon placas de Petri con distintos medios que favorecen la expresión de diferentes conductas sociales bajo el control de Spo0A-Pi: movilidad tipo sliding (LB 0,7% agar), la formación de biofilms (LBY 1,5% agar), la esporulación (SM 1,5% de agar), o ninguno en particular (LB 1,5% agar). Después de 20 h de incubación a 37 ° C, las células fueron eluidas de las placas para luego medir la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados mostrados son los más representativos de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

### **3.30. Observación de microorganismos en fresco.**

Para la observación en fresco se colocaron 13  $\mu$ L de cultivo fresco sobre un portaobjetos, se colocó un cubreobjetos y rápidamente se realizó la observación al microscopio (Axiostar marca Zeiss) con un objetivo de inmersión de aumento 100X, utilizando aceite de inmersión. Las fotos fueron tomadas con una cámara Canon Powershot A620 adaptada al microscopio.

### **3.31. Tinción de flagelos.**

Las muestras celulares para la visualización de los flagelos se prepararon como se indica en la referencia, Vlamakis y col. (2013). Para las imágenes realizadas en medio líquido se tomaron muestras tras 10 h de incubación, y 20 h para las muestras provenientes de las placas de movilidad. Estos tiempos representan el punto máximo de movilidad de cada cepa de tipo salvaje. Para las cepas desplazándose en medio semisólido se tomaron muestras de los bordes del "frente de avance" en las placas. Las células fueron retiradas cuidadosamente y se diluyeron con la intención de separarlas para mejorar la visualización de los flagelos. Las fotografías de NCIB3610 son las más representativas de esta población. Las fotos de la cepa RG4365 fueron tomadas de cultivos líquidos en fase exponencial tardía ( $OD_{525}$  0,9) en Medio LB con agitación (200 rpm) y de placas de agar soft.

### **3.32. Fotos de microscopía.**

El frente de avance de las células en movimiento del tipo swarming o sliding en placa, se visualizaron con un estereomicroscopio Stemi 2000 (Zeiss) utilizando un sistema de iluminación KL1500LCD (Zeiss). Para registrar la fotografía se usó una cámara A80 Power-shot (Canon).

### **3.33. Experimentos de complementación.**

La surfactina y cerulenina se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. Para las placas suplementadas con IPTG, uno o dos granos de IPTG se añadieron cuidadosamente en la superficie de la placa de LB soft, después de la solidificación, con el fin de permitir que el IPTG difunda y forme un gradiente de concentración.

### **3.34. Estimulación de la actividad multicelular dependiendo de la cantidad de Spo0A activo.**

Utilizando la cepa RG4382 ( $\Delta spo0A::ery/P_{spac}-spo0A-sad67cat$ ), se inocularon 5  $\mu$ L de un cultivo O.N. placas de LBY con 0,7% de agar preparadas con diferentes concentraciones de IPTG, según se detalla en la sección de resultados correspondiente. Después de 20 h de incubación a 37°C se tomaron

las fotografías y la frecuencia de esporulación se determinó como se describió anteriormente (después de la elución de las células de la placa de Petri). Los resultados son representativos de siete experimentos independiente realizados por triplicado.

### **3.35. Experimentos de colonización de raíces de plantas.**

Dos semillas de trigo desinfectadas fueron colocadas en una placa de petri que contenía como medio de cultivo una dilución 1:10 de LB con agar al 0,7% y se incubaron en cámaras de humedad a 25 °C con la exposición la luz en períodos de 12 h. Después de tres días de incubación, cuando las semillas del trigo comenzaron a germinar, se inocularon 3 µL de cultivos en fase estacionaria de la cepa tipo salvaje y las mutantes en *spo0A*. Después de 24 h de incubación y durante los días posteriores, se tomaron fotos desde arriba para mostrar la raíz de la planta y las bacterias en sliding.

### **3.36. Análisis de ácidos grasos.**

El análisis de ácidos grasos (AG) y extractos de lípidos de células de *B. subtilis* se recogieron de los cultivos líquidos o de placas con agar 0,7-1,5%, según corresponda. las muestras se almacenaron a -80 °C hasta transesterificación y análisis.

Se pesó aproximadamente 20 mg de cada muestra en un recipiente de vidrio de 4 mL con tapa a rosca. Para la transesterificación, se preparó una solución fresca de metanol-ácido hidroclorehídrico mediante la adición de 1 mL de cloruro de acetilo a 20 mL de metanol. Se adicionó butilato de hidroxitolueno (BHT; 3 µg.mL<sup>-1</sup>), para evitar la auto-oxidación de los ácidos grasos. Posteriormente 1,5 mL de esta solución se añadió a la muestra. Al sistema se lo desoxigenó con nitrógeno y el recipiente fue cerrado herméticamente. Después de agitación con vórtex, el recipiente se calentó a 90 °C durante 1 h. Una vez enfriado a temperatura ambiente, 1 mL de agua y 1,5 mL de hexano se añadieron para la extracción. Los tubos se agitaron en vórtex y se centrifugaron (6 min a 720 rpm). Se separó la fase orgánica (hexano). Los restos se redisolviaron en 0,2 mL (o 0,1 mL) de hexano

(dependiendo de la concentración final). La mezcla para FAME supelco 37, la mezcla ácida metil-éster Supelco bacterial y la mezcla Supelco triglicéridos (Supelco, Bellefonte PA, EE.UU.) se utilizaron como indican los patrones de referencia para FAMEs.

Una alícuota de la muestra (1  $\mu\text{L}$ ) se analizó en un instrumento de seguimiento Finnigan (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Alemania) equipado con una columna ZB5 (15 m x 0,25 mm x 0,25 m) (Phenomenex, Aschaffenburg, Alemania). Los espectros de masas fueron medidos en el modo EI (electron impact ) a 70 eV. El Helio a 1,5 mL.min<sup>-1</sup> sirvió como gas portador. El inyector de GC (relación de 1:15), línea de transferencia, y la fuente de iones se fijaron en 250 °C, 280 °C y 200 °C, respectivamente. Las fracciones de FAMEs se eluyeron en condiciones programadas de 50 °C (2 min) seguido de 10 °C.min<sup>-1</sup> hasta 168 °C, 1 °C.min<sup>-1</sup> a 177 °C y 10 °C.min<sup>-1</sup> a 320 °C (Rodríguez-Ruiz y col., 1998).

El análisis de ácidos grasos y extractos de lípidos de células de *B. subtilis* se recogieron de los cultivos líquidos o de placas con agar 0,7-1,5% de extracto de preparación FA o el análisis de FA, respectivamente. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta la trans-esterificación y análisis.

### **3.37. Preparación de extractos conteniendo ácidos grasos ramificados de *B. subtilis*.**

Cien mL de un cultivo de *B. subtilis* RG3465 fueron crecidos en LB líquido a 37 °C hasta finales de la fase vegetativa (~ 6 h de crecimiento), sólo ácidos grasos saturados se sintetizan a esta temperatura (Grau y de Mendoza, 1993). Los lípidos totales de membrana (fosfolípidos, FL, y glicolípidos, GL) se extrajeron como se describió anteriormente (Grau y de Mendoza, 1993). Entonces, los FL y los GL fueron hidrolizados en frío con diazo-metano para obtener ácidos grasos libres (FAs), que se secaron completamente y se resuspendió en 1 mL de etanol (Grau y de Mendoza, 1993). Para los experimentos de complementación de células de *B. subtilis* tratadas con cerulenina, se utilizaron los FAs en una dilución 1:100.

## Capítulo 1

### **Desarrollo de un inoculante bacteriano.**

Como parte inicial en este trabajo de Tesis nos enfocamos en el desarrollo de un inoculante bacteriano a base de bacterias del género *Bacillus*. Esta Tesis se llevó a cabo en el marco de una beca PID otorgada por Foncyt, cuyo objetivo fue el desarrollo de un inoculante bacteriano de origen nacional a fin de poder reemplazar un producto de origen importado. Este ambicioso proyecto conlleva dos objetivos fundamentales igualmente importantes, uno de ellos es el uso de cepas naturales no foráneas al ecosistema regional y por otro lado, un objetivo económico de fortalecimiento de la industria nacional.

En una primera etapa 1.1, se procedió a aislar cepas del género *Bacillus* procedentes de:

- a) muestras de tierra obtenidas de la región núcleo agropecuaria de este País.
- b) henos no tratados, en los cuales se puede encontrar, en algunos casos, tras un examen minucioso, zonas mejor conservadas, las cuales tendrían tentativamente, una microbiota natural que le confiere una protección especial ante el ataque fúngico.
- c) materia fecal de rumiantes, los cuales son, en última instancia los consumidores de henos, pero además, como ya se describió, el intestino de mamíferos es uno de los nichos naturales de aquellas bacterias esporulantes. Dichas representan los nichos naturales de las cepas del género *Bacillus*.

A continuación (1.2), se procedió a la selección de aquellas cepas de *Bacillus* que posean las características buscadas para este trabajo, las cuales eran capaces de controlar el desarrollo y proliferación de cepas fúngicas que atacan estos productos de almacenamiento. Las cepas fúngicas que se deseaba controlar fueron:

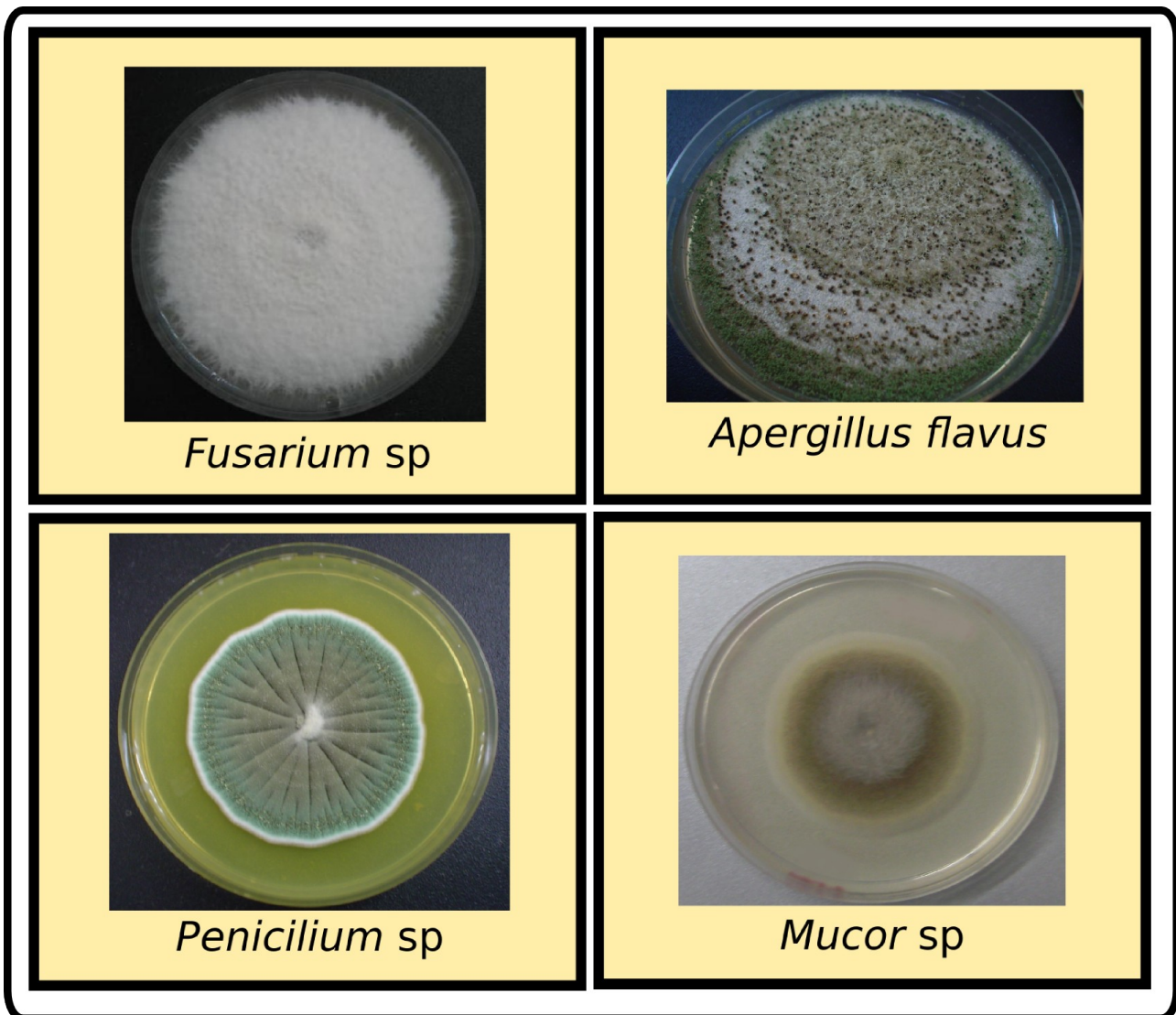


Figura 12: Cepas fúngicas que se deseaba controlar.

a) *Fusarium sp*: es un hongo filamentoso ampliamente distribuido en el suelo y en asociación con plantas. La mayoría de las especies son saprófitas y son miembros relativamente abundantes de la microbiota del suelo. Algunas especies producen micotoxinas en los cereales, que pueden afectar a la salud de personas y animales si estas entran en la cadena alimentaria. Son patógenos facultativos, capaces de sobrevivir en el suelo alimentándose de materiales en descomposición. Algunas especies son fitopatógenas causando la enfermedad conocida como fusariosis.

b) *Apergillus flavus*: Este hongo es de distribución mundial aunque se encuentra principalmente en climas tropicales. Debido a la producción de aflatoxina es importante su detección y prevención en suelos, maní, semillas y sitios de almacenamiento. Su determinación es de particular importancia por los efectos tóxicos que tiene sobre los animales y los humanos, alguna de estas toxinas son aspergilina O, que posee efecto hemaglutinante en eritrocitos de conejos y es anticoagulante, se suele asociar con aspergilosis pulmonar y es alergénico. Además, se ha demostrado que ciertas aflatoxinas son asociadas al cáncer de hígado.

c) *Penicillium sp*: es un género grande que puede encontrarse casi por todas partes, siendo el género de hongos más abundante en suelos. La fácil proliferación de los *Penicillium* en los alimentos es un problema. Algunas especies producen toxinas.

d) *Mucor sp*: es una cepa fúngica que se encuentra regularmente sobre la superficie del suelo. Comúnmente se puede aislár sobre materia orgánica en descomposición.

Otra característica buscada en las cepas de *Bacillus* es que fuesen capaces de acelerar la deshidratación de aquellos productos vegetales usados para la producción de henos (1.3). La especie usada con preferencia es la alfalfa, *Medicago sativa*, de esta manera conservar su valor nutricional.

Finalmente, se caracterizaron fisiológicamente e identificaron genotípicamente aquellas cepas que fueron seleccionadas (de la sección 1.1 – 1.3). Para este fin, se estudió la capacidad que poseían estas cepas salvajes para colonizar las superficies mediante la formación de biofilm y la velocidad de desplazamiento. Se cuantificó la frecuencia de esporulación de manera de poder determinar a futuro el rendimiento comercial. Finalmente, se determinó si las esporas de las cepas seleccionadas eran capaces, *in vitro*, de llevar a cabo al menos con un ciclo de vida que implicaría: germinar, colonizar, dividirse y esporular sobre el tejido vegetal el cual implica la producción de sustancias bioactivas como instancia previa a la esporulación.

### 1.1. Aislamiento de cepas formadoras de esporas.

Se realizaron aislamientos indígenas propios de *Bacillus* a partir de diferentes muestras de suelos agrícolas del País. Las muestras de suelo fueron provistas por la empresa Biotay S.A. (quien co-financia este proyecto), mediante un convenio de transferencia tecnológica entre la empresa, la U.N.R. y el Foncyt. Dichas muestras provenían de campos agrícolas sembrados con soja, trigo y maíz de acuerdo a la época del año. En las instalaciones de nuestro laboratorio se procedió al aislamiento y caracterización de los *Bacilli*, como se detalló en la sección en Materiales y Métodos, obteniéndose de esta manera aproximadamente 500 aislamientos diferentes de cepas bacterianas capaces de formar endosporas y consideradas a priori como representantes del género *Bacillus*. A continuación, en la figura 13, se presenta un esquema simplificado sobre cómo se realizaron los aislamientos.

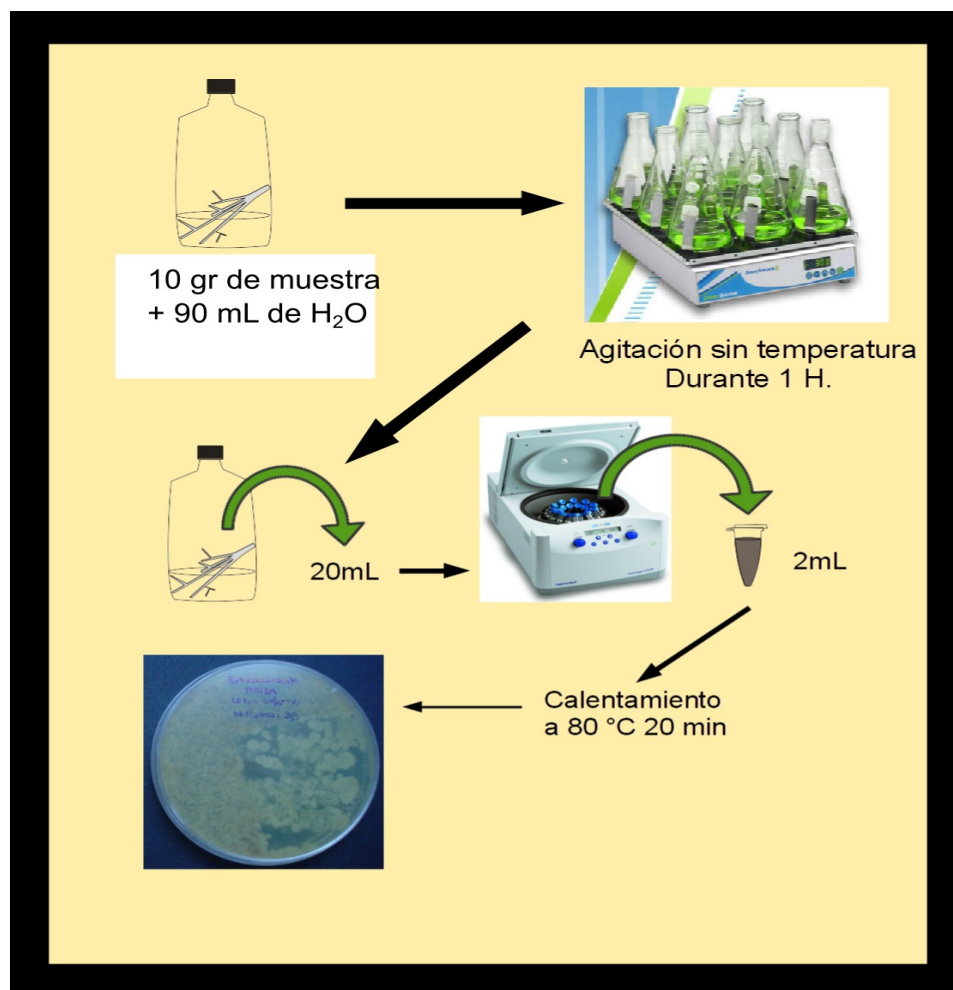


Figura 13: Aislamiento de cepas salvajes.

Una vez obtenida en placa las colonias con distintos bacilos, como se puede observar en el esquema, se procede a aislar en placas individuales de medio SM a una colonia representativa de cada uno de los distintos tipos de colonias desarrolladas según lo indica la figura 13.

### 1.2. Enfrentamiento de las cepas de *Bacilli* aisladas con las distintas cepas fúngicas fitopatógenas.

Para la determinación de la capacidad antifúngica de las 500 cepas de *bacilli*, se realizaron enfrentamientos duales en placa de PDA con cada una de las cepas fúngicas. Se usó como control negativo la cepa JH642 (sin capacidad para inhibir el desarrollo fúngico) y como control positivo la cepa comercial Heno Silo (HS) (con actividad antifúngica). De esta manera se seleccionaron cepas capaces de controlar, *in vitro* y de manera sostenida en el tiempo, la mayor cantidad de cepas fúngicas de interés comercial para este tipo de producto.

A continuación, se muestran los enfrentamientos de las cepas que presentaron mejor comportamiento junto con los respectivos controles, estas cepas fueron finalmente seleccionadas por sus propiedades antifúngicas.

#### ***Aspergillus Flavus.***

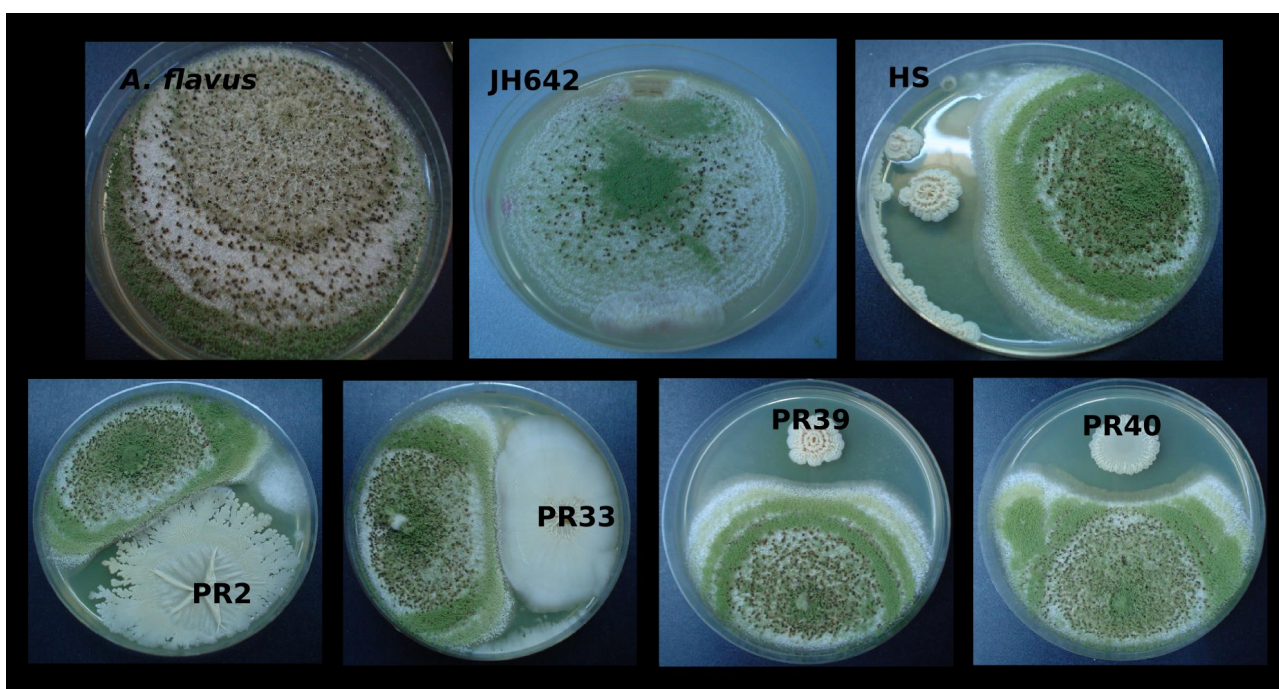


Figura 14: Enfrentamiento en placa de Petri de las cepas seleccionadas con *Aspergillus flavus*

**Fusarium sp.**

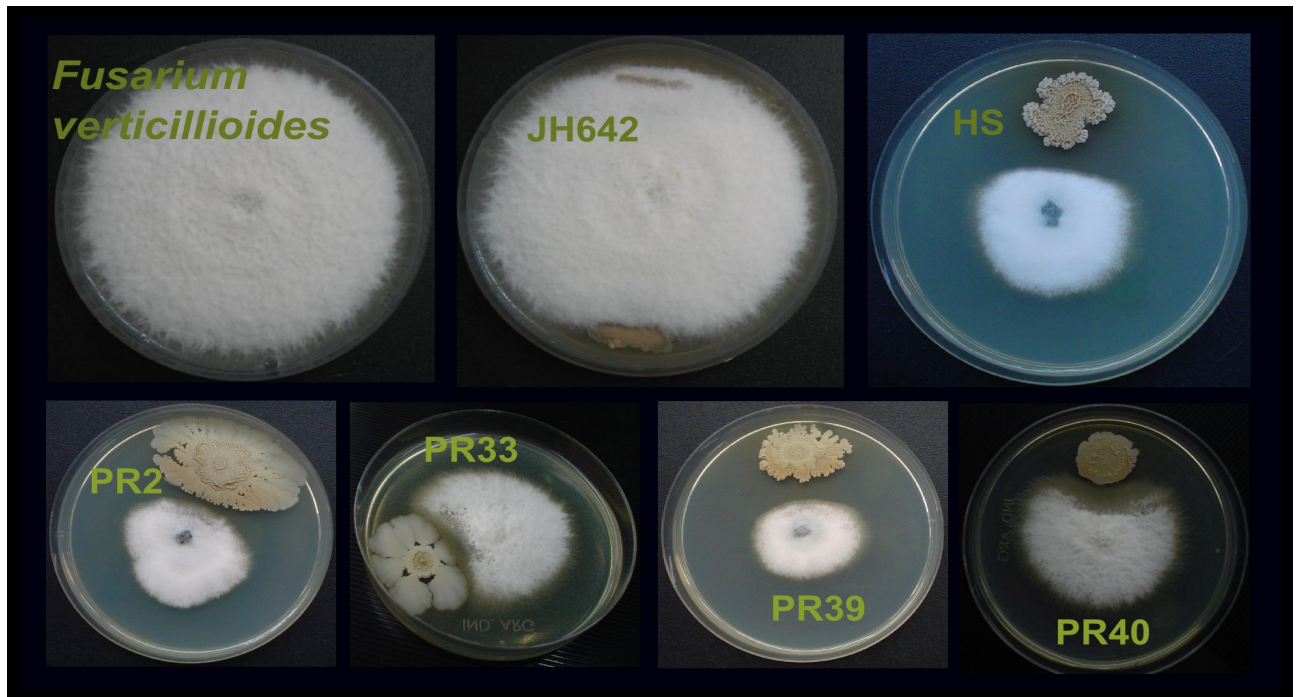


Figura 15: Enfrentamiento en placa de Petri de las cepas seleccionadas con *Fusarium sp.* En la figura se muestra *Fusarium verticillioides*.

**Penicillium sp.**

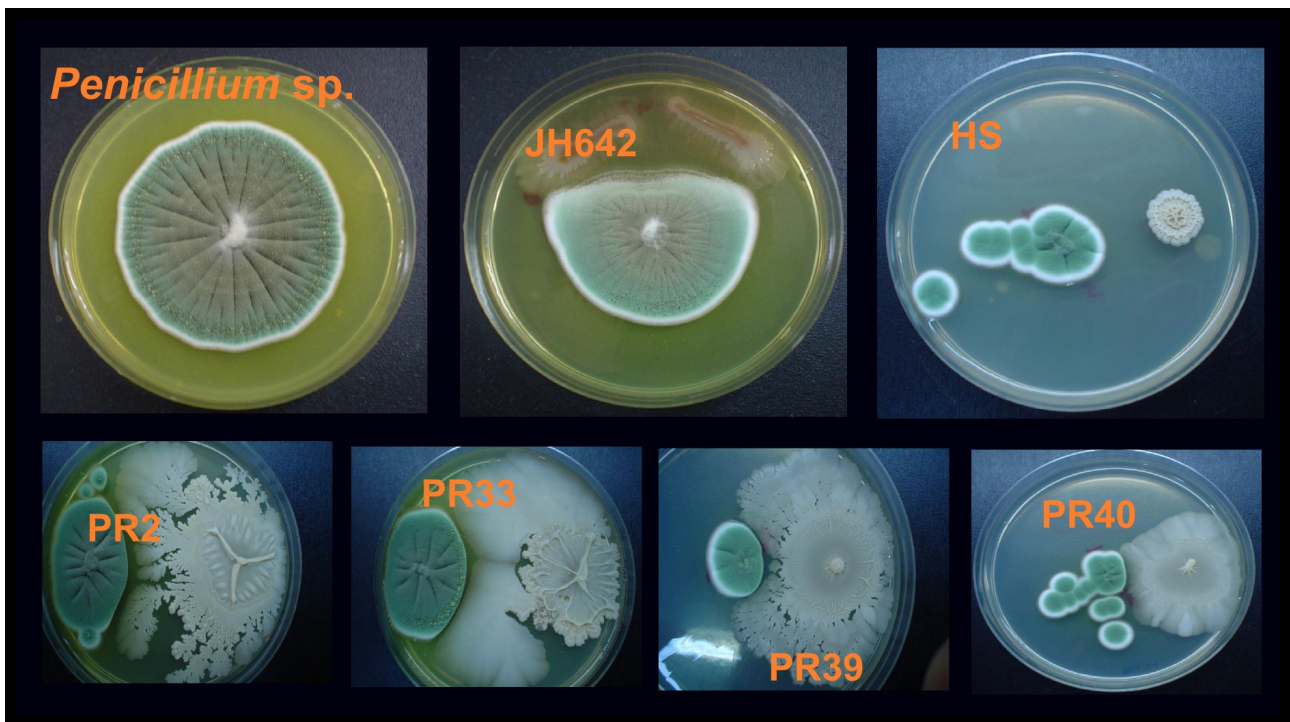


Figura 16: Enfrentamiento en placa de Petri de las cepas seleccionadas con *Penicillium sp.*

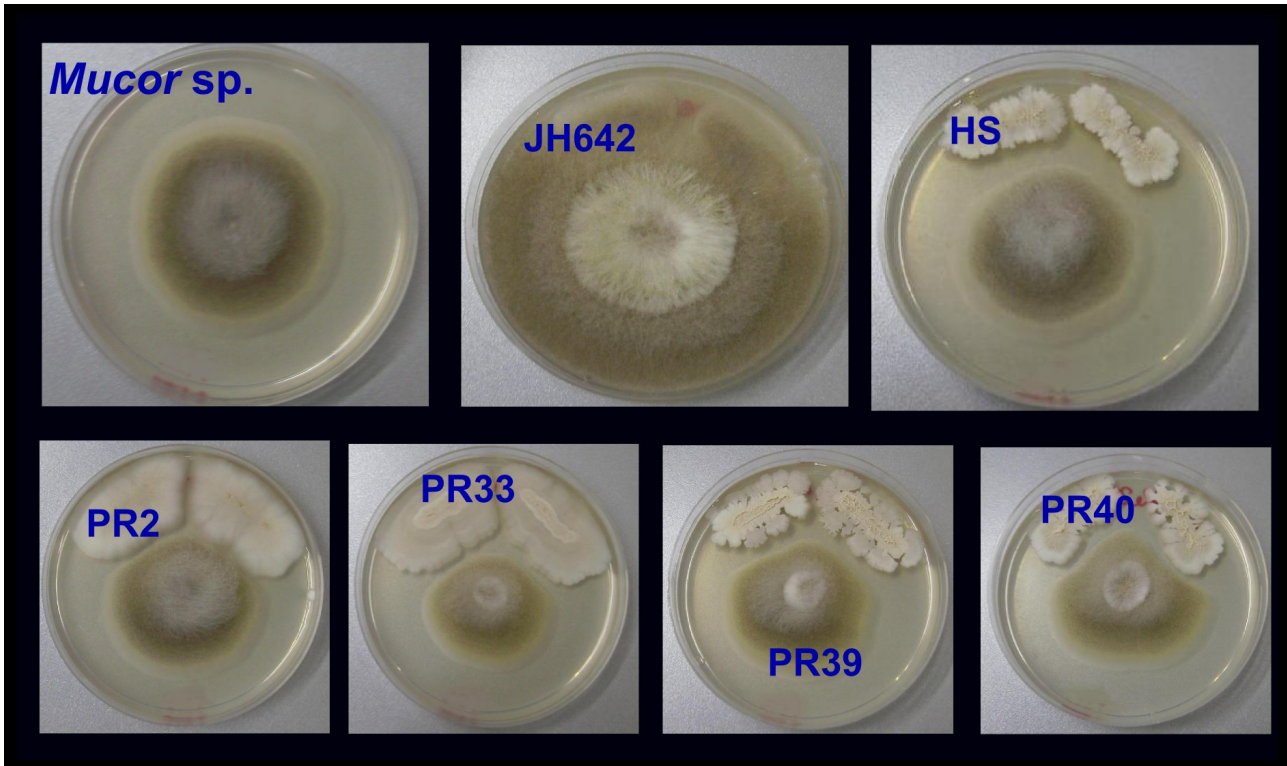
**Mucor sp.**

Figura 17: Enfrentamiento en placa de Petri de las cepas seleccionadas con *Mucor sp.*

Se debe tener en cuenta de que no se puede comparar la potencia del antifúngico que cada cepa bacteriana produzca, debido a que, si éstos tienen distinto peso molecular o distintas estructuras químicas, migrarán a distinta velocidad en medio sólido. Por otro lado, además, no se está evaluando la presencia de compuestos biocontroladores de naturaleza volátil.

### 1.3. Ensayo preliminar de deshidratación de hojas de alfalfa.

Ante el desafío de un ensayo de deshidratación y conociendo las limitaciones que presenta este tipo de ensayo a pequeña escala considerando la cantidad de cepas a probar, se realizó en primer lugar una prueba de deshidratación de hojas sueltas de alfalfa. Este, se llevó a cabo con el objeto de determinar a simple vista si una cepa era capaz de mantener el “verdor” de las hojas tras la inoculación con las cepas seleccionadas en el ítem anterior.

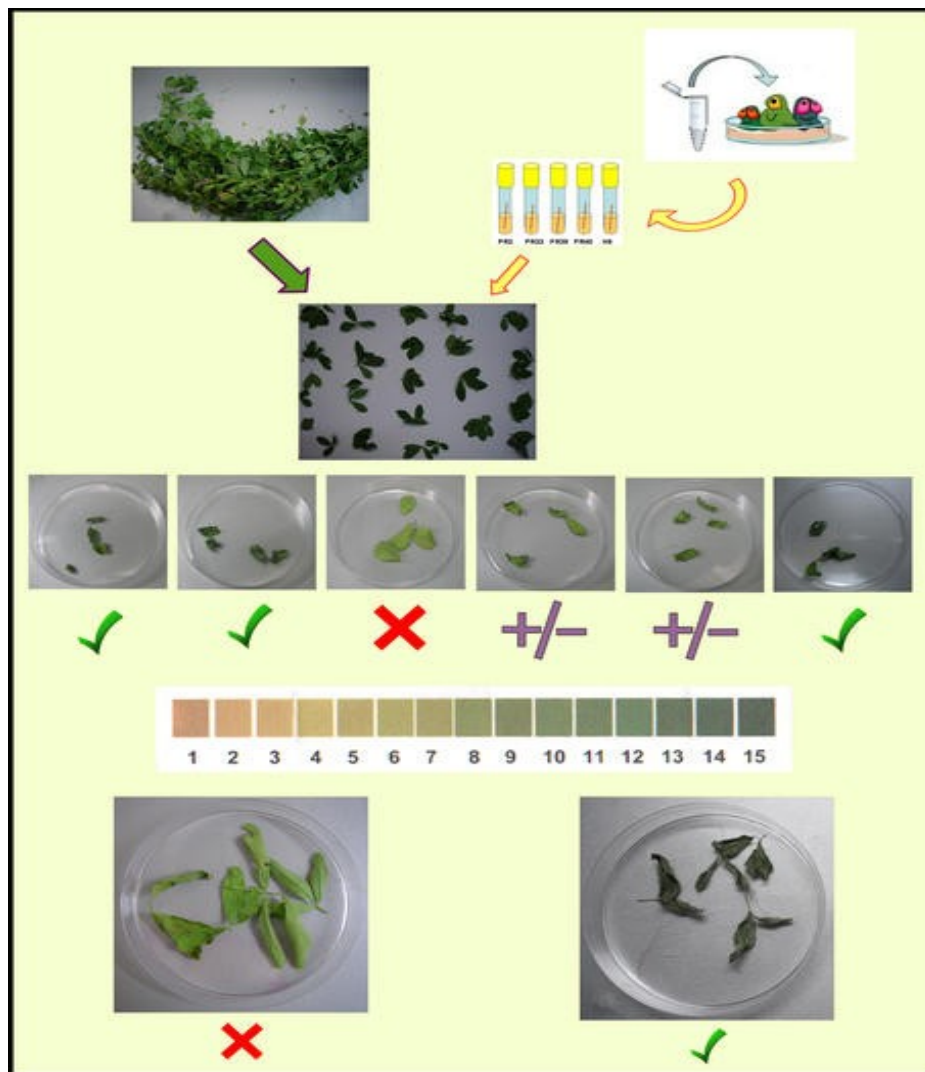


Figura 18: Ensayo cualitativo de deshidratación en hojas.

Tras secuenciales pasos de selección, donde se probaron más de 500 bacilos salvajes aislados, por su capacidad de controlar, en primer lugar, la proliferación de las cuatro cepas fúngicas testeadas y luego su capacidad de preservar el "verdor" de las hojas de alfalfa a escala de laboratorio, se seleccionaron cuatro cepas de *Bacilli*.

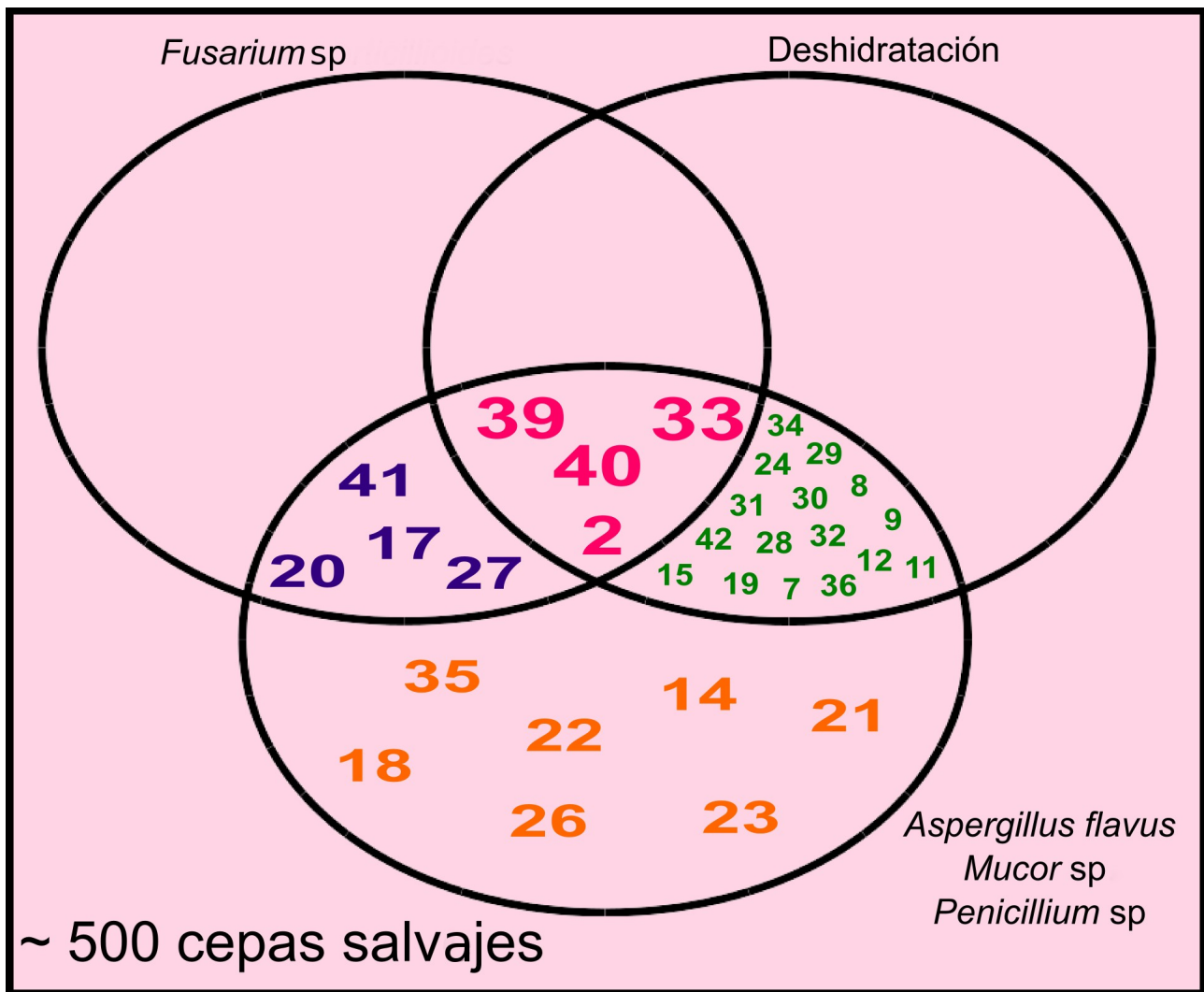


Figura 19: Selección preliminar de cepas.

#### 1.4. Ensayo a pequeña escala en "bandejas".

Este ensayo se llevó a cabo a fin de confirmar el resultado del ensayo preliminar de deshidratación realizado previamente, a una escala de laboratorio. Además, conociendo ya los resultados de los ensayos de control fúngico, determinar si se mantiene la correspondencia entre las cepas que mejor controlan la infección por hongos y las que aceleran el deshidratado. El ensayo se llevó a cabo como se esquematiza a continuación en la siguiente figura. Los resultados presentados son representativos de cinco ensayos los cuales se realizaron por triplicado.

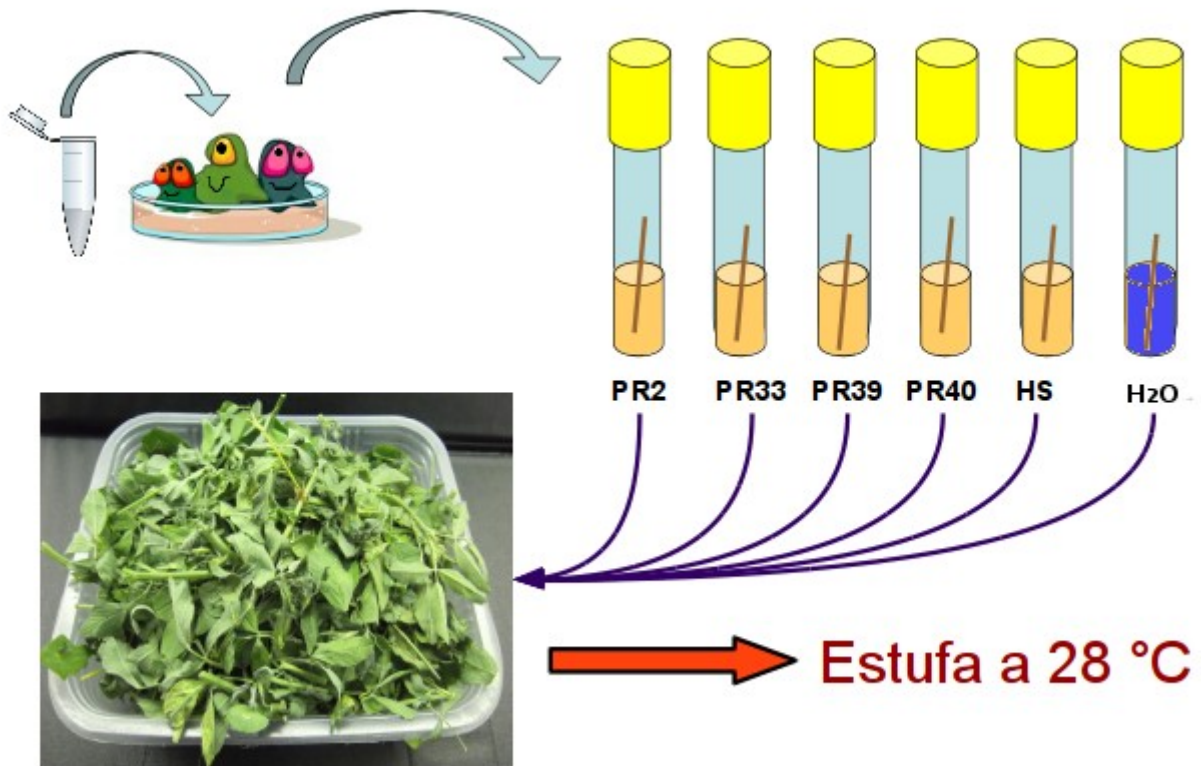


Figura 20: bandejas con aproximadamente 100 gr. de alfalfa las cuales fueron tratadas con los distintos inoculamientos para monitorear la evolución de la pérdida de peso.

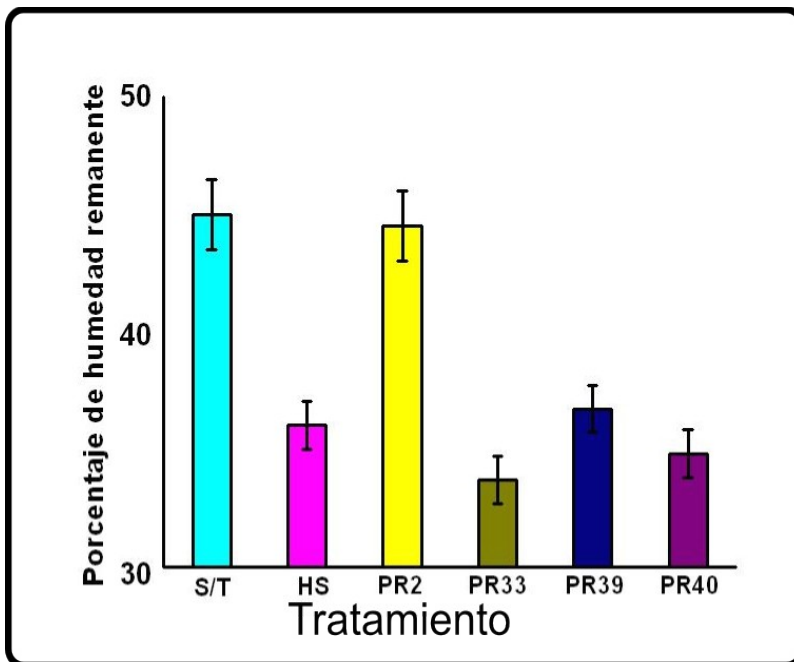


Figura 21: Porcentaje de humedad al cabo de 72 h, referido como porcentaje remanente del peso inicial (100%).

## Capítulo 1

Como se observa en la figura, todas las cepas seleccionadas, con excepción de PR2, se comportan de manera similar al control positivo HS, la cepa PR33 y PR40 son las que presentan un menor grado de humedad luego de 3 días de ensayo.

Si comparamos ambos datos podemos concluir que, si bien la cepa PR33, que es la que produce un mayor grado de deshidratación, no es tan efectiva al momento de controlar infecciones fúngicas como la cepa PR40 que posee ambas cualidades, ya sea controlando el desarrollo de hongos en los fardos, como acelerando el deshidratado de las hojas de alfalfa, mejor aún que la cepas testigo.

A continuación, en la siguiente tabla, se presenta un resumen de los resultados obtenidos tanto para los enfrentamientos como los obtenidos en los ensayos de deshidratación. La puntuación asignada corresponde al radio en cm del crecimiento del hongo dentro de la placa de Petri.

Tabla 6: Enfrentamiento con cepas fúngicas y deshidratación. Resumen

| Cepa         | Cepas fúngicas evaluadas                         |         |  |         |   |         |                                   |         | Deshidratación |
|--------------|--|---------|--|---------|---|---------|-----------------------------------|---------|----------------|
|              | <i>Fusarium verticillioides</i><br>(diam. en cm) |         | <i>Aspergillus Flavus</i><br>(diam. en cm) |         | <i>Penicillium sp.</i><br>(diam. en cm) |         | <i>Mucor sp.</i><br>(diam. en cm) |         |                |
|              | 1 sem  | 2 sem   | 1 sem                                      | 2 sem   | 1 sem                                   | 2 sem   | 1 sem                             | 2 sem   |                |
| <b>JH642</b> | 4±0,1  | 8±0,1   | 4±0,1                                      | 8±0,1   | 1,5±0,1                                 | 4±0,1   | 4±0,1                             | 8±0,1   | <b>X</b>       |
| <b>HS</b>    | 1,5±0,1  | 1,5±0,1 | 2±0,1                                      | 2±0,1   | 1±0,1                                   | 1,2±0,1 | 3±0,1                             | 3,5±0,1 | √              |
| <b>PR2</b>   | 2±0,1  | 2±0,1   | 1,5±0,1                                    | 1,5±0,1 | 1±0,1                                   | 1,2±0,1 | 2,5±0,1                           | 2,5±0,1 | √              |
| <b>PR33</b>  | 2±0,1  | 2±0,1   | 1±0,1                                      | 1±0,1   | 1±0,1                                   | 1±0,1   | 2,5±0,1                           | 3±0,1   | √              |
| <b>PR39</b>  | 2±0,1  | 2±0,1   | 1±0,1                                      | 1,5±0,1 | 1±0,1                                   | 1,5±0,1 | 2,5±0,1                           | 3±0,1   | √              |
| <b>PR40</b>  | 2±0,1  | 2,5±0,1 | 1±0,1                                      | 1±0,1   | 1±0,1                                   | 1,5±0,1 | 3±0,1                             | 3±0,1   | √              |
| <b>ST</b>    | 4±0,1  | 8±0,1   | 4±0,1                                      | 8±0,1   | 1,5±0,1                                 | 4±0,1   | 4±0,1                             | 8±0,1   | <b>X</b>       |

Debemos recordar, como se mencionó anteriormente, que no se pueden comparar las cepas entre sí.

### 1.5. Tipificación de las cepas seleccionadas por secuenciación del ADN codificante para el ARN ribosomal 16S.

Para confirmar las identidades a nivel de género y tener una aproximación en la identidad de especie se procedió a la tipificación por secuenciación del ADN codificante para el ARN ribosomal 16S.

Con el objetivo planteado, se realizó la extracción del ADN cromosomal de las cepas, como se describe en Materiales y Métodos. Se analizó el resultado de la extracción y purificación del ADN corriéndolo sin diluir en un gel de agarosa al 0,7% junto con una cantidad conocida de marcador de peso molecular.

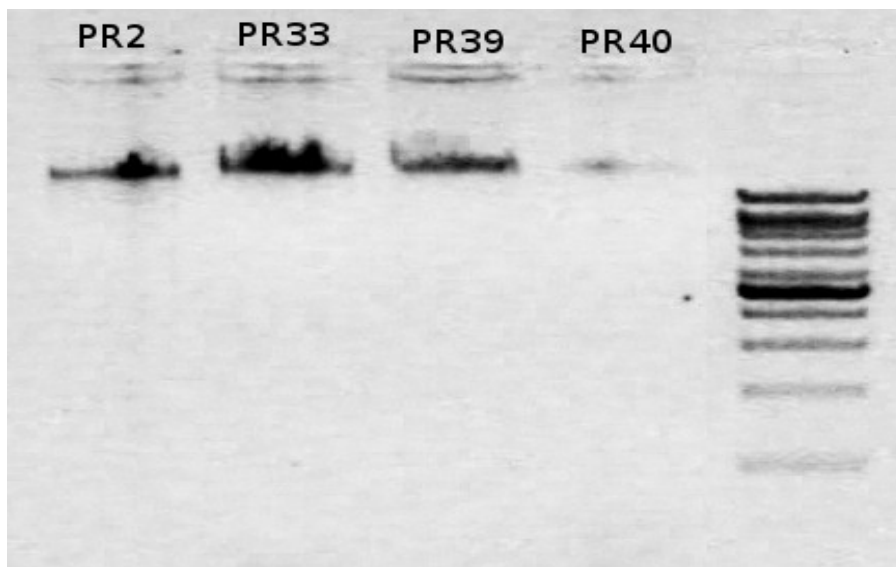


Figura 22: Muestras de ADN cromosomal corridas en gel de agarosa 0,7 %, teñidas con Bromuro de Etidio, y observadas en transiluminador UV.

Como era de esperar (en caso de una correcta y exitosa purificación del ADN), las bandas típicas entre 20 y 25 Kb correspondientes al ADN cromosomal se observan por encima de la banda más pesada (10 Kb) del marcador de peso molecular (figura 22).

Estas muestras de ADN cromosomal fueron remitidas al Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur Montevideo, Uruguay (<http://www.pasteur.edu.uy/>), donde se procedió a la amplificación de un fragmento de aproximadamente 1500 bases utilizando cebadores consenso para la amplificación del gen del ARN ribosomal 16S. El fragmento fue

purificado y secuenciado con cebadores específicos en el, obteniéndose aproximadamente 1100 bases secuenciadas del gen del ARN ribosomal 16S.

Las secuencias obtenidas (ej. Figura 23) fueron comparadas con las depositadas en el GenBank utilizando la herramienta BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) y en la base de datos Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

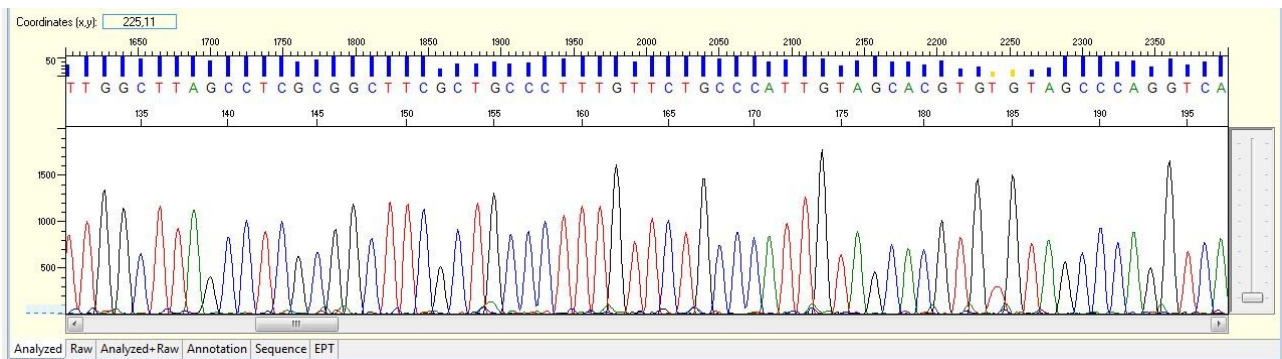


Figura 23: Ejemplo de fragmento de secuencia obtenida del producto de PCR del gen amplificado.

Las secuencias de oligonucleótidos utilizados y los tamaños de los fragmentos amplificados se detallan en la tabla que se muestra a continuación:

Tabla 7: Detalle de bases secuenciadas y cebadores utilizados para cada muestra.

| Identificación de muestra | Cantidad de bases | Cebador (5'-3')           |
|---------------------------|-------------------|---------------------------|
| PR33                      | 718               | 27F: AGAGTTTGATCMTGGCTC   |
| PR33                      | 775               | 16SR: AACTAGCGACTCCGACTTC |
| 2                         | 817               | 27F: AGAGTTTGATCMTGGCTC   |
| 2                         | 567               | 16SR: AACTAGCGACTCCGACTTC |
| 39                        | 787               | 27F: AGAGTTTGATCMTGGCTC   |
| 39                        | 752               | 16SR: AACTAGCGACTCCGACTTC |
| 40                        | 644               | 27F: AGAGTTTGATCMTGGCTC   |
| 40                        | 761               | 16SR: AACTAGCGACTCCGACTTC |

En todos los casos, fue posible ensamblar ambas secuencias, en un único contig (PR33: 1344 nt, PR2: 1318 nt, PR39: 1365 nt, PR40: 1307 nt).

El resultado de los diferentes alineamientos realizados en el Genbank se detalla a continuación (tabla 8) indicando en cada caso el mejor hit obtenido, el valor e y la cantidad de bases idénticas:

Tabla 8: Resultados de alineamientos de secuencias ensambladas.

| Muestra | Mejor Hit en Genbank              | e-value | Ident.          | Acc.N.         |
|---------|-----------------------------------|---------|-----------------|----------------|
| PR33    | <i>Bacillus subtilis</i>          | 0.0     | 1334/1343(99%)  | gb GU188885.1  |
| PR2     | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 0.0     | 1308/1316(99%)  | dbj AB301017.1 |
| PR39    | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 0.0     | 1357/1360(99%)  | gb KM378608.1  |
| PR40    | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 0.0     | 1305/1307 (99%) | gb KM378608.1  |

Tanto en la base de datos ribosomales como en el ncbi (Centro Nacional de información para la Biotecnología), los resultados obtenidos fueron concordantes. Se logró la identificación de todas las muestras hasta en nivel de género y con una buena presunción sobre el nivel de especie. Todas las muestras (según Taxonomy database –ncbi.nlm.nih.gov-):

Supereino: Bacteria; Phylum: Firmicutes; Clase: Bacilli; Orden: Bacillales; Familia: Bacillaceae; Género: Bacillus.

Todas las muestras (según Classifier de RDP)

U010181754|PR33      Root[100%]      Bacteria[100%]      Firmicutes[100%]  
 Bacilli[100%] Bacillales[100%] Bacillaceae 1[100%] Bacillus[100%]

U010181755|PR2      Root[100%]      Bacteria[100%]      Firmicutes[100%]  
 Bacilli[100%] Bacillales[100%] Bacillaceae 1[100%] Bacillus[100%]

U010181756|PR39      Root[100%]      Bacteria[100%]      Firmicutes[100%]  
 Bacilli[100%] Bacillales[100%] Bacillaceae 1[100%] Bacillus[100%]

U010181757|PR40      Root[100%]      Bacteria[100%]      Firmicutes[100%]  
 Bacilli[100%] Bacillales[100%] Bacillaceae 1[100%] Bacillus[100%]

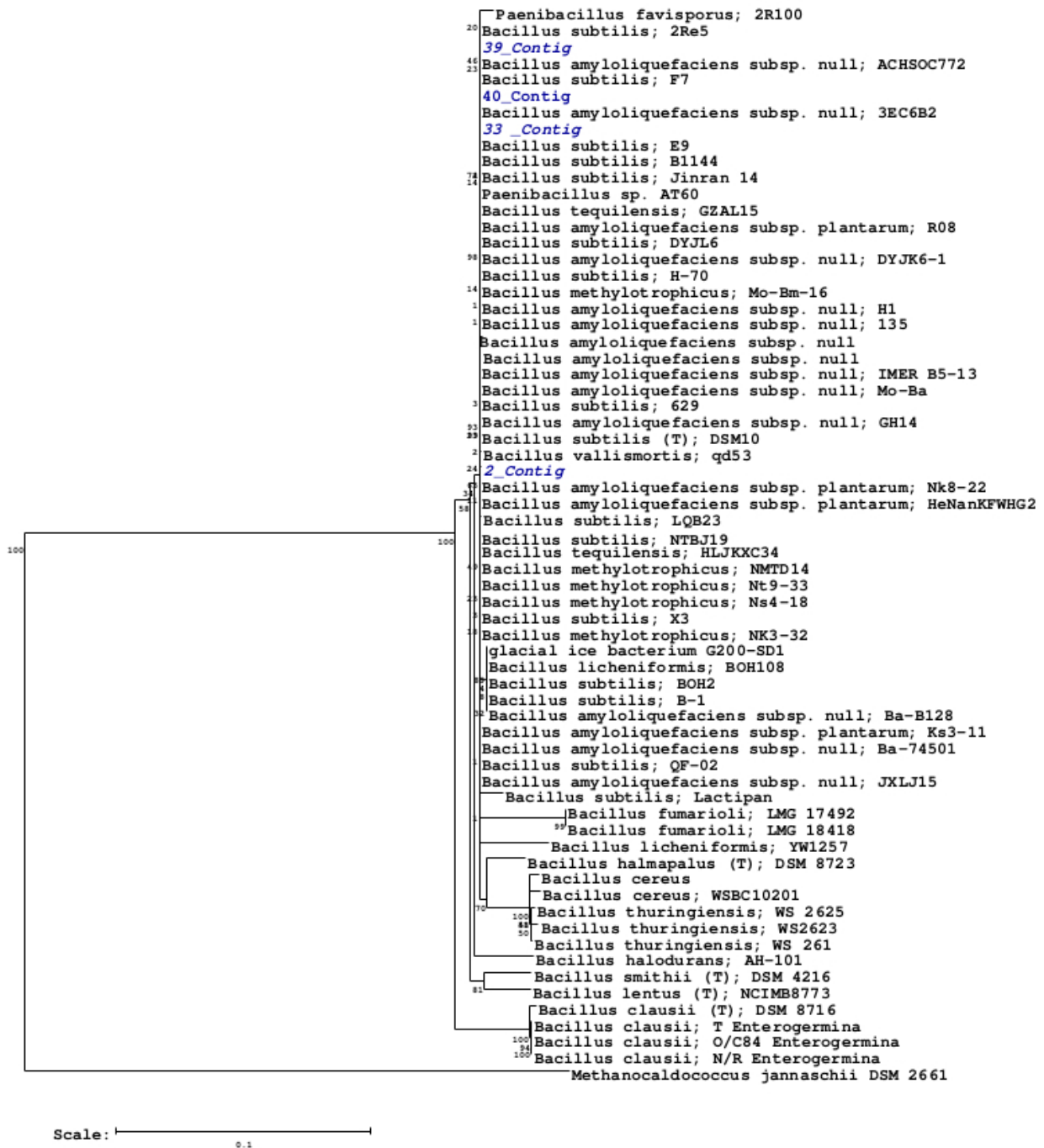


Figura 24: Arbol filogenético de las cepas aisladas.

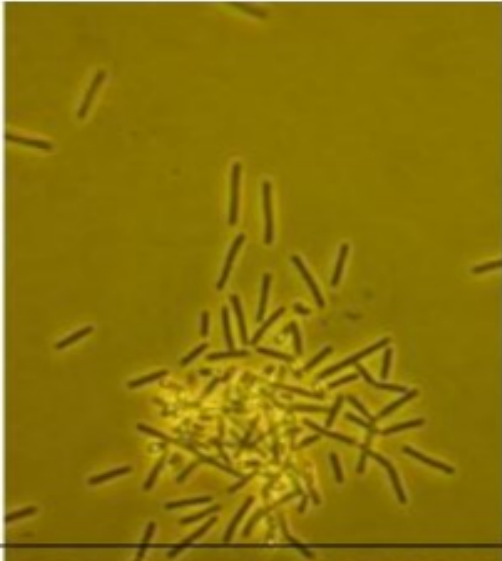
## 1.6. Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas seleccionadas.

Para caracterizar las cuatro cepas seleccionadas se realizaron: curvas de crecimiento, recuentos de células viables y esporas, su capacidad de formar

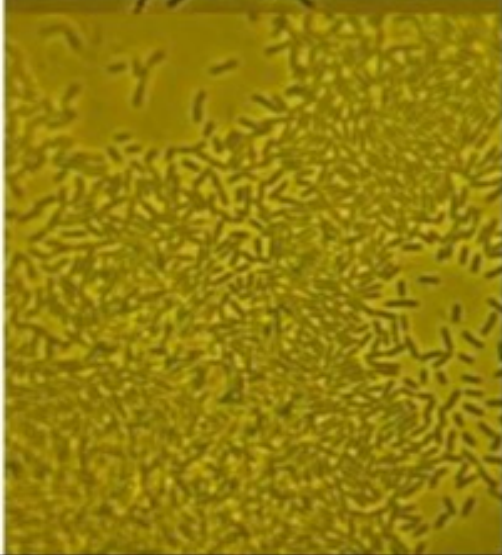
biofilms, tanto en medio sólido como en medio líquido, así como también, sus morfologías en placas de SM y al microscopio.

### **1.7. Observación macroscópica y microscópica de las cepas seleccionadas.**

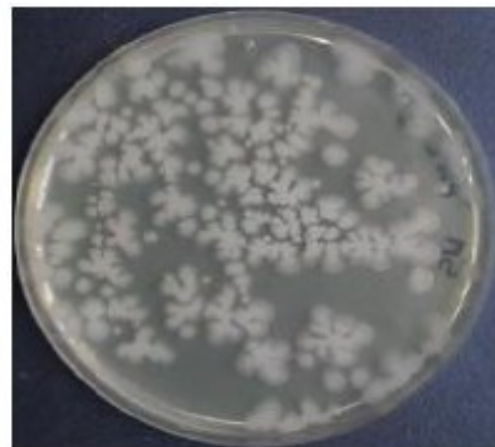
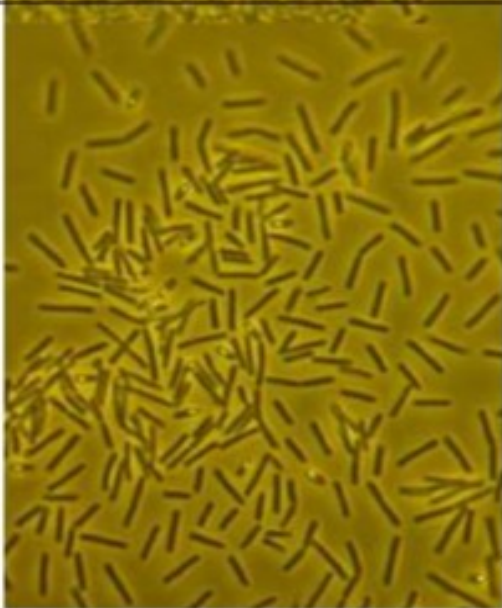
Las cepas se crecieron en medio sólido SM durante 24 hs a 37° C con el fin de conocer la morfología de las colonias y además observar al microscopio las células en condiciones de crecimiento bacteriano al llegar a la fase estacionaria. Los resultados obtenidos son los mostrados en la siguiente figura:



JH642



HS



PR2

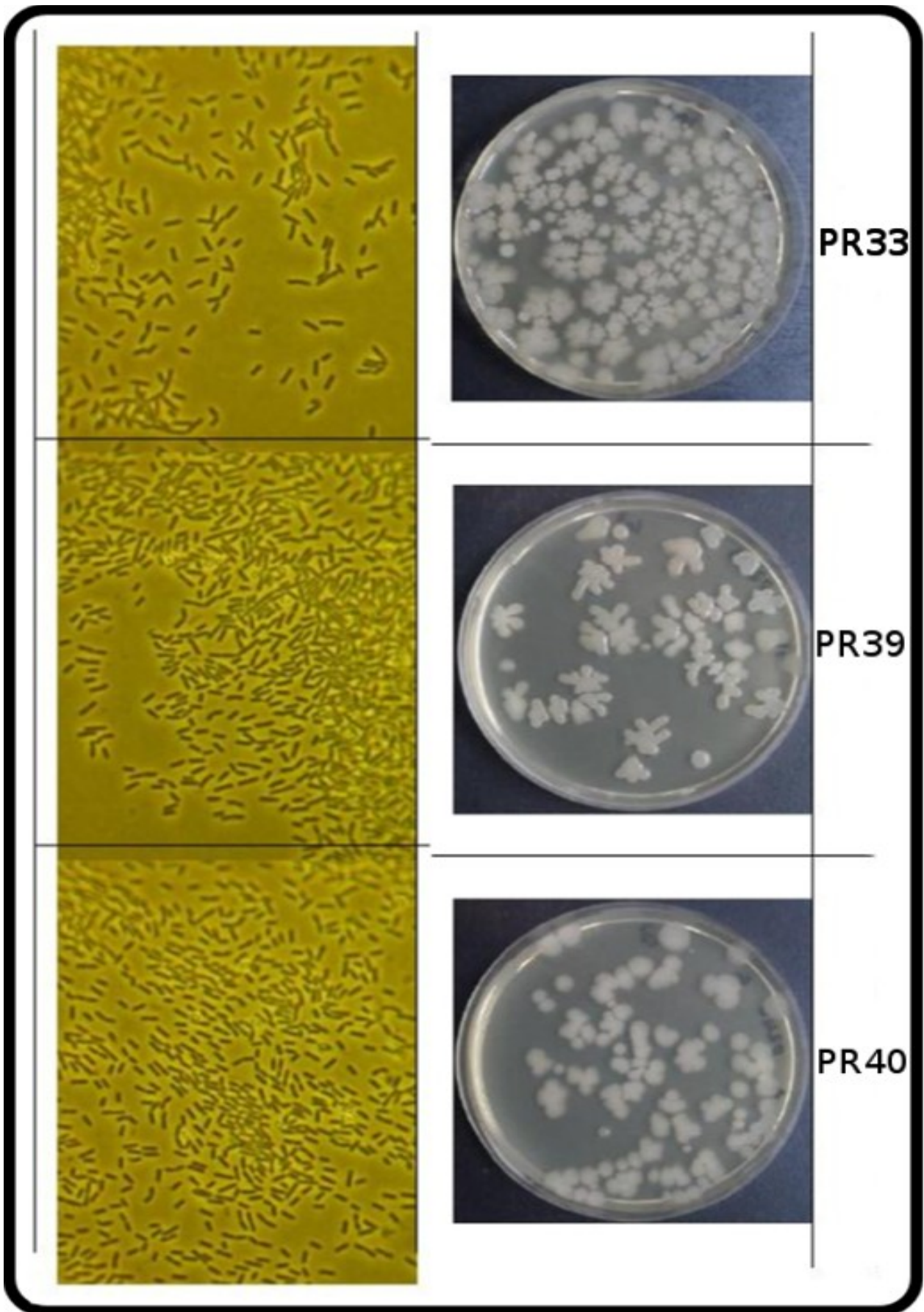


Figura 25: Caracterización de la morfología macroscópica y microscópica de las cepas seleccionadas.

### 1.8. Curvas de crecimiento.

Se realizaron las curvas de crecimiento en las condiciones de crecimiento descritas en Materiales y Métodos. Las cepas se crecieron en medio SM con el agregado de sales de esporulación y se siguió la evolución de la absorbancia a 525 nm. Luego se graficó la densidad óptica en función del tiempo obteniéndose las gráficas mostradas en las siguientes figuras.

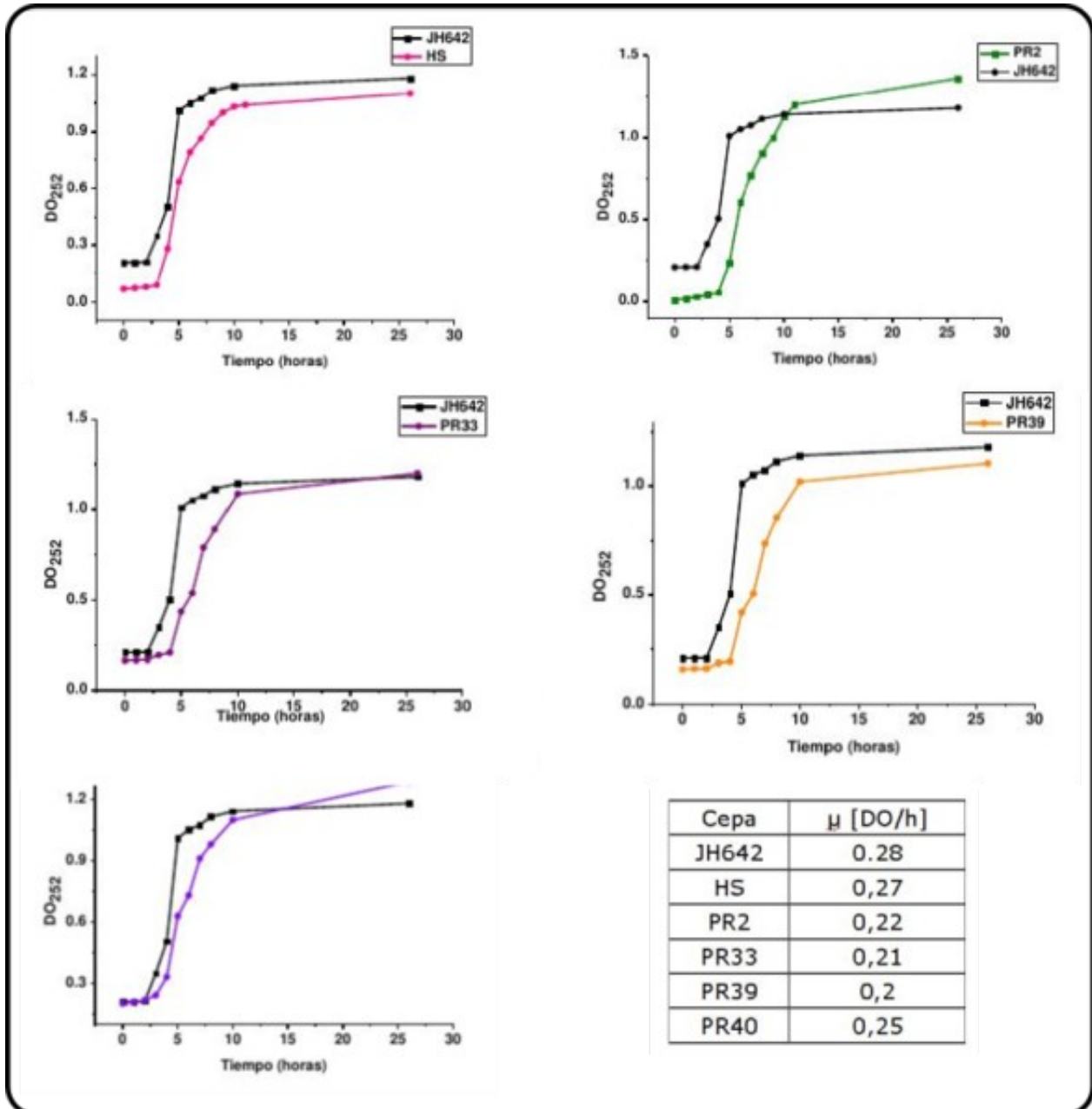


Figura 26: Curva de crecimiento de las cepas seleccionadas comparadas con JH642.

Como se puede observar en las figuras, estas cepas se desarrollan de manera comparativa respecto de la cepa control JH642. Esto estaría señalando que en condiciones de laboratorio, estas cepas serían capaces de multiplicarse y esporular de manera comparable a la cepa de referencia JH642.

### 1.9. Recuento de células viables y esporas.

Los recuentos de células viables y esporas se analizaron con el fin de conocer a escala de laboratorio el título máximo de masa celular que alcanzan las cepas de *Bacillus* seleccionadas y el rendimiento de la esporulación. Ambos son datos útiles al momento de realizar las estimaciones para la producción a escala industrial. Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

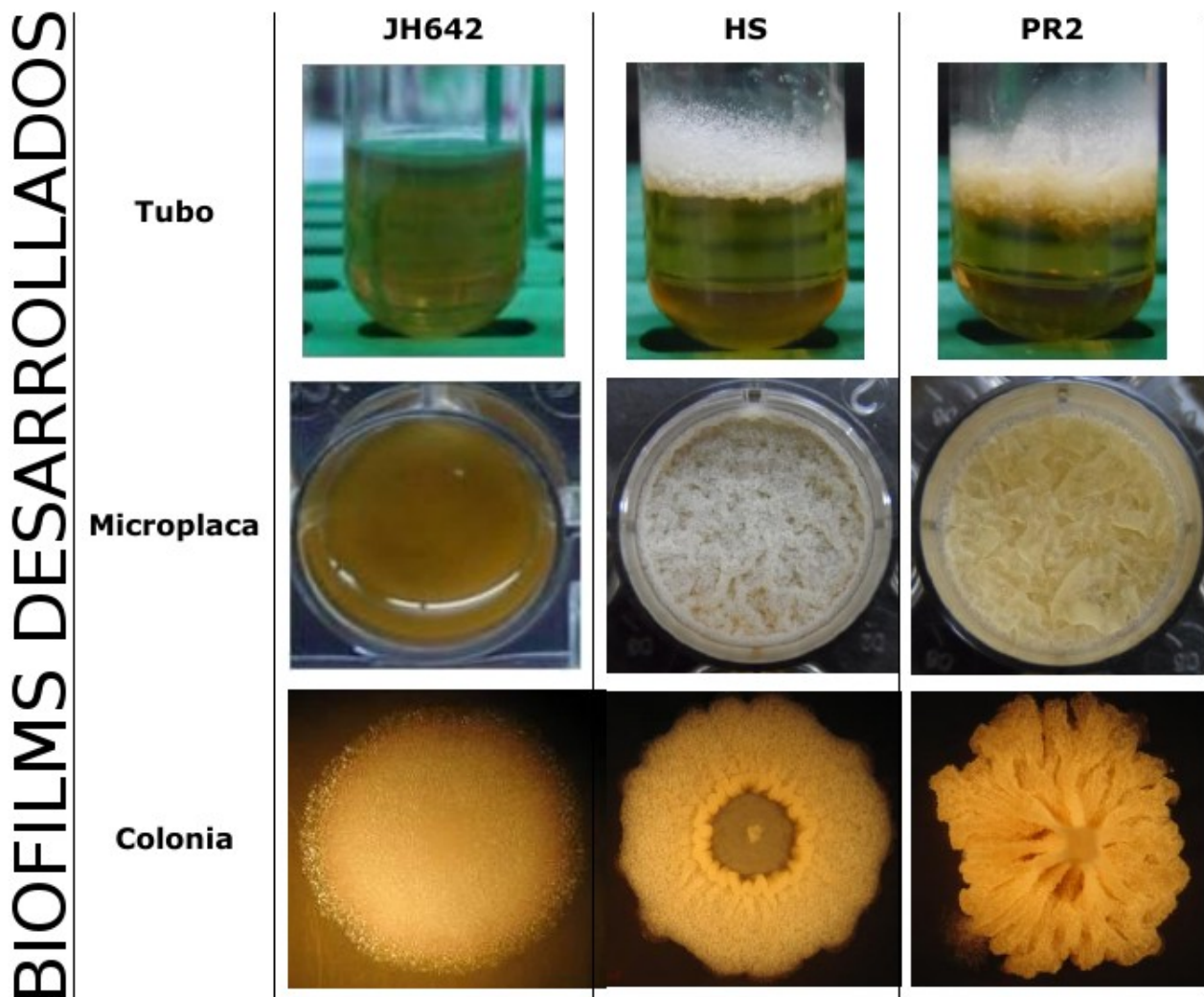
Tabla 9: Recuento de células viables y de esporas.

|  |  |  |
|--|--|--|
| <b>Rendimiento de esporulación JH642</b> | 20 horas   | 36 horas   |
|  | Título de células viables: $2 \times 10^8$<br>Título de esporas: $1,2 \times 10^8$   | Título de células viables: $5 \times 10^8$<br>Título de esporas: $5,0 \times 10^8$   |
| <b>Rendimiento de esporulación HS</b>    | 20 horas   | 36 horas   |
|  | Título de células viables: $5,1 \times 10^8$<br>Título de esporas: $4,8 \times 10^8$ | Título de células viables: $2,3 \times 10^9$<br>Título de esporas: $3,0 \times 10^9$ |
| <b>Rendimiento de esporulación PR2</b>   | 20 horas   | 36 horas   |
|  | Título de células viables: $2,9 \times 10^8$<br>Título de esporas: $2,5 \times 10^8$ | Título de células viables: $1,2 \times 10^9$<br>Título de esporas: $1,2 \times 10^9$ |
| <b>Rendimiento de esporulación PR33</b>  | 20 horas   | 36 horas   |
|  | Título de células viables: $1,7 \times 10^8$<br>Título de esporas: $1,6 \times 10^8$ | Título de células viables: $2 \times 10^9$<br>Título de esporas: $1,9 \times 10^9$   |
| <b>Rendimiento de esporulación PR39</b>  | 20 horas   | 36 horas   |
|  | Título de células viables: $6 \times 10^7$<br>Título de esporas: $2,5 \times 10^7$   | Título de células viables: $3 \times 10^8$<br>Título de esporas: $2,0 \times 10^8$   |
| <b>Rendimiento de esporulación PR40</b>  | 20 horas   | 36 horas   |
|  | Título de células viables: $5,1 \times 10^8$<br>Título de esporas: $3,0 \times 10^8$ | Título de células viables: $1,2 \times 10^9$<br>Título de esporas: $1,2 \times 10^9$ |

Todas las cepas alcanzan un 100% de esporas luego de 36 h. a escala de laboratorio, alcanzando un título que se encuentra en el orden de  $10^9$  UFC/mL, con excepción de PR39, cuyo título fue menor en todos los ensayos realizados.

### 1.10. Capacidad de formar biofilms sólidos y líquidos.

La capacidad de formar biofilm de los *Bacilli* está relacionada con su capacidad de colonizar superficies, de ahí su importancia en este trabajo, debido a que estas cepas deben ser capaces de colonizar la superficie de las hojas de las forrajeras. Esto se analizó tanto en medio sólido como en medio líquido. En medio sólido se sembraron las cepas en medio LBY en placas de Petri. Los biofilms líquidos se estudiaron en tubos de ensayos conteniendo LBY y se incubaron durante 24 h a 37 °C.



BIOFILMS DESARROLLADOS

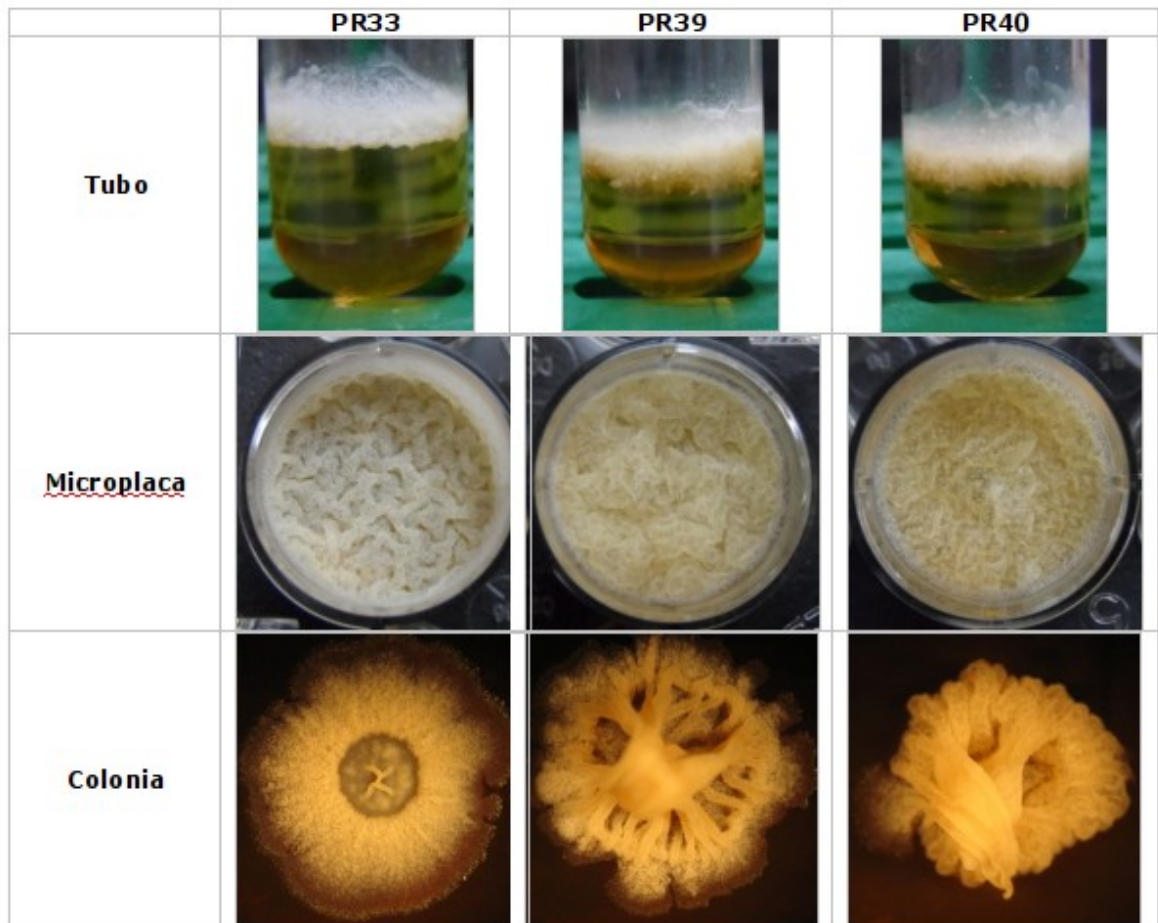


Figura 27: Capacidad de formar biofim.

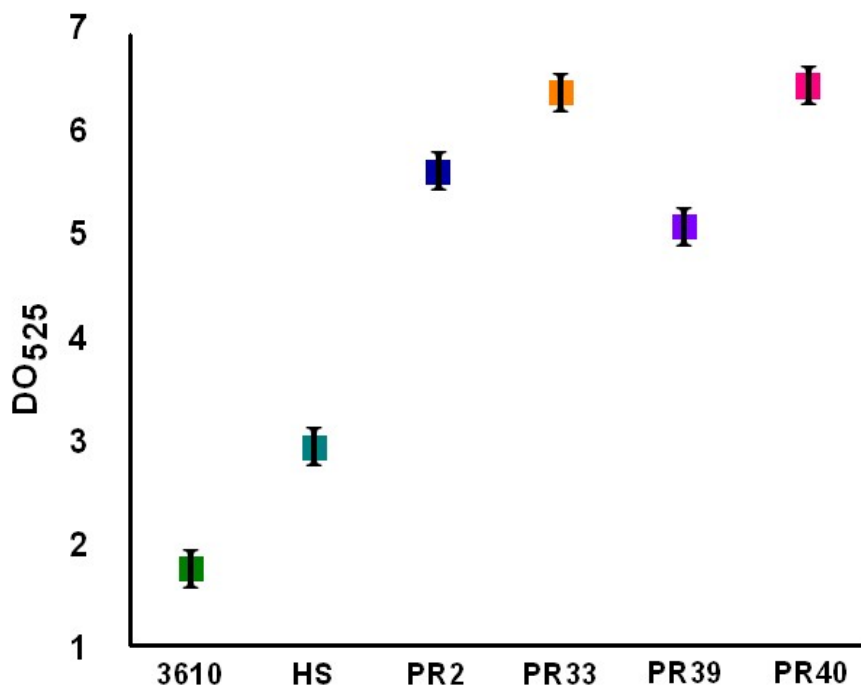
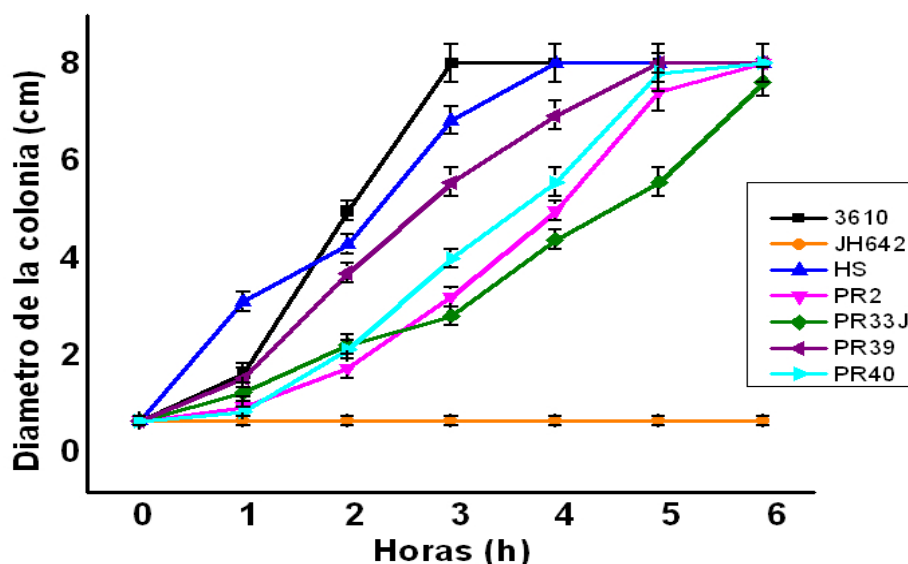


Figura 28: Cuantificación de biofilms formados por las cepas salvajes ya seleccionadas.

La cepa salvaje de laboratorio (no domesticada) NCIB3610 y todas las cepas aisladas fueron capaces de formar biofilms robustos, tanto en medio sólido como en medio líquido, lo que tentativamente, podría permitirnos inferir su buena calidad como agentes de biocontrol. De acuerdo con los resultados presentados en la figura 1.17, las cepas que formaron un biofilm más robusto fueron las cepas PR33 y PR40.

### 1.11. Capacidad de desplazarse en medio semi-sólido.

Este ensayo se llevó a cabo con el fin de determinar la capacidad de desplazarse sobre superficies que poseían las cepas seleccionadas, puesto que esta característica, que va de la mano con la capacidad de formar biofilm cuantificado en el ítem anterior, le conferiría a las cepas la capacidad de colonizar mayor cantidad de superficie vegetal en un determinado tiempo, dentro de los fardos de heno. Para llevar a cabo este ensayo se prepararon placas de LB con 0,7% de agar a fin de determinar la movilidad de las cepas seleccionadas en un medio semi-sólido y se registraron los diámetros de crecimiento de las colonias en el tiempo, como se describió en la sección de Materiales y Métodos.



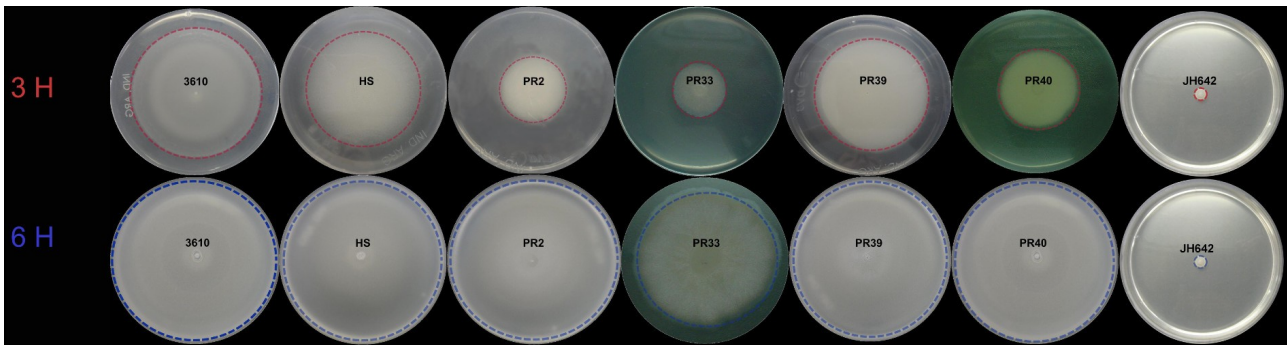


Figura 29: Ensayo de movilidad en medio semisólido.

En general, las cepas seleccionadas se desplazan en medio semi-sólido a velocidades comparables, con excepción de la cepa PR2 y PR33 dentro de las primeras 3 h., pero al cabo de 6 h. todas ellas cubren la superficie de la placa de Petri.

### 1.12. Ensayo de germinación de esporas sobre tejido vegetal.

Otra característica fundamental deseada, es que las cepas de *Bacilli* sean capaces de proliferar y esporular sobre el tejido vegetal, como se mencionó con anterioridad. Sabemos que las células de vida libre, interactúan con superficies bióticas y abióticas con el objetivo de proliferar, adquirir nutrientes y protegerse de distintos tipos de estrés ambiental. Algunas de las superficies bióticas son tejidos de hospedadores animales, vegetales y humanos. Poco se conoce acerca de las interacciones entre distintas cepas de *Bacillus* y los ambientes naturales donde habita. Además, puesto que los productos comerciales utilizados para el biocontrol de patógenos de plantas, son comercializados en forma de esporas, es de particular interés el estudio del ciclo del *Bacillus* en la naturaleza.

Para esto, nos propusimos en primera instancia, verificar si las esporas de los *Bacilli* seleccionados son capaces de germinar al ser expuestas a la mezcla de germinación AFGK (ver Materiales y Métodos 3.2.12), puesta a punto para las cepas de referencia 168, JH642 y NCIB3610. De acuerdo con la técnica, puesto que las esporas de *Bacillus* son refráctiles a una  $DO_{550}$  y las células viables no, se monitoreó la caída de densidad óptica ante el agregado de germinantes tradicionales según está detallado en la bibliografía (Harwood y

## *Capítulo 1*

Cutting 1990). De esta manera se pretende comparar las velocidades a la cual germinan dichas esporas y así poder comparar con las cepas de uso de laboratorio, tanto domesticadas JH642 como salvajes NCIB3610. En la siguiente figura se presenta la germinación de las cepas seleccionadas en comparación con el control JH642 y 3610 ante el agregado del germinante AFGK y la cepa sin el agregado del mismo, por último se presenta un esquema con las velocidades iniciales de germinación a fin de poder comparalas entre sí.

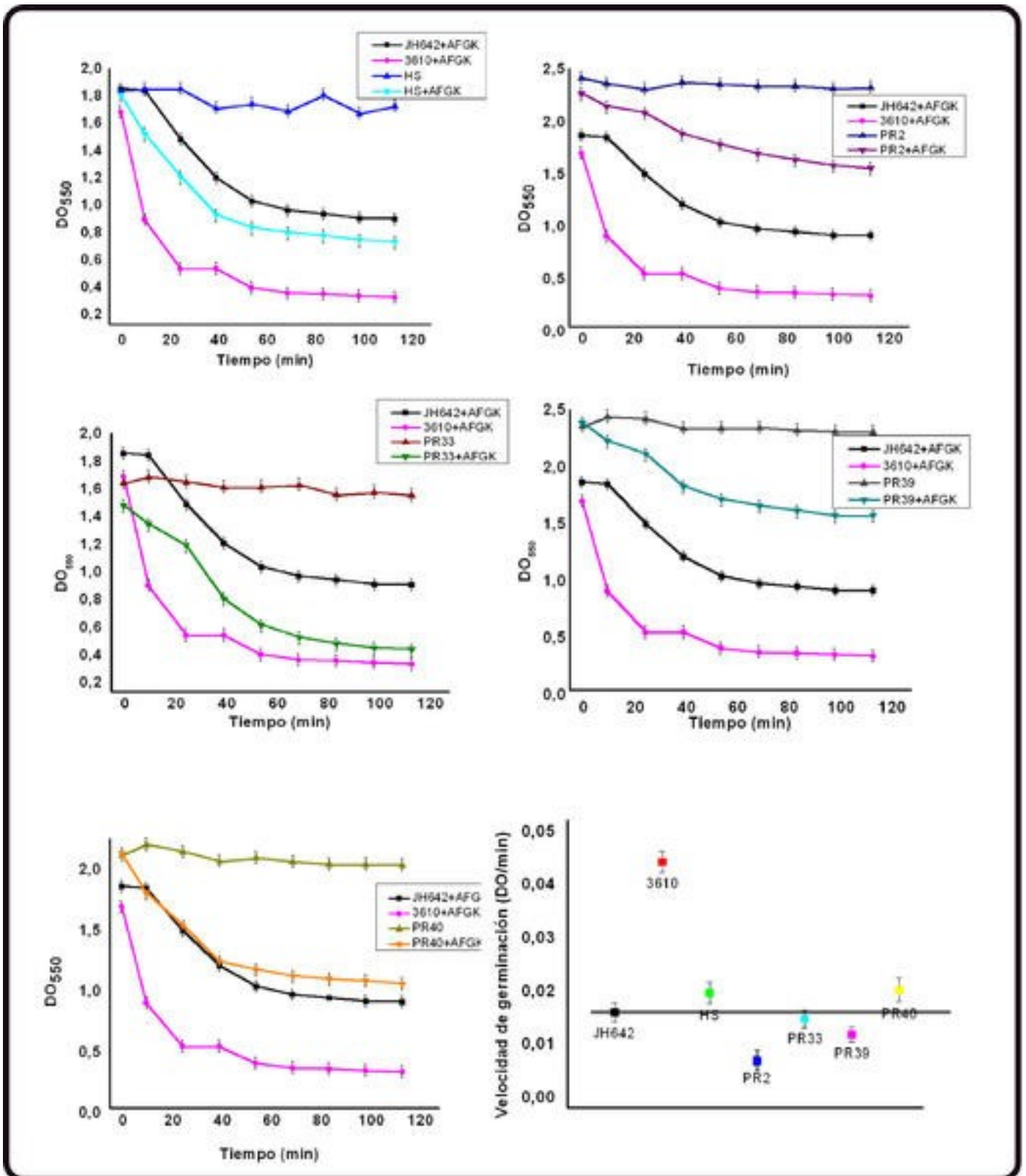
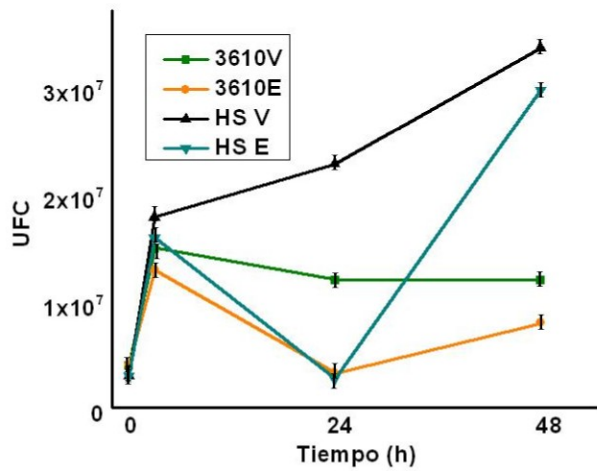


Figura 30: Germinación de esporas con la mezcla de germinantes, AFGK.

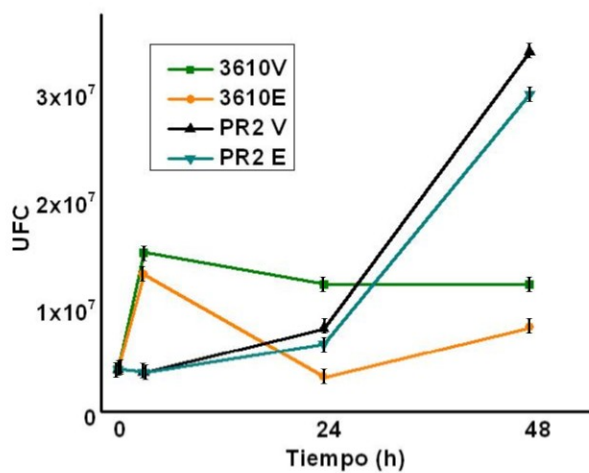
## Capítulo 1

Como se puede observar en las gráficas de germinación, la cepa 3610 germina con mayor velocidad inicial que el resto de las cepas, sin embargo las cepas seleccionadas para la formulación del producto deshidratante, PR33, PR39, PR40 germinaron con velocidades iniciales comparables entre si y con los controles JH642 y HS, mientras que la cepa PR2 germina mucho más lentamente.

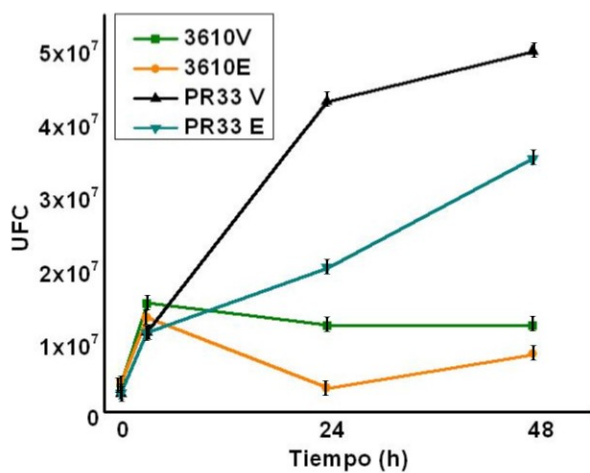
De acuerdo con los resultados obtenidos, las esporas de *Bacillus* aisladas son capaces de germinar al ser expuestas al germinante estandarizado para *B. subtilis* NCIB3610, AFGK. Continuando con la misma línea de razonamiento, la siguiente pregunta fue: ¿Estas esporas, son capaces de proliferar, luego de germinar y estar en contacto con tejido vegetal? Para poder responder este interrogante se procedió a seguir la evolución del inóculo a través de recuento de células viables y de esporas sobre hojas de tejido de la alfalfa a distintos tiempos.



| Tiempo | 3610              |                   |      | HS                |                   |      |
|--------|-------------------|-------------------|------|-------------------|-------------------|------|
|        | V                 | E                 | %    | V                 | E                 | %    |
| 0      | $4 \times 10^6$   | $4 \times 10^6$   | 100  | $3 \times 10^6$   | $3 \times 10^6$   | 100  |
| 3      | $1,5 \times 10^7$ | $1,3 \times 10^7$ | 65   | $1,8 \times 10^7$ | $1,6 \times 10^7$ | 85   |
| 24     | $1,2 \times 10^7$ | $6,6 \times 10^6$ | 27   | $2,3 \times 10^7$ | $2,7 \times 10^6$ | 12   |
| 48     | $1,2 \times 10^7$ | $8 \times 10^6$   | 82,5 | $3,4 \times 10^7$ | $3 \times 10^7$   | 88,2 |



| Tiempo | 3610              |                   |      | PR2               |                   |     |
|--------|-------------------|-------------------|------|-------------------|-------------------|-----|
|        | V                 | E                 | %    | V                 | E                 | %   |
| 0      | $4 \times 10^6$   | $4 \times 10^6$   | 100  | $4 \times 10^6$   | $4 \times 10^6$   | 100 |
| 3      | $1,5 \times 10^7$ | $1,3 \times 10^7$ | 65   | $4,9 \times 10^6$ | $4,9 \times 10^6$ | 100 |
| 24     | $1,2 \times 10^7$ | $6,6 \times 10^6$ | 27   | $7,9 \times 10^6$ | $6,4 \times 10^6$ | 81  |
| 48     | $1,2 \times 10^7$ | $8 \times 10^6$   | 82,5 | $5 \times 10^7$   | $3,5 \times 10^7$ | 70  |



| Tiempo | 3610              |                   |      | PR33              |                   |      |
|--------|-------------------|-------------------|------|-------------------|-------------------|------|
|        | V                 | E                 | %    | V                 | E                 | %    |
| 0      | $4 \times 10^6$   | $4 \times 10^6$   | 100  | $2,6 \times 10^6$ | $2,6 \times 10^6$ | 100  |
| 3      | $1,5 \times 10^7$ | $1,3 \times 10^7$ | 65   | $1,3 \times 10^7$ | $1,3 \times 10^7$ | 100  |
| 24     | $1,2 \times 10^7$ | $6,6 \times 10^6$ | 27   | $4,3 \times 10^7$ | $2 \times 10^7$   | 46,5 |
| 48     | $1,2 \times 10^7$ | $8 \times 10^6$   | 82,5 | $5 \times 10^7$   | $3,5 \times 10^7$ | 70   |

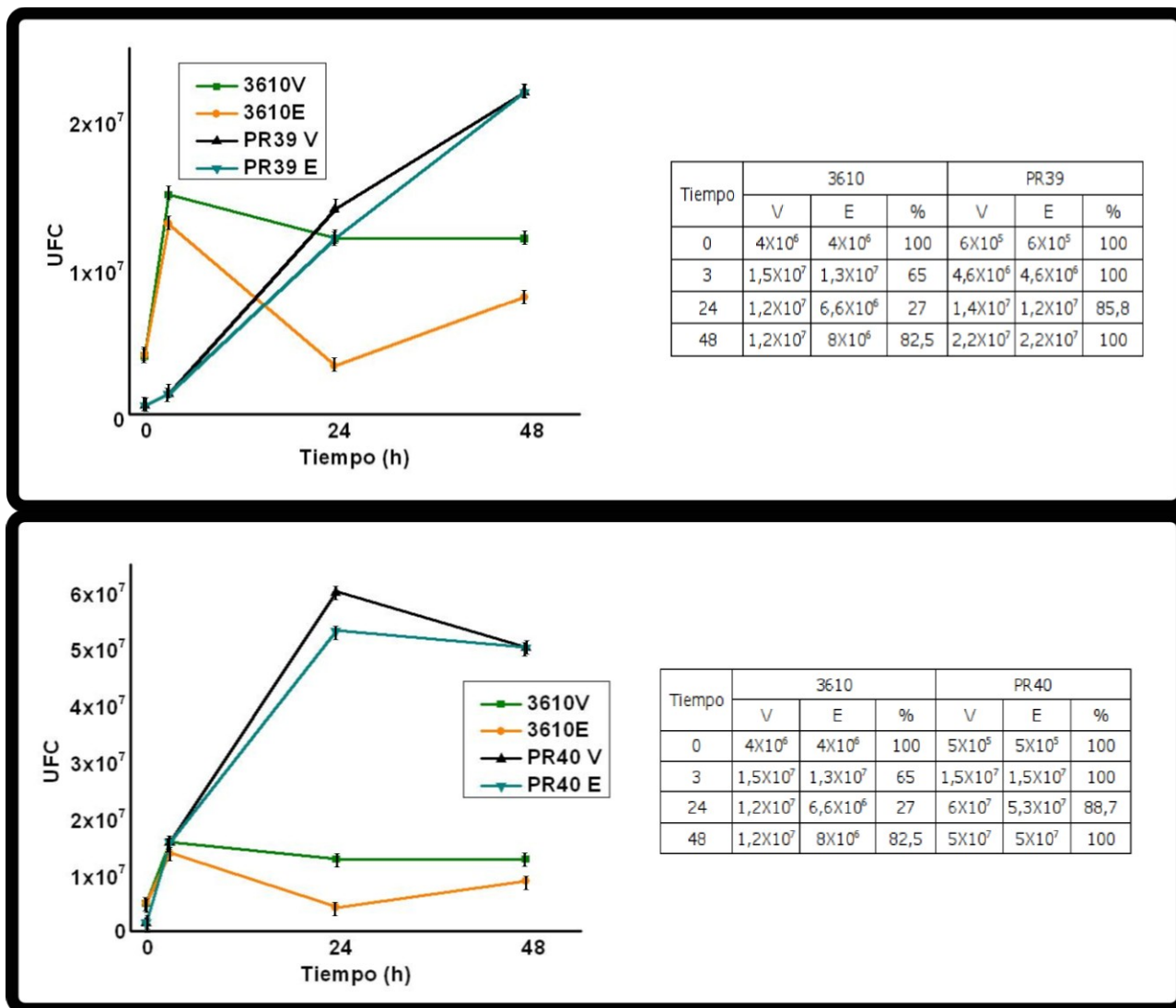


Figura 31: Germinación de las esporas sobre tejido vegetal y evolución del crecimiento y esporulación.

Las cepas 3610 y PR33 a las 3 h aumentan un orden respecto del título inicial, PR40 aumenta 2 órdenes, PR2 y PR39 pareciera que no germinan en un principio. Luego de 24 h todas tienen un orden más (o 2 en algunos casos) con excepción de la cepa PR2. Por último, a las 48 h, todas las cepas se mantienen en el orden de  $1 \cdot 10^7$ . Los porcentajes de esporulación van variando, ya que germinan, crecen y esporulan nuevamente. Comparando con los resultados obtenidos de la germinación con AFGK, PR2 que presentó una velocidad de germinación menor que las otras cepas seleccionadas. Ambos ensayos son consistentes, puesto que, es la cepa que germina con menor velocidad en comparación con las demás cepas ensayadas.

En conjunto estos estudios son de importancia ya que varias cepas de *Bacillus* aisladas del suelo, usadas como agentes de biocontrol, son capaces de proteger plantas de patógenos tanto fúngicos como bacterianos. Esta protección se sabe que está asociada con la formación de comunidades multicelulares tales como la formación de biofilms y a sus propiedades de movilidad, la cual le permite acceder a ciertos nichos que sean más favorables. De aquí la fundamental importancia del estudio de la germinación y la proliferación de estas cepas asociadas con la síntesis de productos de interés agroindustrial dependientes del crecimiento bacteriano y su ciclo celular.

### 1.13. Ensayos con mini-fardos.

El ensayo con mini-fardos se llevó a cabo con el fin de conocer, en primera instancia, actividad controladora de hongos de las cepas seleccionadas en un ensayo que, si bien continúa siendo a escala de laboratorio, era un desafío de las cepas seleccionadas ante la exposición a *Fusarium verticillioides* (F.v.), uno de los principales contaminantes de los henos. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Tabla 10: Recuento en mini-fardos.

|                           |  |                     |                   |                   |                   |
|---------------------------|--|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Mini-fardos<br>JH642+F.v. | <i>Bacillus</i> /minifardo:                      | Sin <i>Bacillus</i> | $1 \times 10^5$   | $1 \times 10^6$   | $1 \times 10^7$   |
|                           | <i>Fusarium verticillioides</i><br>(UFC totales) | $6.4 \times 10^4$   | $6,1 \times 10^4$ | $5 \times 10^4$   | $5,7 \times 10^4$ |
| Mini-fardos<br>HS+F.v.    | <i>Bacillus</i> /minifardo:                      | Sin <i>Bacillus</i> | $1 \times 10^5$   | $1 \times 10^6$   | $1 \times 10^7$   |
|                           | <i>Fusarium verticillioides</i><br>(UFC totales) | $6.4 \times 10^4$   | $2.1 \times 10^4$ | $1.1 \times 10^4$ | $2.1 \times 10^3$ |
| Mini-fardos<br>PR2+F.v.   | <i>Bacillus</i> /minifardos:                     | Sin <i>Bacillus</i> | $1 \times 10^5$   | $1 \times 10^6$   | $1 \times 10^7$   |
|                           | <i>Fusarium verticillioides</i><br>(UFC totales) | $6.4 \times 10^4$   | $9,0 \times 10^3$ | $6,0 \times 10^3$ | $2,0 \times 10^3$ |
| Mini-fardos<br>PR33+F.v.  | <i>Bacillus</i> /minifardos:                     | Sin <i>Bacillus</i> | $1 \times 10^5$   | $1 \times 10^6$   | $1 \times 10^7$   |
|                           | <i>Fusarium verticillioides</i><br>(UFC totales) | $6.4 \times 10^4$   | $2,3 \times 10^4$ | $1.5 \times 10^4$ | $1.1 \times 10^4$ |
| Mini-fardos<br>PR39+F.v.  | <i>Bacillus</i> /minifardos:                     | Sin <i>Bacillus</i> | $1 \times 10^5$   | $1 \times 10^6$   | $1 \times 10^7$   |
|                           | <i>Fusarium verticillioides</i>                  | $6.4 \times 10^4$   | $1.6 \times 10^4$ | $1.4 \times 10^4$ | $1,3 \times 10^4$ |

| Mini-fardos | Bacillus/minifardo:                              | Sin Bacillus      | $1 \times 10^5$   | $1 \times 10^6$   | $1 \times 10^7$   |
|-------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| PR40+F.v.   | <i>Fusarium verticillioides</i><br>(UFC totales) | $6.4 \times 10^4$ | $6.6 \times 10^3$ | $3.5 \times 10^3$ | $3.2 \times 10^3$ |

Los recuentos fúngicos se llevaron a cabo luego de 10 días del inoculo inicial (*Fusarium verticillioides*  $6.4 \times 10^4$ ).

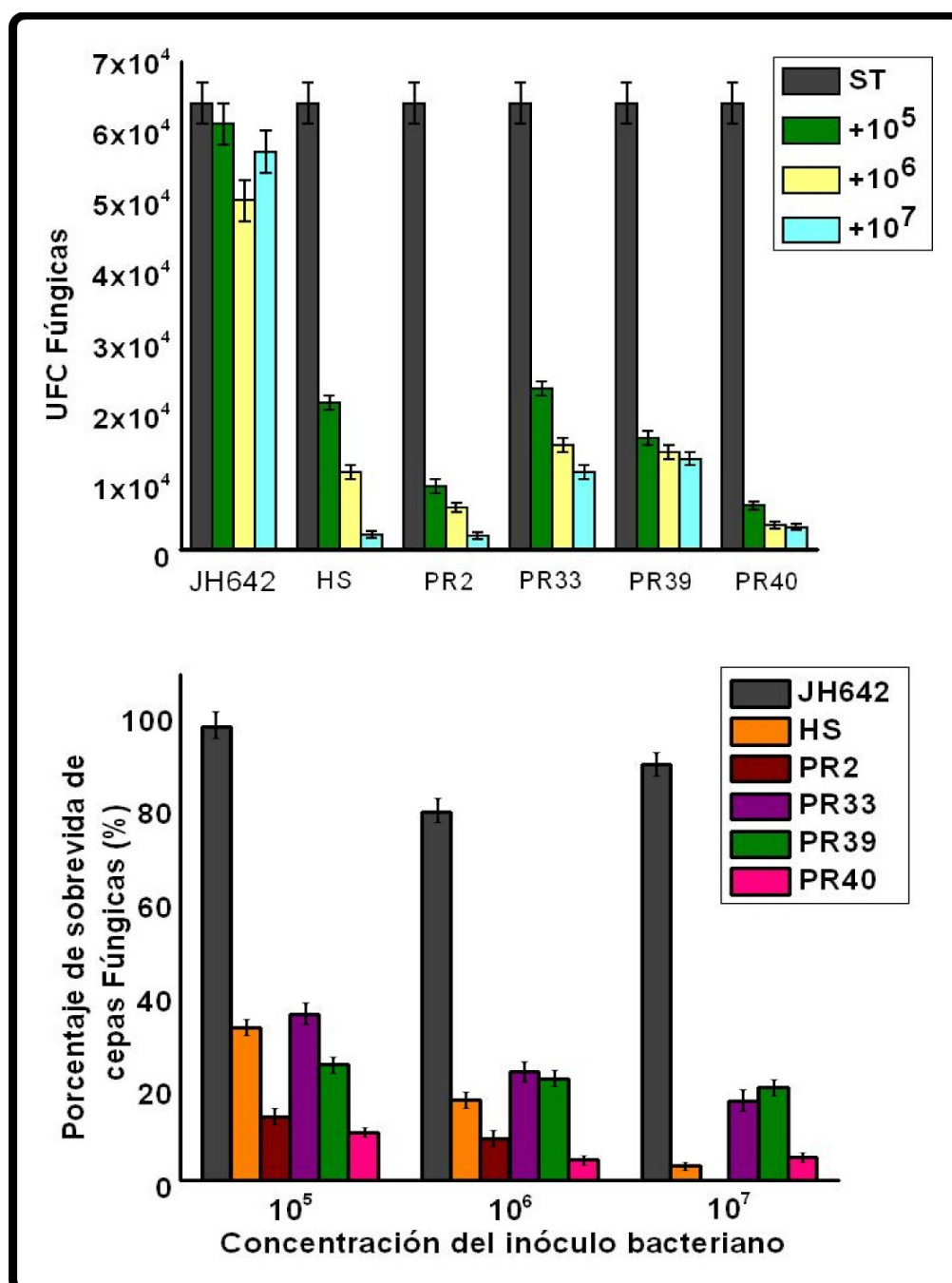


Figura 32: Recuento de cepas fúngicas obtenido luego de la inoculación con distintas concentraciones de las cepas de bacilos seleccionadas. (ST: sin tratamiento, HS: Henosilo)

Como se puede observar en la figura 32, basándonos en los resultados obtenidos, las cepas PR40 y PR2 son las cepas que presentaron el mejor comportamiento al ser enfrentadas a la cepa fúngica usada como control, *Fusarium verticillioides*, en distintas concentraciones de *Bacillus*, incluso presentaron mejores resultados que la cepa comercial Heno Silo, la cual es usada como control positivo.

### 1.14. Procesamiento de muestras de henos.

Con base en el convenio de cofinanciamiento con la empresa Biotay SA., la misma nos envió muestras de heno proveniente de campos de la región pampeana de nuestro país, con el fin de detectar la presencia de otras cepas fúngicas, además de las ensayadas, capaces de contaminar los fardos. Luego de aisladas las distintas cepas fúngicas, se procedió mediante procedimientos de estudios taxonómicos, a la identificación y posterior enfrentamiento con las cepas de *Bacilli* seleccionadas. A continuación, en la figura 33, se muestra una placa de Petri con un aislamiento representativo de la flora fúngica presente en las muestras.

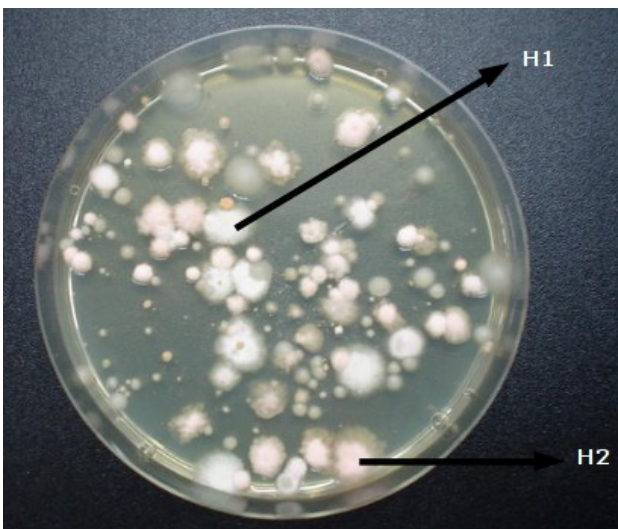


Figura 33: Hongos contaminantes de los fardos.

En la imagen se muestra que se pudo detectar al menos dos tipos de cepas fúngicas preponderantes en los henos analizados. A partir de estas colonias, se procedió a aislar e identificar según claves taxonómicas presentes en la literatura y el asesoramiento profesional del CEREMIC (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmaceuticas-UNR).

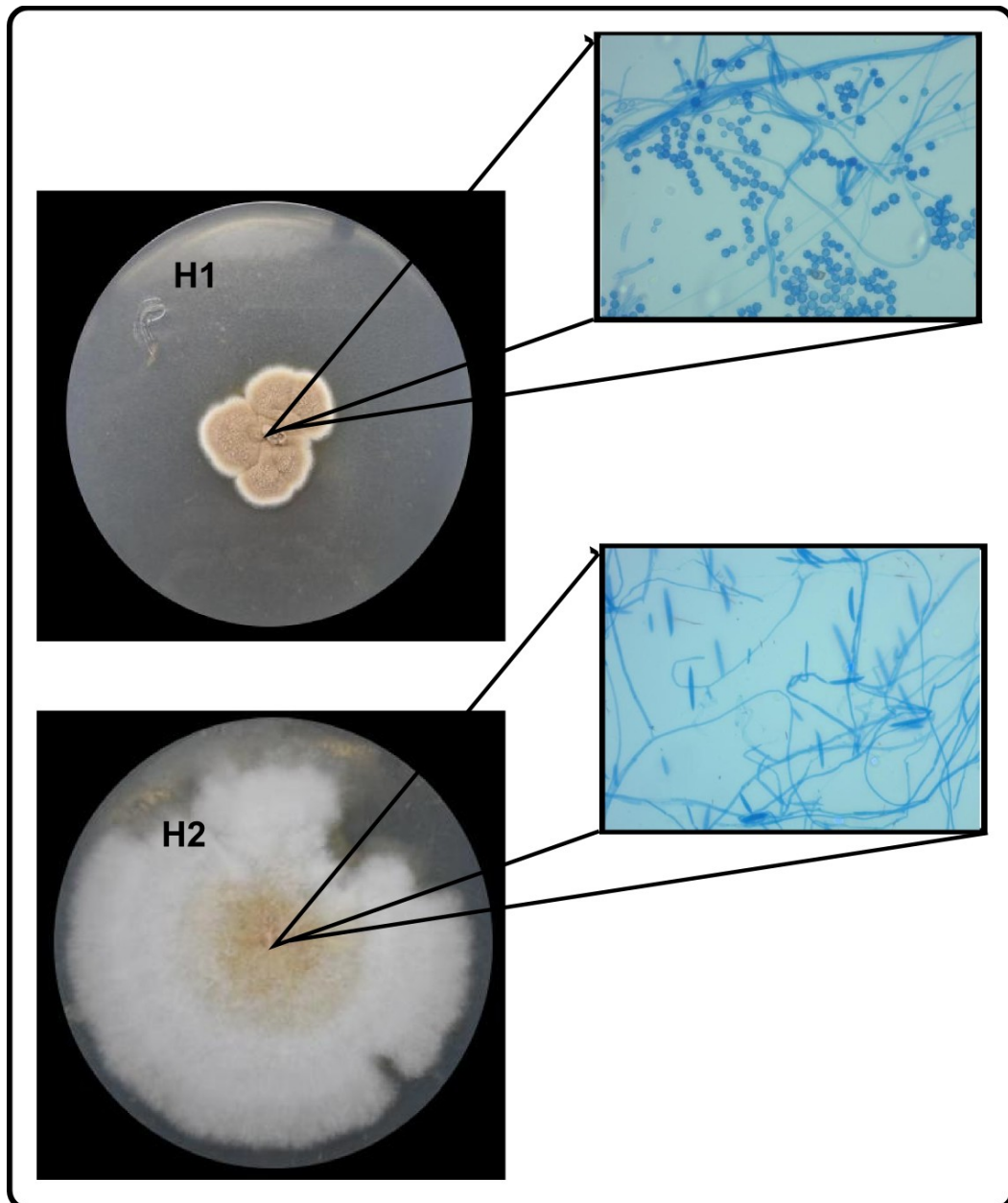


Figura 34: Hongos contaminantes de los fardos (40x).

Los hongos aislados fueron identificados como:

H1: *Scopulariopsis brevicaulis* (Domsch y col., 2007)

H2: *Fusarium semitectum* (Leslie y Summerell, 2006)

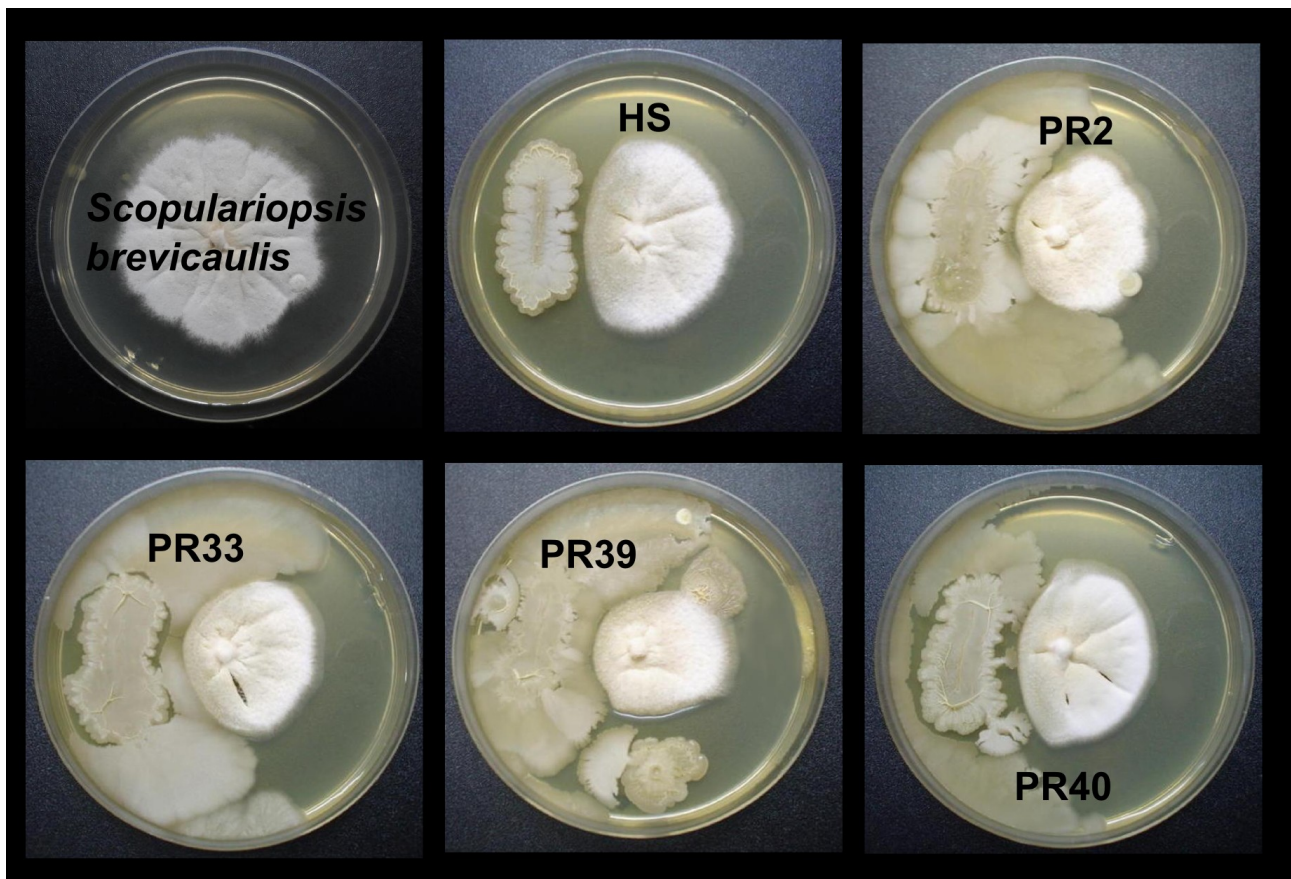
Tanto *Fusarium semitectum* como *Scopulariopsis brevicaulis* son hongos contaminantes típicos de henos, además *Scopulariopsis brevicaulis* es patógeno oportunista para humanos.

## Capítulo 1

Estos hongos aislados luego fueron enfrentados en placas con las cepas de *Bacillus* seleccionadas, como se describió anteriormente, con el fin de verificar la capacidad de estas cepas para controlar cepas fúngicas salvajes, las cuales se conoce, por lo reportado en la bibliografía, que poseen en principio, poseen mayor virulencia que aquellas cepas fúngicas mantenidas y repicadas continuamente en el laboratorio.

Como se aprecia en las siguientes figuras, todas las cepas seleccionadas fueron capaces de controlar los hongos salvajes aislados de muestras de henos naturales (es decir provenientes del campo).

### ***Scopulariopsis brevicaulis***



### ***Fusarium semitectum***

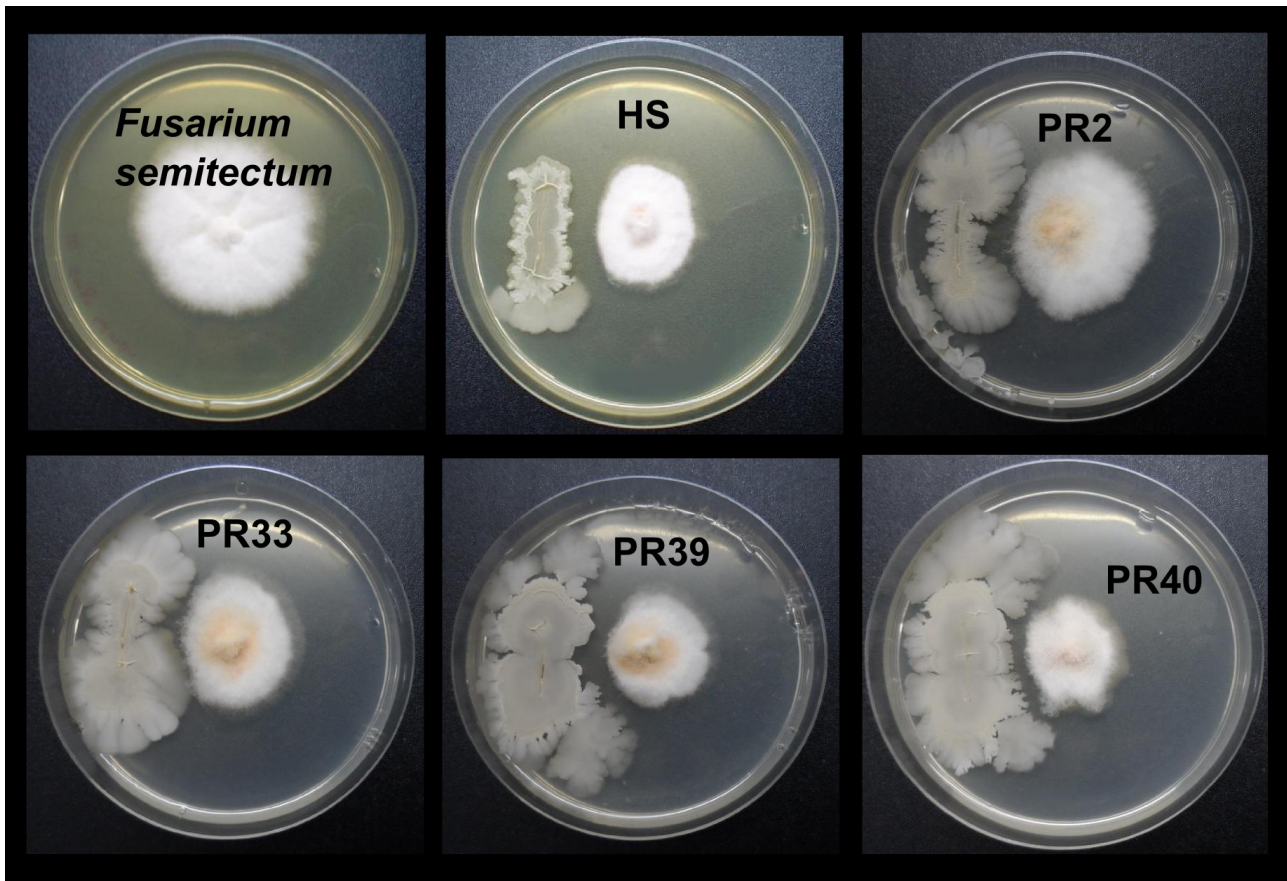


Figura 35: Enfrentamiento con hongos aislados.

Como podemos observar, la actividad de las cepas seleccionadas, varía según las condiciones de ensayo. Si bien los ensayos iniciales fueron llevados a cabo en el laboratorio *in vitro* o a pequeña escala, es importante que se ensayen a campo bajo las condiciones de aplicación final del producto. Aun así los resultados de los ensayo en ambas etapas son comparables entre sí resultando que; en todos los casos la cepa PR40 mostraba una mayor eficiencia tanto en el acelerado de la deshidratación como para el control del desarrollo de hongos contaminantes que la cepa control. Además esta cepa posee un alto rendimiento en la esporulación, lo que significaría una disminución de costos para la producción.

Durante la campaña primavera-verano (2015-2016) se realizarán ensayos de henificación a campo con el fin de corroborar (o no) total o parcialmente, los resultados y conclusiones a escala de laboratorio aquí presentados.

## Capítulo 2

**Mecanismos de movimiento sobre superficie. Características del sliding.**

Las bacterias son capaces de colonizar las superficies de muchos ambientes naturales diferentes. Dependiendo de la disponibilidad de nutrientes y condiciones del medio, las bacterias pueden permanecer localizadas sobre una superficie, mudarse para colonizar otras áreas más grandes, invadir tejido hospedador o formar cuerpos fructíferos para producir esporas y esperar la llegada de temporadas más favorables. Todos estos mecanismos forman parte de lo que se conoce como comportamiento social bacteriano (Vlamakis y col., 2013). Como grupo, las bacterias que viven en colonias sobre superficies, tienen varias ventajas sobre las células individuales. Ellas pueden optimizar:

(a) el crecimiento y la supervivencia; ya que dentro de la colonia se encuentran presentes distintos tipos de células que realizan funciones especializadas.

(b) accesibilidad a los nutrientes.

(c) los mecanismos de defensa para la protección contra la desecación y antagonistas.

Las bacterias tanto en ambientes naturales como en el laboratorio, interactúan de forma dinámica con la superficie, para detectar señales ambientales, así como la presencia de otras bacterias. Se secretan polisacáridos y surfactantes, entre otros compuestos bioactivos, para formar biofilms, que promueven la adhesión bacteriana, la supervivencia, y el movimiento.

Varias cepas de *Bacillus* aisladas de ambientes naturales (suelo), son usadas como agentes de biocontrol. Estas ofrecen una alternativa más amigable que los agentes químicos usados para el control de plagas y enfermedades. Las mismas son capaces de proteger plantas de patógenos, tanto fúngicos como bacterianos. Esta protección, se sabe que está asociada con la formación de comunidades multicelulares; tales como la formación de

biofilms y a sus propiedades de movilidad, lo cual le permite acceder a ciertos nichos que le sean más favorables.

Varias décadas atrás se identificaron distintos tipos de mecanismos de movilidad bacteriana y éstos son fundamentalmente: swimming, swarming, gliding, twitching y sliding. Se sabe que el swimming y el swarming son movimientos dependientes de la presencia de flagelo. Se ha demostrado que el twitching requiere el uso de pili tipo VI al igual que algunas formas de gliding, mientras que el sliding se considera una forma pasiva, el cual es producido por las fuerzas expansivas de una colonia que crece en combinación con la reducción de la tensión superficial que se ha observado en muchas bacterias. Así como el sliding, el swarming y el twitching también dependen de la concentración de agar, la cual resulta óptima entre 0,3% -0,7% de agar, y es críticamente dependiente de la secreción de compuestos tensoactivos tales como peptidolípidos, glicolípidos, y lipopolisacáridos (Kearns y Losick, 2003; Kearns, 2010).

Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* presenta movilidad tipo swarming en placas de 0,5 a 1% de agar en presencia de fuentes de carbono y nitrógeno específicos. Como describieron Murray y Kazmierczak (2008), mutantes dobles en la cepa PAO1, que no expresan ni flagelos ni pili tipo IV, presentan movilidad tipo sliding en las mismas condiciones, además observaron que reconstituyendo la síntesis de pili tipo IV el sliding se inhibió, mientras que el swarming disminuyó en ausencia de producción de tensoactivo. Estos autores proponen que *P. aeruginosa* requiere flagelos para poder desplazarse a través del movimiento tipo swarming a fin de superar las interacciones adhesivas mediadas por el pili de tipo IV. La aparente dependencia del sliding con las señales ambientales y las vías regulatorias que también afectan la movilidad tipo swarming sugiere que ambas formas de desplazamiento están influenciadas por factores cohesivos similares que restringen la translocación, así como por la síntesis de factores dispersivos que facilitan la difusión (Murray y Kazmierczak, 2008).

Otro ejemplo son las micobacterias. Las micobacterias son microorganismos Gram-positivos no flagelados. Que anteriormente se

consideraban inmóviles, sin embargo Martínez y col. (1999) demostraron que *Mycobacterium smegmatis*, un patógeno oportunista, puede expandirse sobre la superficie del medio de cultivo por un mecanismo de deslizamiento. *M. smegmatis* se expande como una monocapa de células que están dispuestas en pseudofilamentos por contactos célula a célula, principalmente a lo largo de su eje longitudinal. La monocapa se aleja del punto de inoculación como una unidad con reordenamientos menores. No hay estructuras extracelulares como pili o fimbrias que parezcan estar implicados en este proceso. La capacidad de trasladarse sobre la superficie se correlaciona con la presencia de glicopeptidolípidos, una clase de molécula específica de micobacteria, con características anfífilas localizadas en la capa más externa de la envoltura celular. Esta forma de la movilidad podría desempeñar un papel importante en la colonización de la superficie por micobacterias en el medio ambiente, así como en el hospedador. Por lo tanto, de nuevo el deslizamiento de las bacterias parece requerir la presencia de, en este caso, glicopeptidolípidos en la superficie celular, debido a que células que carecen de GPLs, no presentan este tipo de translocación (Martínez y col., 1999). Otro claro ejemplo de como la movilidad sobre superficie y su relación con la virulencia fue descrito por Grossman y col. (1995) cuando analizan la capacidad invasiva de *S. typhi* serotipo H1-d y H1-j, aisladas de pacientes con una infección clínica debida a dicho patógeno.

Entonces, si las bacterias usan el sliding como una forma cooperativa para moverse a través de superficies sin necesidad de usar flagelos o algún tipo de apéndice, ¿cómo se produce y regula este tipo movimiento?

Para estudiar este comportamiento, se utilizaron dos cepas de *Bacillus subtilis* salvajes (no domesticadas) de diferentes linajes genéticos. Por un lado, la cepa NCIB3610, descendiente de la cepa Marburg, llamada así debido a que fue originalmente aislada de Malburgo, Alemania a principios del siglo XX, (Zeigler y col., 2008), capaz de realizar swarming y sliding (Branda y col., 2001; Kearns y Losick 2003; Kinsinger y col., 2003).

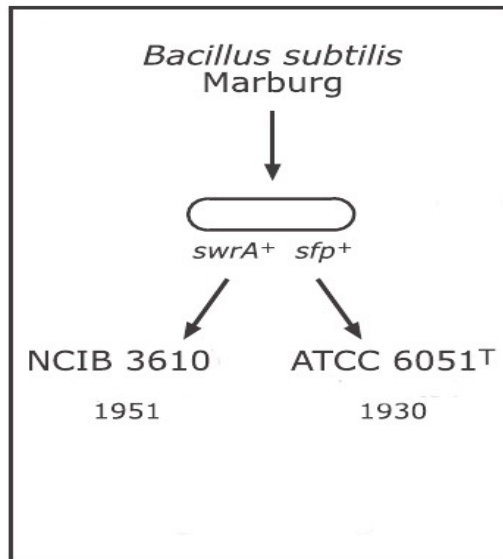


Figura 36: Origen de la cepa NCIB3610. (Zeigler y col., 2008)

Por el otro la cepa RG4365 *B. subtilis natto* (BSN), llamada así debido a que fue aislada a partir del alimento típico de origen japonés Nattó, el cual es un fermento que se prepara a base de porotos de soja y este bacilo (Lombardía y col., 2006; VidyaLaxme y col., 2014). Por estudios previos realizados en nuestro laboratorio, se sabe que, *Bacillus subtilis natto*, en medio líquido es completamente inmóvil, mientras que en placas de LB agar 0,7% eran capaces de desplazarse mucho más lentamente que la cepa NCIB3610 (Lombardía y col., 2006; VidyaLaxme y col., 2014).

Un factor esencial para el movimiento tipo swimming y swarming de la cepa NCIB3610 es el flagelo, como se mencionó anteriormente, el motor que impulsa estos movimientos (Trejo y col., 2013). Por el contrario, la cepa RG4365, crecida con agitación en cultivo líquido, era completamente inmóvil.

Con el fin de determinar la presencia o no de flagelo en ambas cepas, se realizó la tinción del mismo tal como se describió en la sección de Materiales y Métodos, bajo las condiciones examinadas: en medio líquido o sobre medio semi sólido (swimming y swarming respectivamente). Como se puede observar en la figura 37 A, las células de *B. subtilis* NCIB3610 poseen flagelos y fueron móviles al observarlos al microscopio. En contraste, las células de *B. subtilis* RG4365 sólo eran móviles en placas de agar semi sólido, pero sin flagelos. En cultivo líquido, las células de la cepa RG4365 también estaban desprovistas de flagelos y era completamente inmóviles (imagen derecha 37 B), tal como se

reportó para *Mycobacterium smegmatis*, y se mencionando en párrafos anteriores.

Para confirmar la dispensabilidad de la producción de los flagelos para la movilidad asociada a la superficie que posee la cepa RG4365, procedimos a deletar el gen *hag*, implicado en la síntesis de la subunidad de la flagelina (Mirel y Chamberlin, 1989) del flagelo (Cutting, 2011).

Como se muestra en la figura 37 C, la cepa isogénica RG4365 mutante en *hag* fue capaz de deslizarse sobre la superficie del agar a la misma velocidad que su cepa parental RG4365 luego de 24 h de incubación a 37 °C. Del mismo modo, la inactivación del gen *hag* en la cepa NCIB3610 inhibió su capacidad para desplazarse a través de superficies semi sólidas luego de 20 h de incubación (dato no mostrado).

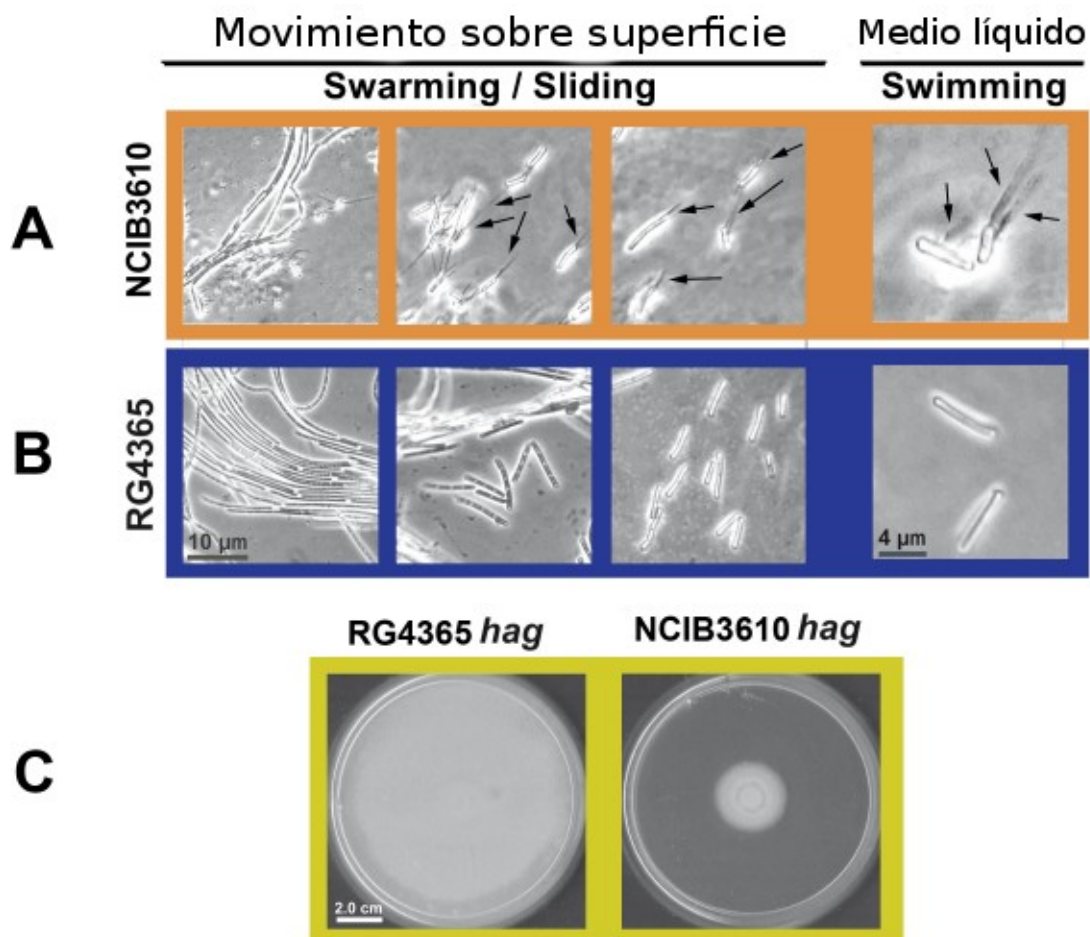


Figura 37:(A) Bajo todas las condiciones examinadas (swarming y swimming) las células de *B. subtilis* NCIB3610 poseen flagelos y son móviles. Las flechas indican la presencia de los flagelos teñidos.(B) células de RG4365 donde se evidencia la ausencia de flagelos(C) Sliding en background *hag*-

De esta manera confirmamos la capacidad de la cepa de origen japonés RG4365 de desplazarse únicamente a través del sliding, puesto que es capaz de desplazarse en medio semi-sólido de manera independiente de flagelo. Basándonos en estos resultados procedimos a estudiar este comportamiento en comparación con la cepa NCIB3610 y JH642. En la figura 38, se muestra la comparación de las distintas velocidades de desplazamiento de las cepas en medio semi-sólido.

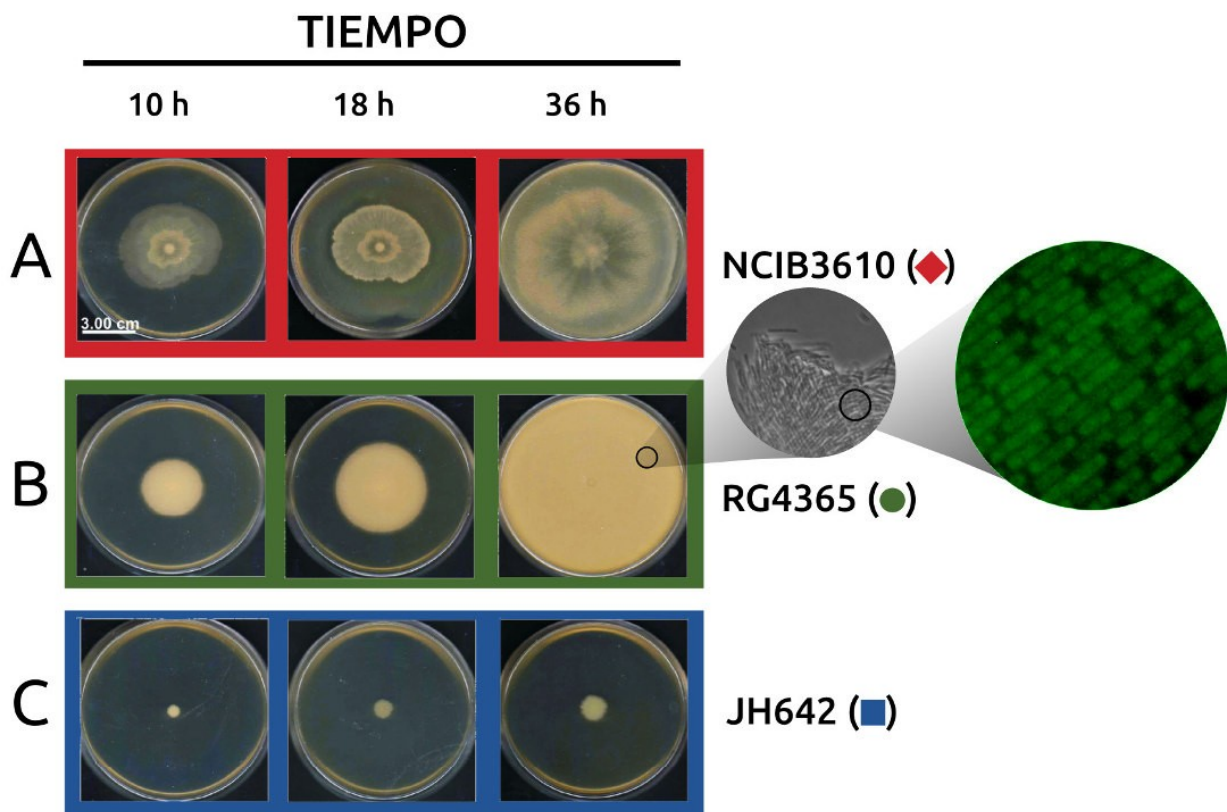


Figura 38: Movimiento en superficie de distintas cepas de *B. subtilis*. (A) cepa no domesticada relacionada con la cepa Marburg de *B. subtilis* NCIB3610. (B) cepa RG4365, BSN. (C) cepa domesticada de laboratorio JH642. Fotografías tomadas después de la incubación durante 10h, 18h, 36h en placas de Petri que contiene medio LB con 0,7% de agar a 37 °C.

Para este ensayo, las cepas se inocularon en el centro de la placa y se incubaron a 37°C. Analizando la figura 38 A, se muestra la capacidad de la cepa NCIB3610 para cubrir rápidamente la superficie del medio de cultivo, en el cual en principio se puede observar un “frente acuoso” de avance, formado

por la producción de surfactina de las células del borde. Este lipopéptido con efecto antimicrobiano producido por el género *Bacillus* es indispensable para el movimiento sobre superficie dependiente de flagelo (Kearns y Losick 2003). En (B), la cepa RG4365 necesita un tiempo de incubación más largo para desplazarse (como sería de esperar una cepa que sólo es capaz de deslizarse), puesto que carece de flagelo, pero luego de 5 h de incubación fue posible observar una monocapa uniforme y altamente hidrofóbica de células que cooperativa y uniformemente, avanza en grandes filamentos constituidos por células en contacto unas con otras, a lo largo del eje radial y a través de la placa de agar, tal como se muestra en la ampliación de la imagen tomadas mediante un microscopio de contraste de fase y fluorescencia de la cepa RG4365. Para esto, se retiró cuidadosamente una muestra de bacterias provenientes de la colonia en deslizamiento activo. Mientras que en (C), como era de esperar, la cepa domesticada de *B. subtilis* JH642 fue incapaz de desplazarse debido a que posee una mutación en el gen (*sfp*) esencial para la síntesis de surfactina y una mutación de corrimiento del marco de lectura en el gen regulador *swrA* (Bais y col., 2004). Esta es la razón por la que esta cepa domesticada en el laboratorio es incapaz de moverse sobre superficies sólidas aunque sea capaz de producir flagelo. (Kearns y Losick 2003)

En contraste, las cepas no domesticadas NCIB3610 y RG4365 no poseen esas mutaciones y por lo tanto son capaces de desplazarse sobre superficies sólidas (Emmert y Handelsman, 1999; Trejo y col., 2013).

Como se indicó en la sección introductoria, el factor de transcripción SinR, es el regulador maestro para la expresión génica responsable de la regulación positiva del movimiento tipo swimming y el swarming (Blair y col., 2008). Por otro lado SinR reprime la expresión de los genes necesarios para la síntesis de la matriz del biofilm (Kearns y col., 2005), además, reprime la expresión del factor de transcripción, SlrR, el cual es un represor de los genes  $\sigma^D$ -dependientes. Este factor sigma alternativo es responsable de la expresión de los genes de movilidad y de quimiotaxis, incluyendo el gen *hag*. La actividad de SinR es controlada además, por la interacción con su antagonista SinI.

Mientras SinR se expresa constitutivamente, SinI está bajo el control positivo de la forma fosforilada del factor de transcripción, Spo0A.

Tal como se esperaba, la inactivación de *sinR* en la cepa NCIB3610, produce un fenotipo de swarming completamente defectuoso, mientras que para la cepa BSN esta mutación, no afecta el fenotipo del movimiento tipo sliding, figura 39 B. Por lo tanto, podemos concluir que SinR, que controla el swimming y el swarming, no está implicado en la regulación del sliding. Lo que lleva a la siguiente pregunta; ¿cuál es el factor de transcripción involucrado en la regulación de este movimiento?

En *Bacillus subtilis*, el factor de transcripción maestro Spo0A es quien gobierna el desarrollo de actividades multicelulares, tales como la formación de biofilms, cuerpos fructíferos y la esporulación a través del phosphorelay. Sabiendo que SinR no está involucrado en la regulación del sliding, nos preguntamos si el regulador maestro Spo0A estaría involucrado. Para responder este nuevo interrogante se llevó a cabo un ensayo de desplazamiento en medio semi sólido con ambas cepas salvajes y sus distintas mutantes. Como se muestra en la figura 39, la supresión del gen *spo0A*, produjo una cepa totalmente incapaz de moverse a través del sliding. Esto estaría sugiriendo que el factor de regulación maestro Spo0A, responsable de la formación de biofilms y esporas, estaría regulando este tipo de desplazamiento sobre la superficie. Puesto que Spo0A es el regulador maestro de la esporulación, un proceso de desarrollo en múltiples etapas. Nos propusimos verificar si existe una relación entre la esporulación y la movilidad tipo sliding, para esto, se inactivó el gen *spoIIAC* ( $\sigma^F$ ), el gen distal dentro del operón tricistrónico *spoIIA* que codifica para el primer factor de transcripción específico de esporulación, Sigma F, a partir del cual se inicia el camino irreversible de la esporulación. Como se puede observar en la Figura 39 D, esto no afectó el fenotipo de sliding.

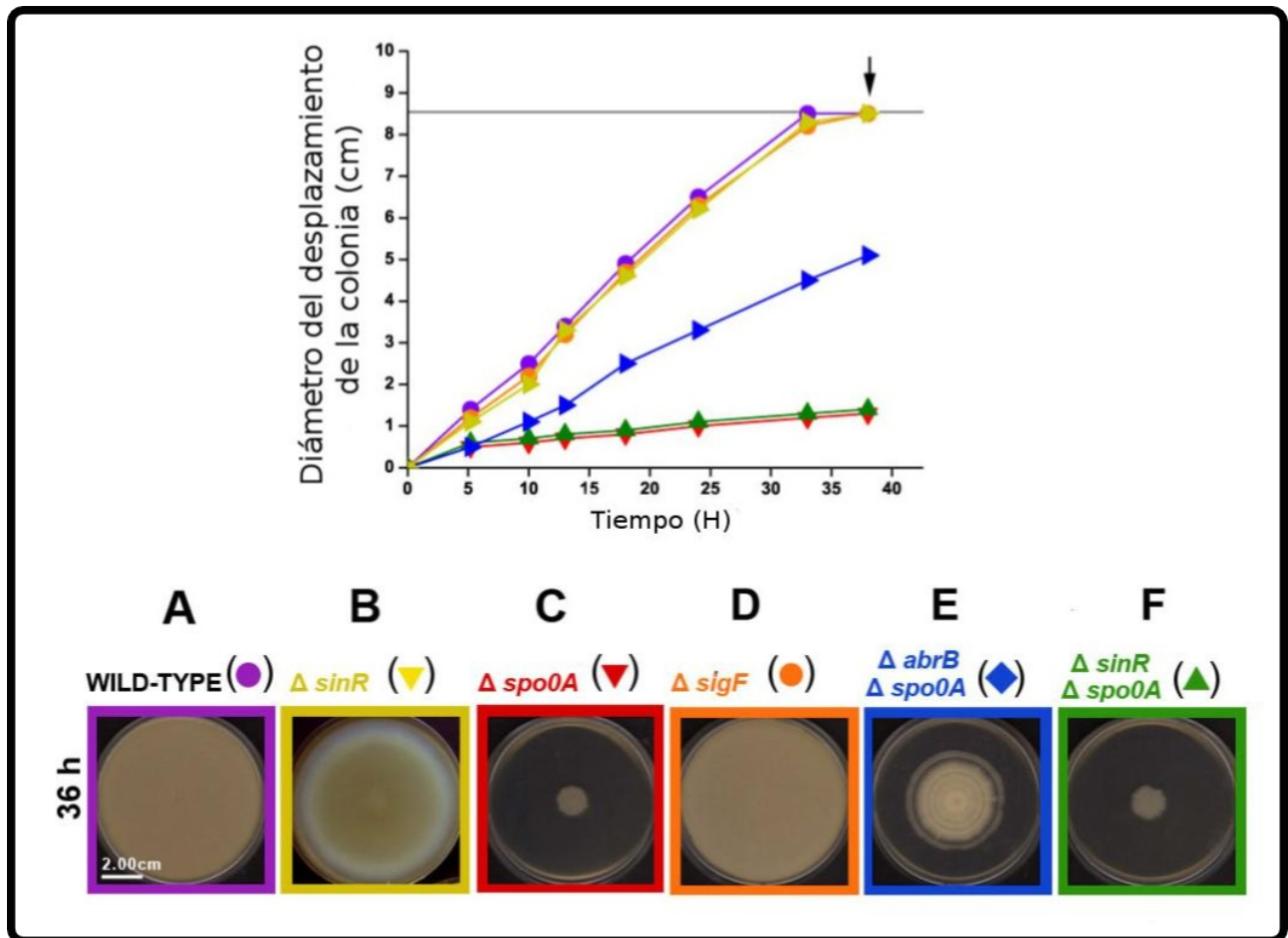


Figura 39: Regulación genética de la movilidad tipo sliding en *B. subtilis*

(A-F) Fenotipo de sliding. (G) caracterización cinética del sliding de diferentes cepas de *B. subtilis* natto afectadas en la expresión de los principales reguladores claves expresión génica en células de *B. subtilis*. La flechas en el apartado G indican el tiempo de desarrollo en el cual se tomaron las fotografías que se muestran en (A-F). La línea horizontal en negro a 8,5 cm muestra el tamaño máximo de la movilidad relacionado con el tamaño de la placa de agar utilizada. Cada valor es el promedio de tres réplicas.

Se sabe que Spo0A regula además la expresión de genes relacionados con el comienzo de la fase estacionaria en *B. subtilis*, entre otras, controla la expresión de *abrB*, cuyo producto génico es un represor de genes de fase estacionaria. (Strauch y Hock, 1993; Strauch y col., 1998).

Puesto que la inactivación de *spo0A* resulta en un incremento de la actividad de los factores de transcripción SinR y AbrB, esto podría explicar la razón por la cual la cepa RG4365 *spo0A* no tiene la capacidad de desplazarse en un medio semisólido. Como se muestra en la figura 39 E, la inactivación de *abrB* era capaz de restablecer el sliding, al menos parcialmente, en la doble mutante junto con *spo0A*, pero no ocurrió en la cepa  $\Delta sinR \Delta spo0A$ . Esto,

sugiere que *abrB* estaría regulando negativamente la expresión de al menos un gen cuyo producto sería necesario para regular el deslizamiento o sliding (ver luego).

Para confirmar el rol fundamental de Spo0A en la capacidad de desplazarse por medio del sliding, se construyó una cepa de BSN deficiente en *spo0A*, pero con una copia del gen *Sad67* inducible por IPTG. Este gen codifica para una proteína Spo0A con una pequeña delección en su extremo N-termina que la torna constitutivamente activa, aún en ausencia de fosforilación. (Arabolaza y col., 2003; Fujita y Losick, 2005). Como se muestra en la figura 40, el agregado de IPTG, restablece la capacidad de desplazarse mediante sliding.

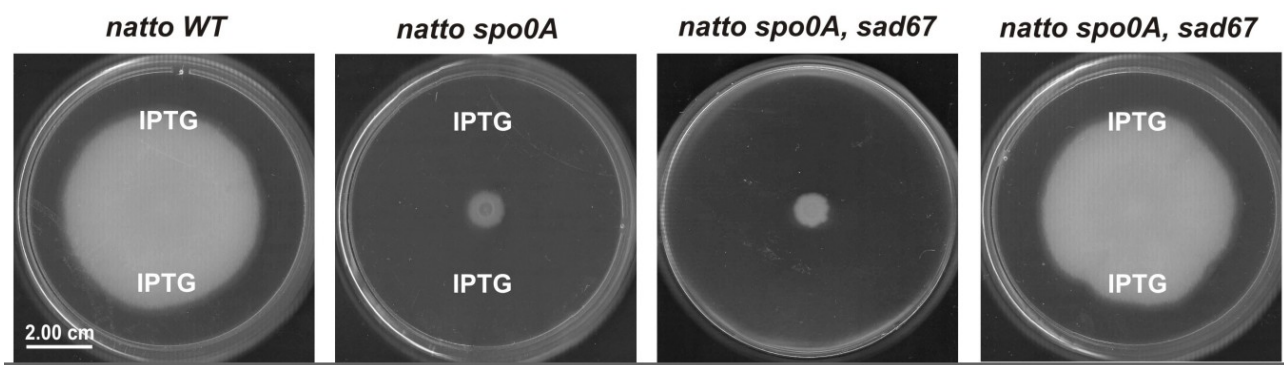


Figura 40: La presencia de IPTG no altera la capacidad de deslizamiento ni la deficiencia en éste de las células *spo0A*(A-D). En ausencia de suplementación de IPTG, la cepa deficiente en Spo0A *Sad67*<sup>+</sup>, no son móviles en placas de agar soft (C), pero en presencia de IPTG las células recuperan por completo la capacidad de deslizarse (D).

¿Cuán extendido y conservado es el rol de Spo0A sobre el sliding en distintas cepas de *Bacillus subtilis*? Aunque la producción de flagelo es esencial para el swarming en la cepa NCIB3610, se ha reportado que esta misma cepa defectuosa en el gen *hag*, es capaz de moverse por medio del sliding luego de periodos más largos de incubación (Kinsinger y col., 2005). Por lo tanto, quisimos saber si ese rol esencial que cumple Spo0A en la cepa BSN, también se mantenía de forma conservada en la cepa NCIB3610. Para esto se analizó el desplazamiento en diferentes medios, como ser LB soft y, el reportado previamente, Msgg soft (Fall y col., 2006). Como se puede ver en la Figura 41, la inactivación de *spo0A* en la cepa NCIB3610 no afectó el fenotipo de

movilidad, mientras que en la cepa isogénica deficiente en los genes *hag* y *spo0A*, la movilidad en ambos medios se vio completamente afectada. Estos resultados confirman la importancia de Spo0A como regulador maestro en el movimiento social de tipo sliding de *B. subtilis*.

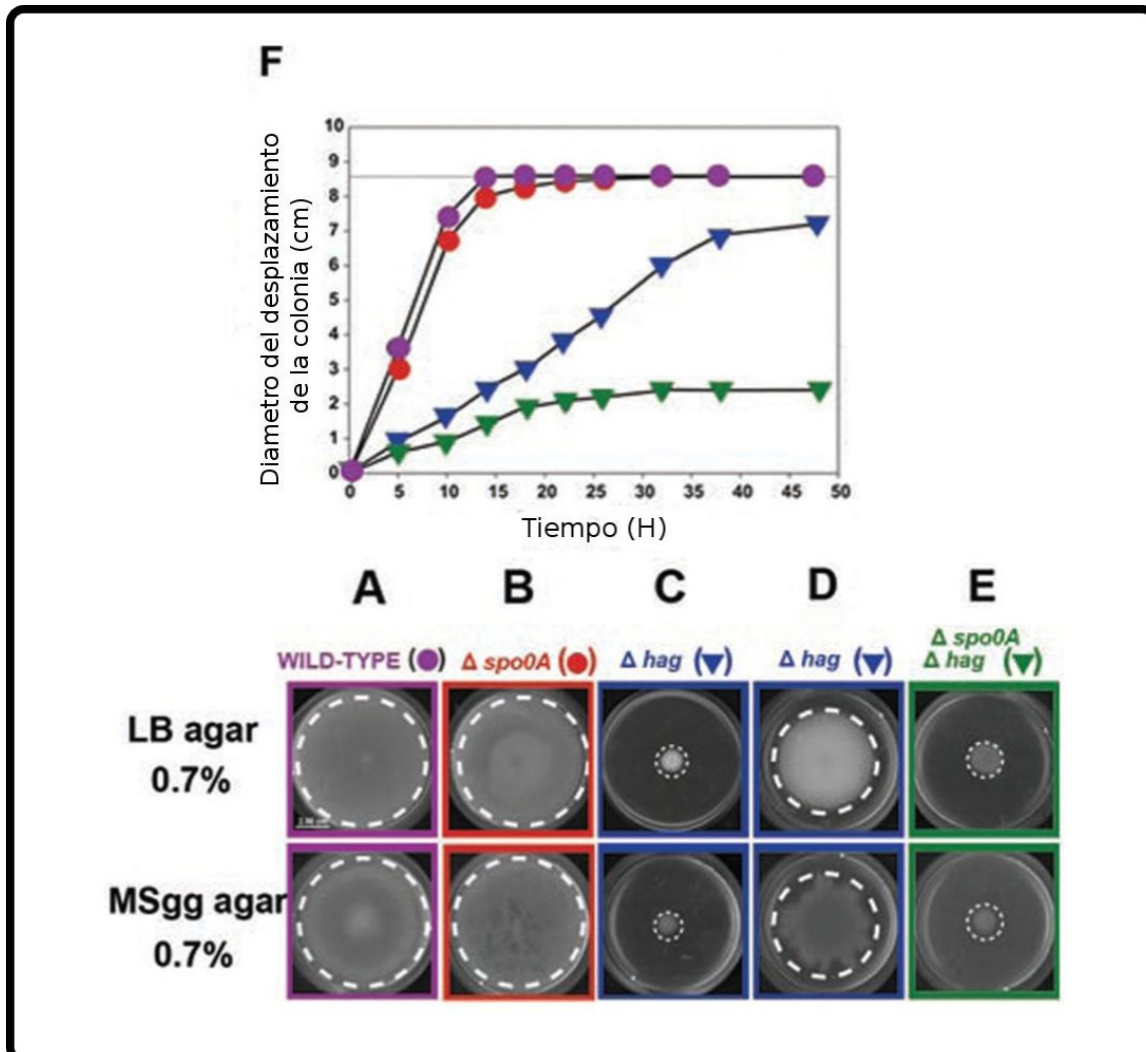


Figura 41: El regulador clave de comportamiento multicelular, Spo0A, controla el sliding en *B. subtilis*.

(A-B) la actividad Spo0A es totalmente prescindible para el desplazamiento tipo swarming de NCIB3610.

(C) La inactivación de la síntesis flagelar ( $\Delta hag$ ) altera la movilidad tipo swarming en NCIB3610, pero luego de periodos más largos de incubación (24 horas o más) la capacidad de desplazarse por medio del sliding se activa (D) en las células deficientes en Hag. (E) la actividad Spo0A es esencial para la capacidad de translocación de superficie en células deficientes en Hag. (F) Cinética de swarming y sliding en cepas deficientes en Spo0A y Hag NCIB3610.

La siguiente pregunta que surgió fue ¿cuál sería la importancia del movimiento tipo sliding de *B. subtilis* en la naturaleza? Como ya se sabe *B.*

## Capítulo 2

*subtilis*, es una bacteria que mejora el crecimiento tanto vegetal como animal, así como también se conocen sus cualidades como probiótico humano (Cutting 2011). Uno de los atributos deseados para que una bacteria logre colonizar a su hospedador, es su capacidad de dispersarse y colonizar algún nicho particular y lograr establecer una comunidad como ser biofilms asociados a un hospedero. Se ha reportado que cerca del 40% de los productos fotosintetizados por las plantas, son secretados a través de los exudados de las raíces, siendo estos, fundamentales para las interacciones existentes entre las plantas y la población microbiana benéfica de la rizósfera. *B. subtilis* protege las raíces de las plantas de microorganismos patógenos mediante la formación de biofilm, puesto que la formación de estas estructuras organizadas implican la producción de antibióticos y surfactantes, entre otros compuestos antimicrobianos. En el establecimiento de estos mecanismos tan deseados hay implícito uno fundamental, el desplazamiento de las cepas hacia el tejido vegetal.

Como se muestra en la Figura 42, Spo0A juega un rol fundamental en la activación del desplazamiento social de bacteria promotora del crecimiento vegetal de *B. subtilis*, necesario para colonizar el tejido vegetal.

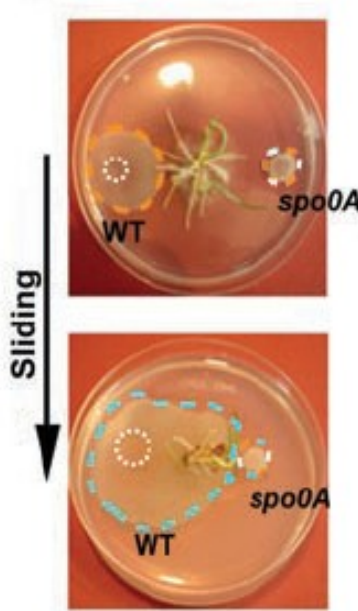


Figura 42: El rol fundamental de Spo0A para el sliding en la colonización de las raíces de plantas de trigo. El círculo punteado blanco representa el punto de inoculación, el círculo naranja representa el avance de las cepas luego de 3 días de inoculada y el círculo punteado celeste representa el avance luego de 5 días.

El movimiento bacteriano sobre las superficies es una herramienta que utilizan las bacterias en la naturaleza para migrar, adherirse y dispersarse. Nuestro interés en este trabajo estuvo enfocado en la interacción beneficiosa planta-bacteria que le permite al microorganismo desplazarse hasta la zona del tejido vegetal (raíz de trigo), donde puede colonizarla y formar biofilms, aumentando esta interacción, y así evitar la colonización por algún patógeno (Ongena y Jacques, 2008). De igual manera, se puede pensar esta interacción para el caso de *Bacillus* probióticos; donde la unión se daría en regiones preferenciales de la mucosa gastrointestinal humana, así como también, no se debe perder de vista que estos movimientos forman parte de la infección por parte de microorganismos patógenos. (Sanders, 2003; Vidyaxma y col., 2014).

Por lo reportado hasta el momento, el sliding es un tipo de translocación de superficie producido por las fuerzas expansivas, en un cultivo en crecimiento en combinación con la producción de compuestos que reducen la fricción entre la superficie de las células y el sustrato, formando una película uniforme de células, estrechamente empaquetadas en una sola capa que se mueve como una unidad (Henrichsen, 1972).

Por lo analizado en este capítulo, podemos concluir que el sliding no es un movimiento "pasivo", sino que está finamente regulado de manera positiva por el regulador maestro del comportamiento social y la esporulación, Spo0A y negativamente por AbrB, sin estar implicados en el deslizamiento, genes relacionados con el gatillado de la esporulación. Además, esta regulación es conservada en cepas de *B. subtilis* de otros linajes diferentes a *natto* como NCIB3610.

Basándonos en los resultados obtenidos hasta el momento decidimos estudiar cuáles eran los genes involucrados en el movimiento social tipo sliding de *B. subtilis* y su regulación, lo cual será nuestro objetivo para el siguiente capítulo debido a la ausencia casi total de información al respecto.

## Capítulo 3

**Genes involucrados en el sliding.**

Las bacterias utilizan una variedad de mecanismos de movilidad para colonizar ambientes, incluyendo la movilidad dependiente de flagelo como el swimming y el swarming y la independiente de flagelo como twitching, gliding y sliding. Este último tipo de desplazamiento, muy poco estudiado hasta este momento, ha sido definido como "una translocación de superficie producido por fuerzas expansivas en la colonia en crecimiento, combinado con propiedades especiales de la superficie para reducir la fricción entre las células y el sustrato; se trataría de un modo pasivo de translocación para la difusión sobre superficies". Sin embargo y en oposición a esa caracterización del sliding como "pasivo" se encontró que en *Mycobacterium smegmatis* se requiere de la formación de glicopeptidolípidos acetilados (GPLs) en la capa más externa de la envoltura celular. Se ha propuesto la idea de que las cadenas hidrofóbicas de ácidos grasos de GPLs en la superficie celular, reducen la fricción para producir la motilidad de deslizamiento sobre la superficie del medio de estas micobacterias.

Como demostramos, las cepas salvajes de *Bacillus subtilis* tienen dos modos distintos de translocación de superficie, swarming y sliding y que son presumiblemente ventajosas en diferentes condiciones ambientales. La capacidad de trasladarse sobre superficies sólidas a través de swarming requiere que se secrete un agente lipopeptídico tensioactivo llamado surfactina, para reducir la tensión superficial. Sin embargo se ha reportado que ciertas cepas de *B. subtilis* de tipo salvaje pueden colonizar rápidamente la superficie de los medios semi-sólidos de una manera independiente del flagelo, y que también se requeriría de la secreción de surfactina.

Como se describió en el capítulo anterior, el regulador maestro del comportamiento social y de la esporulación, Spo0A, es el encargado de regular la ejecución del sliding; movimiento sobre superficies independiente de flagelo. Ya demostramos también, que SinR no está implicado en el deslizamiento y AbrB lo regula parcialmente y de manera negativa.

Basándonos en estos resultados, es que decidimos descubrir y caracterizar cuales podrían ser los genes implicados en el sliding y su regulación.

### **3.1. Dilucidación de los componentes de la maquinaria del sliding: Análisis de transcriptómica de *B. subtilis* bajo condiciones de sliding.**

En nuestro análisis inicial encontramos nuevos roles en los factores de transcripción AbrB y Spo0A, como represor y activador del sliding, respectivamente.

Pero además de esto; ¿qué otros genes, reguladores y/o estructurales, son importantes para el movimiento tipo sliding en *B. subtilis* y cuál es el papel de AbrB y Spo0A en su regulación?

Para responder estas preguntas llevamos a cabo, en colaboración con el laboratorio del Dr. Oscar Kuipers en la Universidad de Groningen, Holanda, experimentos de transcriptómica bajo diferentes condiciones y en distintos backgrounds genéticos. Por un lado, comparamos la expresión genética global de las cepas RG4370, mutante en *spo0A* de BSN y la cepa salvaje, RG4365, en placas de LB con agar al 0,7%, donde ya demostramos (en el capítulo anterior Figura 39) que la cepa salvaje era capaz de deslizarse y la mutante en *spo0A* no.

En un segundo experimento, examinamos a la cepa RG4365 bajo condiciones permisivas de sliding (agar soft) y no permisivas del deslizamiento (1,5% de agar) y se comparó el patrón de expresión genética bajo estas condiciones.

De estos análisis surgió que 310 genes fueron sobre-expresados en la cepa salvaje y 295 fueron reprimidos en la mutante *spo0A*, mientras que 72 y 100 genes se sobre-expresan y reprimen respectivamente, al aumentar la concentración de agar.

Curiosamente, la mayoría de los genes pertenecientes al regulón  $\sigma^D$  (Diethmaier y col., 2011), que está relacionado con la movilidad asociada al flagelo y la quimiotaxis, se activaron en la cepa mutante *spo0A* bajo

condiciones permisivas de sliding. Sin embargo, *B subtilis natto* carece de flagelo, bajo éste y todos los background genéticos analizados.

Se ha demostrado que las cepas salvajes de *Bacillus*, durante la formación de biofilm, una forma de organización de las células vivas en asociación con superficies, secretan una matriz polimérica rica en azúcares y proteínas en el espacio extracelular. En *B. subtilis*, la secreción del EPS, componente de la matriz extracelular, está genéticamente acoplada a la inhibición de la movilidad mediada por flagelos. Como resultado de la inhibición de la síntesis de flagelo, la expansión del biofilm sobre el sustrato resulta más lenta. Diferentes cepas, tienen diferentes capacidades de colonización de superficies, pero cepas desprovistas de flagelo se desplazan a la misma velocidad que cepas capaces de producirlos dentro del biofilm en expansión (Seminara y col., 2012).

Por lo mencionado anteriormente, se sabe que la cepa NCIB3610 apaga la producción de flagelos para la translocación sobre superficies sólidas, debido a que la síntesis de exopolisacáridos (EPS) y como mostramos a continuación, la expresión de EPS, se incrementa en condiciones permisivas de sliding. Por lo tanto, la capacidad de “apagar y prender” la síntesis flagelar para la translocación sobre superficies parece ser importante, aunque aún no se comprende completamente cómo y por qué, se produce este cambio en *B. subtilis*.

Mientras que la mutación en *spo0A*, resultó en la expresión diferencial de diversos genes bajo las condiciones permisivas de sliding en medio LB (ver luego), no se pudo identificar ningún gen relacionado con la esporulación en la cepa de salvaje, que se exprese de forma diferencial bajo esta condición experimental. Una explicación para esta observación es que, bajo las condiciones experimentales, es decir, en el medio rico usado como el LB, y bajo las condiciones permisivas de sliding; la esporulación no se activa en la cepa salvaje, y por lo tanto, la mutación en *spo0A* no tiene ningún efecto sobre estos genes en esta cepa durante el sliding. Este resultado refuerza el ensayo presentado en el capítulo anterior donde se demuestra que la inactivación del

gen *spoIIAC* ( $\sigma^F$ ), implicado en el inicio de la cascada de esporulación, no estaría involucrado en la regulación del sliding.

Sin embargo, se observó una elevada expresión de genes de esporulación dependientes de  $\sigma^G$  en la cepa salvaje, crecida bajo condiciones no permisivas de deslizamiento, o sea a mayor concentración de agar.

La inducción de genes de esporulación en muestras tomadas en placas con 1,5% de agar se debe probablemente al hecho de que bajo esta condición de restricción del sliding, *B. subtilis* no puede desplazarse y los nutrientes alrededor de las colonias llegan a agotarse o al menos volverse limitantes, por lo tanto la esporulación se inicia y lo hace de manera similar a como lo hace durante la formación de biofilms. (Vlamakis y col., 2008; Aguilar y col., 2010; Vlamakis y col., 2013).

¿Qué otros genes se expresan durante el deslizamiento activo? Se encontró que en las cepas salvajes bajo condiciones permisivas de sliding (en comparación con la cepa mutante en *spo0A*) los genes relacionados con la producción de la matriz del biofilm (*tapA-sipW-tasA*, *eps*), la capa superficial de los biofilms (*bslA*), la síntesis de ácidos grasos (los genes *fab*) y la síntesis de surfactina, se encontraban sobreexpresados.

A continuación, en la siguiente tabla, se presentan los resultados de ensayo de transcriptómica realizado bajo las distintas condiciones descritas anteriormente.

Tabla 11: Análisis del microarray de células tipo salvaje bajo condiciones de sliding permisivas (0,7% agar) y no permisivas (1,5% de agar). Lista de valores de *p* significativo ( $p < 10^{-4}$ ), genes reprimidos o sobre expresados de *B. subtilis* ( $> 3$  o  $< -3$ ) en las muestras de placas de agar 1,5%

| Gen         | Función   | fold | Valor p    |
|-------------|---|------|------------|
| <i>yhcO</i> | hypothetical protein                            | 47,9 | $10^{-6}$  |
| <i>cotG</i> | spore morphogenetic protein                     | 21,0 | $10^{-6}$  |
| <i>gbsA</i> | glycine betaine aldehyde dehydrogenase          | 17,4 | $10^{-6}$  |
| <i>yhdF</i> | hypothetical protein                            | 17,2 | $10^{10}$  |
| <i>gbsB</i> | choline dehydrogenase                           | 13,7 | $10^{-6}$  |
| <i>sboA</i> | subtilosin A                                    | 11,5 | $10^{-5}$  |
| <i>safA</i> | morphogenetic protein associated with SpoVID    | 11,4 | $10^{-4}$  |
| <i>yfnF</i> | glycosyltransferase                             | 9,2  | $10^{-10}$ |
| <i>pstC</i> | phosphate ABC transporter permease              | 9,1  | $10^{-4}$  |
| <i>sboX</i> | bacteriocin-like product                        | 8,9  | $10^{-6}$  |
| <i>dnaX</i> | DNA polymerase III subunits $\gamma$ and $\tau$ | 8,4  | $10^{-5}$  |
| <i>usd</i>  | required for translation of SpoIIID             | 8,1  | $10^{-6}$  |

|               |   |      |                  |
|---------------|---|------|------------------|
| <i>cgeA</i>   | spore outermost layer component                         | 7,5  | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>spoVIF</i> | sporulation-specific protein needed for heat resistance | 7,1  | 10 <sup>-7</sup> |
| <i>acoC</i>   | branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase            | 6,7  | 10 <sup>-5</sup> |
| <i>acoL</i>   | dihydrolipoamide dehydrogenase                          | 6,7  | 10 <sup>-5</sup> |
| <i>acoA</i>   | acetoin dehydrogenase                                   | 6,1  | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>yobW</i>   | mother cell-specific membrane sporulation protein       | 5,7  | 10 <sup>-5</sup> |
| <i>acoB</i>   | acetoin dehydrogenase                                   | 5,6  | 10 <sup>-5</sup> |
| <i>cotY</i>   | outer spore coat protein                                | 5,5  | 10 <sup>-8</sup> |
| <i>ykrP</i>   | integral inner membrane protein                         | 5,4  | 10 <sup>-7</sup> |
| <i>bpr</i>    | bacillopeptidase F                                      | 5,2  | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>aprX</i>   | alkaline serine protease                                | 4,8  | 10 <sup>-5</sup> |
| <i>yjdH</i>   | hypothetical protein                                    | 4,7  | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>trpB</i>   | tryptophan synthase subunit beta                        | 4,7  | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>opuBD</i>  | choline ABC transporter permease                        | 4,6  | 10 <sup>-6</sup> |
| <i>scoA</i>   | succinyl CoA:3-oxoacid CoA-transferase                  | 4,6  | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>yebD</i>   | hypothetical protein                                    | 4,3  | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>ykoY</i>   | transporter   | 4,3  | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>ythC</i>   | hypothetical protein                                    | 4,3  | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>csn</i>    | chitosanase   | 3,9  | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>yndA</i>   | hypothetical protein                                    | 3,7  | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>cotZ</i>   | spore coat protein                                      | 3,6  | 10 <sup>-7</sup> |
| <i>yfnH</i>   | sugar-phosphate cytidyltransferase                      | 3,5  | 10 <sup>-5</sup> |
| <i>opuBC</i>  | choline ABC transporter choline-binding lipoprotein     | 3,4  | 10 <sup>-6</sup> |
| <i>mreBH</i>  | rod-share determining protein                           | 3,4  | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>opuBB</i>  | choline ABC transporter permease                        | 3,3  | 10 <sup>-6</sup> |
| <i>lonB</i>   | ATP-dependent protease                                  | 3,3  | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>yfhD</i>   | hypothetical protein                                    | 3,3  | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>sspG</i>   | small acid-soluble spore protein                        | 3,2  | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>cgeB</i>   | spore coat maturation protein                           | 3,1  | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>opuBA</i>  | choline ABC transporter ATP-binding protein             | 3,0  | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>fadM</i>   | oxidoreductase involved in fatty acids degradation      | 3,0  | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>fabI</i>   | enoyl-(acyl carrier protein) reductase                  | -3,0 | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>fabF</i>   | 3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase II            | -3,0 | 10 <sup>-6</sup> |
| <i>yusI</i>   | oxidoreductase  | -3,0 | 10 <sup>-5</sup> |
| <i>ybcC</i>   | hypothetical protein                                    | -3,0 | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>yjgB</i>   | hypothetical protein                                    | -3,1 | 10 <sup>-6</sup> |
| <i>yukA</i>   | hypothetical protein                                    | -3,1 | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>thiT</i>   | thiamin permease  | -3,1 | 10 <sup>-8</sup> |
| <i>csbD</i>   | stress response protein                                 | -3,1 | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>bkdAA</i>  | branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase            | -3,1 | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>sppA</i>   | signal peptide peptidase                                | -3,1 | 10 <sup>-5</sup> |
| <i>manA</i>   | mannose-6 phosphate isomerase                           | -3,2 | 10 <sup>-5</sup> |
| <i>bslA</i>   | biofilm surface protein                                 | -3,2 | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>fabHB</i>  | 3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase III           | -3,3 | 10 <sup>-8</sup> |
| <i>ptb</i>    | phosphate butyryltransferase                            | -3,3 | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>yjeA</i>   | secreted deoxyriboendonuclease                          | -3,3 | 10 <sup>-7</sup> |
| <i>bkdB</i>   | branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase            | -3,3 | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>appC</i>   | oligopeptide ABC transporter permease                   | -3,4 | 10 <sup>-6</sup> |
| <i>appB</i>   | oligopeptide ABC transporter permease                   | -3,4 | 10 <sup>-5</sup> |
| <i>rocE</i>   | arginine/ornithine/gamma-aminobutyrate permease         | -3,4 | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>bacD</i>   | alanine-anticapsin ligase                               | -3,5 | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>lpdV</i>   | dihydrolipoamide dehydrogenase                          | -3,6 | 10 <sup>-4</sup> |

|              |   |      |                  |
|--------------|---|------|------------------|
| <i>hxlB</i>  | 6-phospho-3-hexuloisomerase                       | -3,7 | 10 <sup>-5</sup> |
| <i>bkdAB</i> | branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase      | -3,7 | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>gsiB</i>  | general stress protein                            | -3,7 | 10 <sup>-5</sup> |
| <i>ycdG</i>  | glycosidase                                       | -3,8 | 10 <sup>-6</sup> |
| <i>yezD</i>  | hypothetical protein                              | -3,8 | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>yjgD</i>  | hypothetical protein                              | -3,9 | 10 <sup>-5</sup> |
| <i>yvgO</i>  | hypothetical protein                              | -3,9 | 10 <sup>-8</sup> |
| <i>ysnF</i>  | stress response protein                           | -4,1 | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>ybdK</i>  | two-component sensor histidine kinase YbdJ        | -4,2 | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>ndhF</i>  | NADH dehydrogenase subunit                        | -4,3 | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>appF</i>  | oligopeptide ABC transporter ATP-binding protein  | -5,0 | 10 <sup>-5</sup> |
| <i>buk</i>   | butyrate kinase                                   | -5,1 | 10 <sup>-6</sup> |
| <i>glpT</i>  | glycerol-3-phosphate permease                     | -5,2 | 10 <sup>-6</sup> |
| <i>ybcF</i>  | carbonic anhydrase                                | -5,3 | 10 <sup>-4</sup> |
| <i>manP</i>  | phosphotransferase system mannose-specific enzyme | -5,5 | 10 <sup>-6</sup> |
| <i>ykvS</i>  | hypothetical protein                              | -5,8 | 10 <sup>-4</sup> |

Tabla 12: Análisis del microarray de células mutantes en *spo0A* y células de tipo salvaje bajo condiciones permisivas de sliding. Lista de valores de *p* significativo ( $p < 10^{-4}$ ), genes reprimidos o sobre expresados de *B. subtilis* ( $> 3$  o  $< -3$ ) en cepas mutantes en *spo*.

| Gen          | Función   | fold | Valor p           |
|--------------|---|------|-------------------|
| <i>acoA</i>  | acetoin dehydrogenase E1 component (alpha subunit)      | 38,2 | $< 10^{-14}$      |
| <i>acoC</i>  | branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2 | 35,6 | $< 10^{-14}$      |
| <i>yuaF</i>  | membrane integrity integral inner membrane protein      | 34,5 | 10 <sup>-14</sup> |
| <i>acoB</i>  | acetoin dehydrogenase E1 component (beta subunit)       | 34,4 | $< 10^{-14}$      |
| <i>acoL</i>  | dihydrolipoamide dehydrogenase                          | 32,0 | $< 10^{-14}$      |
| <i>yuaG</i>  | flotillin-like protein                                  | 26,6 | 10 <sup>-14</sup> |
| <i>degQ</i>  | pleiotropic regulator                                   | 21,5 | $< 10^{-14}$      |
| <i>yuaI</i>  | acetyl-transferase                                      | 21,4 | 10 <sup>-14</sup> |
| <i>gbsA</i>  | glycine betaine aldehyde dehydrogenase                  | 19,2 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>yqeZ</i>  | membrane bound hydrolase                                | 18,2 | $< 10^{-14}$      |
| <i>carB</i>  | carbamoyl phosphate synthase large subunit              | 17,5 | 10 <sup>-12</sup> |
| <i>yqfB</i>  | hypothetical protein                                    | 17,0 | 10 <sup>-14</sup> |
| <i>yeaA</i>  | hypothetical protein                                    | 16,6 | 10 <sup>-6</sup>  |
| <i>gbsB</i>  | choline dehydrogenase                                   | 14,4 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>carA</i>  | carbamoyl phosphate synthase small subunit              | 13,3 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>yozO</i>  | hypothetical protein                                    | 12,5 | 10 <sup>-13</sup> |
| <i>gltA</i>  | glutamate synthase large subunit                        | 12,4 | 10 <sup>-13</sup> |
| <i>argD</i>  | acetylornithine aminotransferase                        | 12,3 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>yvfW</i>  | iron-sulfur oxidoreductase                              | 11,2 | 10 <sup>-14</sup> |
| <i>yvbY</i>  | subunit of an iron-sulfur protein                       | 11,0 | 10 <sup>-13</sup> |
| <i>argB</i>  | acetylglutamate kinase                                  | 10,9 | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>sigW</i>  | RNA polymerase sigma factor                             | 9,6  | $< 10^{-14}$      |
| <i>ydjP</i>  | peroxydase  | 8,6  | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>ykoJ</i>  | hypothetical protein                                    | 8,4  | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>yhbE</i>  | hypothetical protein                                    | 7,9  | 10 <sup>-13</sup> |
| <i>tatAC</i> | twin-arginine pre-protein translocation pathway protein | 7,8  | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>adaA</i>  | methylphosphotriester-DNA alkyltransferase              | 7,7  | 10 <sup>-8</sup>  |

|              |   |     |                   |
|--------------|---|-----|-------------------|
| <i>yvfV</i>  | iron-sulfur heterodisulfide reductase                       | 7,6 | 10 <sup>-13</sup> |
| <i>mrgA</i>  | metalloregulation DNA-binding stress protein                | 7,6 | 10 <sup>-13</sup> |
| <i>mtlR</i>  | transcriptional regulator                                   | 7,5 | 10 <sup>-12</sup> |
| <i>pbpE</i>  | penicillin-binding protein 4*                               | 7,4 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>kata</i>  | vegetative catalase 1                                       | 7,2 | 10 <sup>-14</sup> |
| <i>abrB</i>  | transcriptional regulator for transition state genes        | 7,1 | 10 <sup>-13</sup> |
| <i>adaB</i>  | O6-methylguanine-DNA methyltransferase                      | 7,0 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>gsiB</i>  | general stress protein                                      | 6,9 | 10 <sup>-13</sup> |
| <i>argF</i>  | ornithine carbamoyltransferase                              | 6,7 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>ybbD</i>  | beta-hexosaminidase, lipoprotein                            | 6,6 | 10 <sup>-12</sup> |
| <i>argJ</i>  | ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase      | 6,4 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>yjbC</i>  | thiol oxidation management factor; acetyltransferase        | 6,4 | 10 <sup>-13</sup> |
| <i>cheC</i>  | signal terminating phosphatase                              | 6,3 | 10 <sup>-6</sup>  |
| <i>yhbF</i>  | hypothetical protein  | 6,2 | 10 <sup>-13</sup> |
| <i>ydeB</i>  | transcriptional regulator                                   | 6,2 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>yqfA</i>  | hypothetical protein  | 6,1 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>ywmC</i>  | hypothetical protein  | 5,8 | 10 <sup>-12</sup> |
| <i>artR</i>  | high affinity arginine ABC transporter ATP-binding protein  | 5,8 | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>flgM</i>  | anti-sigma factor repressor of SigD-dependent transcription | 5,8 | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>rsiW</i>  | anti-SigW factor  | 5,7 | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>flj</i>   | flagellar biosynthesis chaperone                            | 5,7 | 10 <sup>-4</sup>  |
| <i>alkA</i>  | DNA-3-methyladenine glycosylase                             | 5,6 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>cheD</i>  | sequence specific deamidase                                 | 5,5 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>yjoB</i>  | ATPase possibly involved in protein degradation             | 5,4 | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>fadN</i>  | enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase       | 5,3 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>ythQ</i>  | ABC transporter permease                                    | 5,3 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>ybbF</i>  | sugar phosphotransferase enzyme II                          | 5,2 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>ybbE</i>  | hypothetical protein  | 5,2 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>artQ</i>  | high affinity arginine ABC transporter permease             | 5,2 | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>licB</i>  | phosphotransferase system lichenan-specific enzyme          | 5,1 | 10 <sup>-6</sup>  |
| <i>ysdB</i>  | hypothetical protein  | 5,0 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>argG</i>  | argininosuccinate synthase                                  | 5,0 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>opuBB</i> | choline ABC transporter permease                            | 4,7 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>yolC</i>  | SP beta phage protein                                       | 4,6 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>yvyG</i>  | flagellar protein   | 4,6 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>ywrE</i>  | hypothetical protein  | 4,5 | 10 <sup>10</sup>  |
| <i>recG</i>  | ATP-dependent DNA helicase                                  | 4,5 | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>yrkA</i>  | membrane associated protein                                 | 4,5 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>lcfB</i>  | long-chain-fatty-acid--CoA ligase                           | 4,4 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>argH</i>  | argininosuccinate lyase                                     | 4,4 | 10 <sup>-12</sup> |
| <i>yxjJ</i>  | hypothetical protein  | 4,4 | 10 <sup>-6</sup>  |
| <i>yvaB</i>  | azoreductase  | 4,4 | 10 <sup>-12</sup> |
| <i>yfhM</i>  | Hydrolase   | 4,3 | 10 <sup>-7</sup>  |
| <i>bltR</i>  | transcriptional regulator                                   | 4,3 | 10 <sup>-6</sup>  |
| <i>purC</i>  | phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase    | 4,2 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>iseA</i>  | inhibitor of cell-separation enzymes                        | 4,2 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>yvyF</i>  | regulator of flagella formation                             | 4,2 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>opuBC</i> | choline ABC transporter choline-binding lipoprotein         | 4,2 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>gltD</i>  | glutamate synthase subunit beta                             | 4,1 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>feuA</i>  | iron hydroxamate-binding lipoprotein                        | 4,1 | 10 <sup>-11</sup> |

|              |   |     |                   |
|--------------|---|-----|-------------------|
| <i>sdaAA</i> | L-serine dehydratase alpha chain                                  | 4,0 | 10 <sup>-12</sup> |
| <i>opuBD</i> | choline ABC transporter permease                                  | 4,0 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>fadE</i>  | acyl-CoA dehydrogenase  | 3,9 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>araN</i>  | sugar-binding lipoprotein   | 3,9 | 10 <sup>-6</sup>  |
| <i>ybyB</i>  | hypothetical protein  | 3,9 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>lcfA</i>  | long chain acyl-CoA ligase  | 3,9 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>ybbH</i>  | transcriptional regulator   | 3,8 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>sigL</i>  | RNA polymerase Sig54 factor                                       | 3,8 | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>purS</i>  | phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit                  | 3,8 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>flgG</i>  | flagellar basal body rod protein                                  | 3,8 | 10 <sup>-5</sup>  |
| <i>fadF</i>  | iron-sulphur-binding reductase                                    | 3,8 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>yfhL</i>  | SdpC immunity factor  | 3,8 | 10 <sup>-5</sup>  |
| <i>abh</i>   | transcriptional regulator   | 3,7 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>licA</i>  | phosphotransferase system lichenan-specific enzyme                | 3,7 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>opuCA</i> | glycine betaine/carnitine/choline/choline sulfate ABC transporter | 3,7 | 10 <sup>-12</sup> |
| <i>ybbC</i>  | hypothetical protein  | 3,7 | 10 <sup>-6</sup>  |
| <i>yqjL</i>  | Hydrolase   | 3,7 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>yoed</i>  | excisionase   | 3,7 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>lytF</i>  | gamma-D-glutamate-meso-diaminopimelate muropeptidase              | 3,7 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>nhaX</i>  | stress response protein, UspA family                              | 3,6 | 10 <sup>-6</sup>  |
| <i>veg</i>   | hypothetical protein  | 3,6 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>ydjO</i>  | hypothetical protein  | 3,6 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>araD</i>  | L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase                                | 3,6 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>ykwB</i>  | acetyltransferase   | 3,6 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>yhzC</i>  | hypothetical protein  | 3,6 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>ribE</i>  | riboflavin synthase subunit alpha                                 | 3,6 | 10 <sup>-12</sup> |
| <i>abnA</i>  | arabinan-endo 1,5-alpha-L-arabinase                               | 3,6 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>araL</i>  | phosphatase   | 3,6 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>ylxF</i>  | kinesin-like protein  | 3,5 | 10 <sup>-4</sup>  |
| <i>puck</i>  | uric acid permease  | 3,5 | 10 <sup>-4</sup>  |
| <i>yoch</i>  | exported cell wall-binding protein                                | 3,5 | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>ykoY</i>  | transporter   | 3,5 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>yuaC</i>  | transcriptional regulator   | 3,5 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>fadA</i>  | acetyl-CoA acetyltransferase                                      | 3,5 | 10 <sup>-7</sup>  |
| <i>prkA</i>  | serine protein kinase   | 3,4 | 10 <sup>-6</sup>  |
| <i>fliL</i>  | flagellar basal body-associated protein                           | 3,4 | 10 <sup>-7</sup>  |
| <i>trpC</i>  | indole-3-glycerol-phosphate synthase                              | 3,4 | 10 <sup>-6</sup>  |
| <i>yhdX</i>  | hypothetical protein  | 3,4 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>ybbB</i>  | AraC/XylS family transcriptional regulator                        | 3,4 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>sigD</i>  | RNA polymerase sigma factor                                       | 3,4 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>ypuE</i>  | hypothetical protein  | 3,3 | 10 <sup>-7</sup>  |
| <i>licC</i>  | phosphotransferase system lichenan-specific enzyme                | 3,3 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>sqhC</i>  | squalene-hopene cyclase   | 3,3 | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>glpF</i>  | glycerol permease   | 3,3 | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>qodI</i>  | quercetin dioxygenase   | 3,3 | 10 <sup>-4</sup>  |
| <i>ubiD</i>  | 3-polyprenyl-4-hydroxybenzoate decarboxylase                      | 3,3 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>flgL</i>  | flagellar hook-associated protein                                 | 3,2 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>ycbD</i>  | 2,5-dioxovalerate dehydrogenase                                   | 3,2 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>yocN</i>  | hypothetical protein  | 3,2 | 10 <sup>-7</sup>  |
| <i>flgK</i>  | flagellar hook-associated protein                                 | 3,2 | 10 <sup>-9</sup>  |

|              |   |      |                   |
|--------------|---|------|-------------------|
| <i>comFC</i> | component of the DNA transport apparatus  | 3,2  | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>comFB</i> | hypothetical protein  | 3,2  | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>opuCC</i> | glycine betaine/carnitine/choline/choline sulfate ABC transporter   | 3,2  | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>ribD</i>  | bifunctional diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deaminase/5-amino-6-(5-phosphoribosylamino) uracil reductase | 3,2  | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>ydfL</i>  | transcriptional regulator   | 3,1  | 10 <sup>-7</sup>  |
| <i>sppA</i>  | signal peptide peptidase  | 3,0  | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>ylxL</i>  | coupling factor for flagellin transcription and translation   | 3,0  | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>dnaX</i>  | DNA polymerase III subunits gamma and tau   | 3,0  | 10 <sup>-6</sup>  |
| <i>murQ</i>  | N-acetylmuramic acid-6-phosphate etherase   | 3,0  | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>argC</i>  | N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase   | 3,0  | 10 <sup>-5</sup>  |
| <i>cheW</i>  | modulation of CheA activity in response to attractants  | 3,0  | 10 <sup>-6</sup>  |
| <i>sdaAB</i> | L-serine dehydratase beta chain   | 3,0  | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>yaaN</i>  | hypothetical protein  | 3,0  | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>fadR</i>  | transcriptional regulator of fatty acids degradation  | 3,0  | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>racX</i>  | amino acid racemase   | 3,0  | 10 <sup>-7</sup>  |
| <i>purQ</i>  | phosphoribosylformylglycinamide synthase I  | 3,0  | 10 <sup>-6</sup>  |
| <i>proB</i>  | gamma-glutamyl kinase   | -3,0 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>natB</i>  | Na <sup>+</sup> exporter (ABC permease)   | -3,0 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>slrR</i>  | transcriptional regulator   | -3,0 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>yraF</i>  | spore coat protein  | -3,0 | 10 <sup>-5</sup>  |
| <i>srfAC</i> | surfactin synthetase  | -3,1 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>ftsR</i>  | LysR family transcriptional regulator   | -3,1 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>yqgX</i>  | metal-binding hydrolase   | -3,1 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>yvaF</i>  | transcriptional regulator   | -3,1 | 10 <sup>-4</sup>  |
| <i>yjiB</i>  | monooxygenase   | -3,1 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>yhel</i>  | ABC transporter ATP-binding protein   | -3,1 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>yjdJ</i>  | hypothetical protein  | -3,1 | 10 <sup>-6</sup>  |
| <i>ykzC</i>  | hypothetical protein  | -3,2 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>spo0E</i> | negative regulatory phosphatase acting on Spo0A~P   | -3,2 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>ybaJ</i>  | methyltransferase   | -3,2 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>ywiE</i>  | cardiolipin synthetase  | -3,2 | 10 <sup>-5</sup>  |
| <i>yvKB</i>  | TetR/AcrR family transcriptional regulator  | -3,3 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>yrrT</i>  | AdoMet-dependent methyltransferase  | -3,3 | 10 <sup>-4</sup>  |
| <i>ptkA</i>  | protein tyrosine kinase   | -3,3 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>yhdA</i>  | oxidoreductase, NAD(P)H-FMN and ferric iron reductase   | -3,3 | 10 <sup>-6</sup>  |
| <i>ywqC</i>  | modulator of YwqD protein tyrosine kinase activity  | -3,4 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>fabHB</i> | 3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase III   | -3,4 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>yhaQ</i>  | Na <sup>+</sup> -efflux ABC transporter ATP-binding protein   | -3,4 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>ecsB</i>  | ABC transporter membrane protein  | -3,4 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>fabG</i>  | 3-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase   | -3,4 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>yxaB</i>  | exopolysaccharide pyruvyl transferase   | -3,4 | 10 <sup>-4</sup>  |
| <i>ydaF</i>  | ribosomal protein N-acetyltransferase   | -3,4 | 10 <sup>-5</sup>  |
| <i>eutD</i>  | phosphotransacetylase   | -3,5 | 10 <sup>-7</sup>  |
| <i>yvKC</i>  | phosphotransferase  | -3,5 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>bioYB</i> | biotin transporter  | -3,5 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>ecsC</i>  | Hydrolase   | -3,5 | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>yukE</i>  | hypothetical protein  | -3,6 | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>yvrL</i>  | integral inner membrane protein   | -3,6 | 10 <sup>-5</sup>  |

|              |  |      |                   |
|--------------|--|------|-------------------|
| <i>yvcP</i>  | two-component response regulator                 | -3,6 | 10 <sup>-6</sup>  |
| <i>yezD</i>  | hypothetical protein                             | -3,6 | 10 <sup>-4</sup>  |
| <i>bacB</i>  | isomerase component of bacilysin synthetase      | -3,6 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>yhgC</i>  | hypothetical protein                             | -3,6 | 10 <sup>-12</sup> |
| <i>yvcR</i>  | ABC transporter ATP-binding protein              | -3,6 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>dhbE</i>  | 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase                 | -3,6 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>glpT</i>  | glycerol-3-phosphate permease                    | -3,6 | 10 <sup>-7</sup>  |
| <i>ylaE</i>  | hypothetical protein                             | -3,6 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>ybcl</i>  | hypothetical protein                             | -3,7 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>appF</i>  | oligopeptide ABC transporter ATP-binding protein | -3,7 | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>suhB</i>  | inositol monophosphatase                         | -3,7 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>bacA</i>  | bacilysin biosynthesis protein, dehydratase      | -3,8 | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>yhjA</i>  | hypothetical protein                             | -3,8 | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>yubA</i>  | integral inner membrane protein                  | -3,8 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>padC</i>  | phenolic acid decarboxylase                      | -3,8 | 10 <sup>-19</sup> |
| <i>raphH</i> | response regulator aspartate phosphatase         | -3,8 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>yerI</i>  | Kinase   | -4,0 | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>vpr</i>   | extracellular serine protease                    | -4,0 | 10 <sup>-5</sup>  |
| <i>ycdG</i>  | glycosidase                                      | -4,0 | 10 <sup>-4</sup>  |
| <i>yfjR</i>  | beta-hydroxyacid dehydrogenase                   | -4,0 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>yrzI</i>  | hypothetical protein                             | -4,0 | 10 <sup>-4</sup>  |
| <i>yflA</i>  | aminoacid transporter                            | -4,1 | 10 <sup>-6</sup>  |
| <i>dhbC</i>  | isochorismate synthase                           | -4,1 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>ycckK</i> | ion channel associated enzyme                    | -4,1 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>dhbA</i>  | 2,3-dihydroxybenzoate-2,3-dehydrogenase          | -4,1 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>yfiQ</i>  | hypothetical protein                             | -4,1 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>yfnC</i>  | efflux transporter                               | -4,1 | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>yczC</i>  | integral inner membrane protein                  | -4,1 | 10 <sup>-7</sup>  |
| <i>bacE</i>  | efflux protein for bacilysin excretion           | -4,2 | 10 <sup>-7</sup>  |
| <i>yvcS</i>  | ABC transporter permease                         | -4,2 | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>bacC</i>  | bacilysin biosynthesis oxidoreductase            | -4,3 | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>ydaB</i>  | acyl-CoA ligase                                  | -4,4 | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>ycbU</i>  | cysteine desulfurase                             | -4,4 | 10 <sup>-6</sup>  |
| <i>yhcY</i>  | two-component sensor histidine kinase            | -4,5 | 10 <sup>-10</sup> |
| <i>estA</i>  | secreted alkaliphilic lipase                     | -4,5 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>sipW</i>  | type I signal peptidase                          | -4,7 | 10 <sup>-5</sup>  |
| <i>appB</i>  | oligopeptide ABC transporter permease            | -4,7 | 10 <sup>-12</sup> |
| <i>rapI</i>  | response regulator aspartate phosphatase         | -4,8 | 10 <sup>-4</sup>  |
| <i>epsC</i>  | UDP-sugar epimerase                              | -4,8 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>ydeH</i>  | integral inner membrane protein                  | -4,8 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>yqeB</i>  | hypothetical protein                             | -4,8 | 10 <sup>-7</sup>  |
| <i>yjiC</i>  | glycosyltransferase                              | -4,9 | 10 <sup>-12</sup> |
| <i>ybdN</i>  | hypothetical protein                             | -5,2 | 10 <sup>-7</sup>  |
| <i>ywrO</i>  | nitroreductase                                   | -5,2 | 10 <sup>-12</sup> |
| <i>appC</i>  | oligopeptide ABC transporter permease            | -5,3 | 10 <sup>-8</sup>  |
| <i>bdhA</i>  | acetoin reductase/2,3-butanediol dehydrogenase   | -5,4 | 10 <sup>-12</sup> |
| <i>yojK</i>  | glycosyltransferase                              | -5,6 | 10 <sup>-12</sup> |
| <i>nprE</i>  | extracellular neutral metalloprotease            | -5,8 | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>ykuV</i>  | thiol-disulfide isomerase                        | -5,8 | 10 <sup>-11</sup> |
| <i>yraJ</i>  | hypothetical protein                             | -5,8 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>ybdK</i>  | two-component sensor histidine kinase            | -6,1 | 10 <sup>-9</sup>  |
| <i>ctaO</i>  | protoheme IX farnesyltransferase                 | -6,6 | 10 <sup>-10</sup> |

|             |   |       |                    |
|-------------|---|-------|--------------------|
| <i>bacD</i> | alanine-anticapsin ligase                 | -6,6  | 10 <sup>-12</sup>  |
| <i>htpG</i> | heat shock protein 90                     | -6,6  | 10 <sup>-12</sup>  |
| <i>ybcF</i> | carbonic anhydrase                        | -6,7  | 10 <sup>-8</sup>   |
| <i>besA</i> | bacillibactin trilactone hydrolase        | -6,9  | 10 <sup>-13</sup>  |
| <i>ykuU</i> | 2-cys peroxiredoxin                       | -6,9  | 10 <sup>-9</sup>   |
| <i>yvrP</i> | ABC transporter protein                   | -7,1  | 10 <sup>-12</sup>  |
| <i>yhcZ</i> | two-component response regulator          | -7,1  | 10 <sup>-13</sup>  |
| <i>ywfG</i> | transaminase                              | -7,5  | 10 <sup>-13</sup>  |
| <i>epsD</i> | extracellular matrix biosynthesis enzyme  | -7,5  | 10 <sup>-12</sup>  |
| <i>epsN</i> | aminotransferase                          | -7,9  | 10 <sup>-13</sup>  |
| <i>ppsD</i> | plipastatin synthetase                    | -7,9  | 10 <sup>-11</sup>  |
| <i>epsB</i> | protein tyrosine kinase                   | -7,9  | 10 <sup>-11</sup>  |
| <i>yhfO</i> | N-acetyltransferase                       | -8,0  | 10 <sup>-9</sup>   |
| <i>yvrO</i> | ABC transporter ATP-binding protein       | -8,0  | 10 <sup>-12</sup>  |
| <i>epsL</i> | hypothetical protein                      | -8,1  | 10 <sup>-13</sup>  |
| <i>epsM</i> | O-acetyltransferase                       | -8,3  | 10 <sup>-12</sup>  |
| <i>ppsE</i> | plipastatin synthetase                    | -8,5  | 10 <sup>-9</sup>   |
| <i>csn</i>  | chitosanase                               | -8,8  | 10 <sup>-10</sup>  |
| <i>epsA</i> | modulator of protein tyrosine kinase EpsB | -8,9  | 10 <sup>-12</sup>  |
| <i>yral</i> | hypothetical protein                      | -9,0  | 10 <sup>-14</sup>  |
| <i>epsK</i> | hypothetical protein                      | -9,2  | 10 <sup>-13</sup>  |
| <i>ybcD</i> | hypothetical protein                      | -9,7  | 10 <sup>-16</sup>  |
| <i>ybcC</i> | hypothetical protein                      | -9,7  | 10 <sup>-9</sup>   |
| <i>epsI</i> | polysaccharide pyruvyl transferase        | -9,9  | 10 <sup>-13</sup>  |
| <i>pel</i>  | pectate lyase                             | -10,0 | 10 <sup>-9</sup>   |
| <i>epsE</i> | glycosyltransferase                       | -10,1 | 10 <sup>-12</sup>  |
| <i>yvdB</i> | anion transporter                         | -10,5 | 10 <sup>-14</sup>  |
| <i>yvdA</i> | carbonic anhydrase                        | -10,9 | <10 <sup>-14</sup> |
| <i>ndhF</i> | NADH dehydrogenase subunit 5              | -11,5 | 10 <sup>-6</sup>   |
| <i>pnbA</i> | para-nitrobenzyl esterase                 | -11,9 | 10 <sup>-13</sup>  |
| <i>ybcH</i> | hypothetical protein                      | -12,5 | 10 <sup>-4</sup>   |
| <i>yweA</i> | member of the processed secretome         | -13,0 | 10 <sup>-13</sup>  |
| <i>epsH</i> | glycosyltransferase                       | -14,0 | 10 <sup>-13</sup>  |
| <i>epsF</i> | glycosyltransferase                       | -14,9 | 10 <sup>-13</sup>  |
| <i>yvgO</i> | hypothetical protein                      | -15,5 | 10 <sup>-8</sup>   |
| <i>tasA</i> | major biofilm matrix component            | -16,4 | <10 <sup>-14</sup> |
| <i>aprE</i> | serine alkaline protease                  | -26,6 | 10 <sup>-13</sup>  |
| <i>bslA</i> | biofilm surface protein                   | -27,3 | <10 <sup>-14</sup> |

### 3.2. El sliding depende de la expresión de los genes *bslA* y *eps*.

Los experimentos de microarrays presentados anteriormente mostraron que los genes relacionados con la formación del biofilm y la capa superficial del mismo se encuentran sobre-expresados bajo las condiciones de sliding (Figura 43).

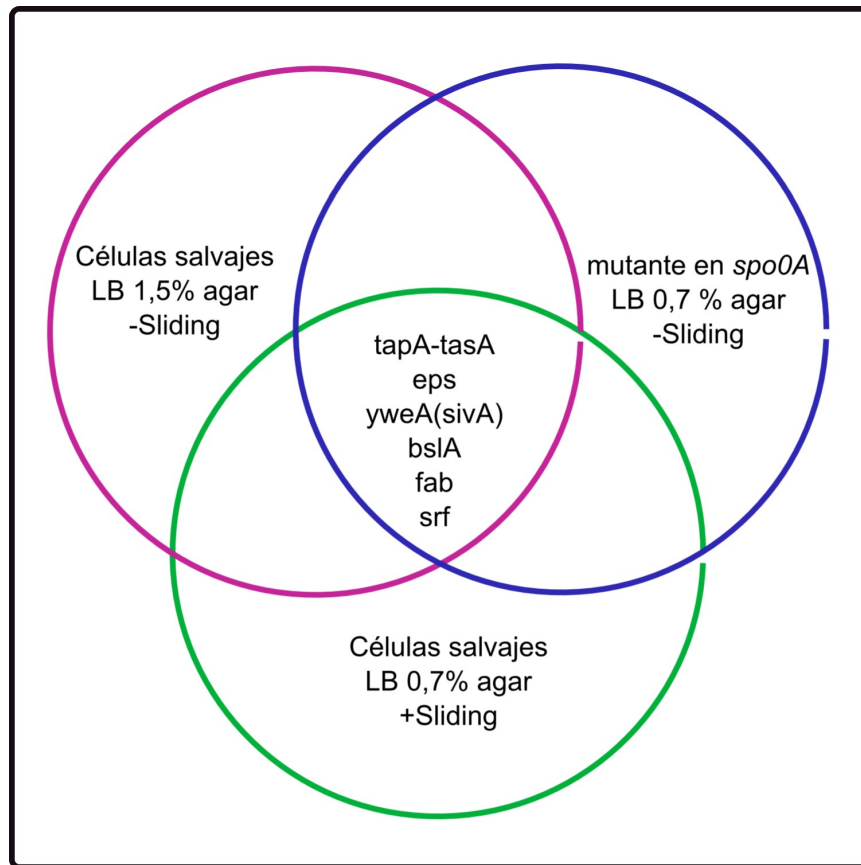


Figura 43: Esquema con los posibles genes con funciones en la movilidad de deslizamiento *B. subtilis* como se sugiere de los experimentos de transcriptómica realizados.

Basándonos en lo expresado anteriormente, no llama tanto la atención la sobre-expresión del componente fundamental de la matriz extracelular, el EPS. Varias funciones diferentes se han atribuido a la matriz extracelular, que van desde la protección a la integridad mecánica, reduciendo la fricción de las células con la superficie, la reserva de nutrientes y el “apagado” de la síntesis de flagelo a través de EPS, el cual interfiere con el rotor del flagelo (Vlamakis y col., 2013). Además, la matriz es una sustancia altamente viscoelástica y pegajosa, y se podría esperar que llegase a dificultar la expansión en lugar de facilitarla, sin embargo produce un aumento de la presión osmótica debido a la secreción del EPS.

Estudios realizados sobre la estructura del biofilm mostraron que el gen *bsIA* era el responsable de la gran resistencia a la penetración del agua y gases en la superficie del biofilm de *B. subtilis*, lo que explica la tolerancia de estas comunidades bacterianas a los agentes antimicrobianos. BslA es una proteína anfifílica que se localiza en la superficie del biofilm de manera dependiente del

EPS, lo que explica la permeabilidad que presenta una colonia de *B. subtilis* deficiente en BslA. Esta proteína le confiere al biofilm su famosa repelencia a los líquidos de manera comparable al teflón.

Para poder analizar y confirmar, o no, la participación de estos genes durante el sliding procedimos a introducir mutaciones en los genes *bslA*, *epsG* y *tasA* en la cepa BSN RG4365. Las mutaciones en *bslA* o *epsG* produjeron un fenotipo nulo en sliding de BSN (Figura 44). Por otra parte, la mutación del gen *tasA* no alteró las propiedades de deslizamiento de la cepa *B. subtilis natto*.

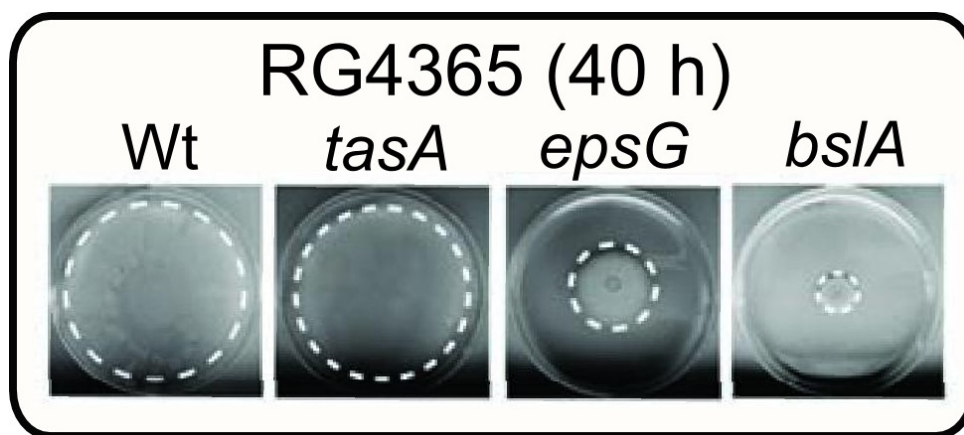


Figura 44: Capacidad de deslizamiento de *B. subtilis natto* y sus mutantes, de izquierda a derecha: tipo salvaje, *tasA*, *epsG* y *bslA*.

¿Son la producción de Eps y la síntesis BslA esenciales para el sliding? Para ello examinamos el efecto de las mutaciones de los genes *bslA* y *epsG* en *B. subtilis* NCIB3610 (capaces de desplazarse mediante sliding y swarming) y en su mutante isogénica inactivada en *hag*. Mientras que el swarming en las cepas NCIB3610 mutantes en *bslA* y *epsG* no fue alterado (Figura 45), la capacidad de las cepas doble mutantes *hag/bslA* y *hag/epsG* para deslizarse se vio afectada de manera similar en la forma en que se redujo la mutación de genes *bslA* y *epsG* en la cepa BSN.

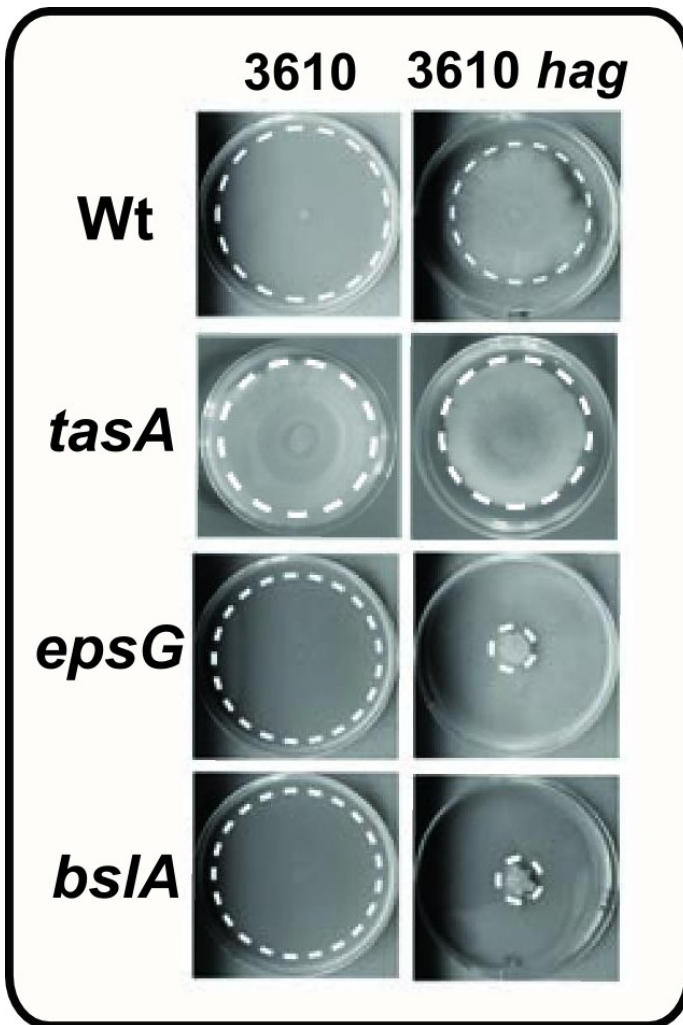


Figura 45: Capacidad de deslizamiento de *B. subtilis* NCIB3610 (24 h) junto con sus mutantes y *B. subtilis* NCIB3610 *hag* con sus dobles mutante *hag-tasA*, *hag-epsG* y *hag-bsIA*

Estos experimentos muestran que, tanto la proteína BslA como el Eps, que son componentes esenciales de la matriz del biofilm en *B. subtilis*, son también componentes indispensables para el sliding.

Respecto al gen *abrB*, el análisis de microarray, mostró que *abrB* se encuentra reprimido en condiciones permisivas de sliding, lo que está de acuerdo con nuestros resultados experimentales que mostraban la restauración parcial del sliding en la cepa mutante *spo0A*, cuando también se suprimió AbrB. Además AbrB es un represor de *bsIA* (Vlamakis y col., 2008; Aguilar y col., 2010), un gen que, ya hemos demostrado aquí, es requerido para el sliding (Figura 44 y 45).

En línea con los experimentos en *B. subtilis natto*, el swarming y el sliding no disminuyeron luego de que se introdujo la mutación en el gen *tasA* de NCIB3610 o en cepas *hag*, respectivamente (Figura 45), lo que sugiere que

*tasA* es un componente esencial de la matriz del biofilm, pero que no tendría un papel en la capacidad de *B. subtilis* para deslizarse. Es interesante observar que, en base al análisis del microarray, varios genes que codifican para metabolitos antimicrobianos (bacilisina, bacillibactina y plipastatina) se incrementaron bajo condiciones permisivas de sliding. En este escenario, la conocida actividad antimicrobiana de TasA (Stöver y Driks 1999) estaría sugiriendo un papel protector de esta proteína a las células en deslizamiento contra los depredadores, en lugar de tener un papel crucial en la movilidad.

### 3.3. El papel de los componentes celulares de la maquinaria de sliding en *B. subtilis*.

Los experimentos de microarray mostraron que el operón relacionado con la producción de surfactina (*srf*) fue inducido bajo las condiciones de trabajo. Este resultado estaría de acuerdo con el papel esencial de este tensoactivo en el sliding (Figura 46).

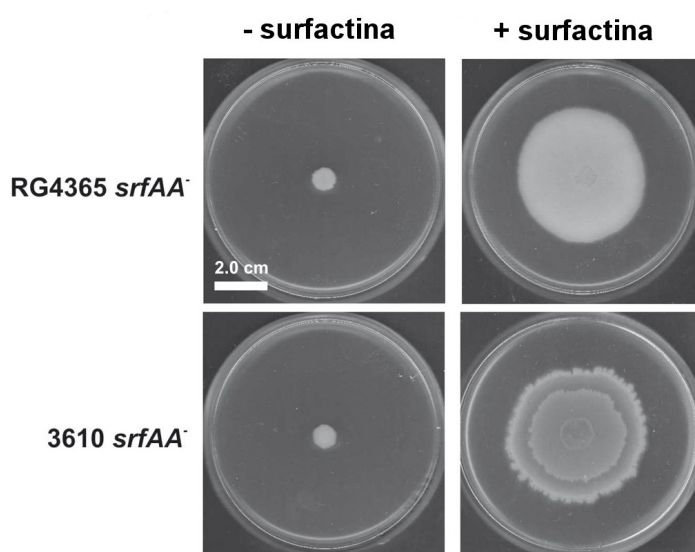


Figura 46: Rol de la surfactina en el desplazamiento sobre superficies. Desplazamiento de las cepas RG4365 y 3610 *srfAA* con y sin el agregado de surfactina sintética.

La surfactina es una molécula tipo lipopéptido secretada que, además de su función en la comunicación célula-célula, actúa como una señal parácrina en comunidades multicelulares (Vlamakis y col., 2008; López y col., 2009-a; López y col., 2009-b), se ha propuesto que permite la dispersión de las colonias a través de la producción de ondas de surfactantes que disminuyen la tensión superficial del espacio circundante (Angelini y col., 2009). Además, la

sobreproducción de EPS durante el sliding activo, que también es un componente de la matriz extracelular del biofilm, ha sido propuesta como una fuerza importante impulsora del crecimiento en los biofilms, debido a la tensión osmótica generada por su secreción en el espacio extracelular. (Seminara, 2012). Por lo tanto, es factible que durante el sliding, la surfactina y el EPS, sean secretados mediante la producción de ondas de tensoactivo y gradientes de presión osmótica en el espacio intercelular dentro de la comunidad, constituyendo así entre ambos, dos fuerzas que impulsan el movimiento cooperativo de las células ubicadas en la superficie. Además, la sobre-expresión del operón *opp* de (*spo0K*), cuyos productos favorecen indirectamente la fosforilación de Spo0A, puede interpretarse como una forma de asegurar que se produce una cantidad suficiente de Spo0A activo (Spo0A-Pi), para permitir el sliding activo. Al mismo tiempo, la sobre-expresión del gen *sivA*, inhibidor de KinA (Garti-Levi y col., 2013), aseguraría que la esporulación no se “dispare” durante el sliding activo y sugiere que KinA no es la histidín quinasa implicada en la activación de Spo0A para iniciar el desplazamiento (ver luego).

¿Cuál sería el papel de BslA, la otra molécula importante producida en exceso durante el sliding activo? Se ha demostrado que BslA es una proteína de tipo hidrofobina; que es secretada al espacio extracelular donde forma capas en la superficie de las interfases células-agar y de células-aire en el biofilm (Kobayashi e Iwano, 2012; Hogley y col., 2013). Debido a sus propiedades fisicoquímicas, BslA se comporta como una capa altamente hidrofóbica que recubre la superficie del biofilm (Kovács y col., 2012; Hogley y col., 2013). Aquí también confirmamos que BslA es un importante contribuyente en la capacidad repelente de agua de las células en movimiento. Analizando la figura 47, se puede apreciar que la deficiencia en la síntesis de BslA permite que una solución acuosa pase a través de las células inmediatamente. Estos resultados sugieren que esta proteína tipo hidrofobina podría desempeñar un papel activo durante el sliding protegiendo a las células

en deslizamiento contra la humedad de la superficie, como se propuso para los biofilms (Kobayashi e Iwano, 2012; Epstein y col., 2011).

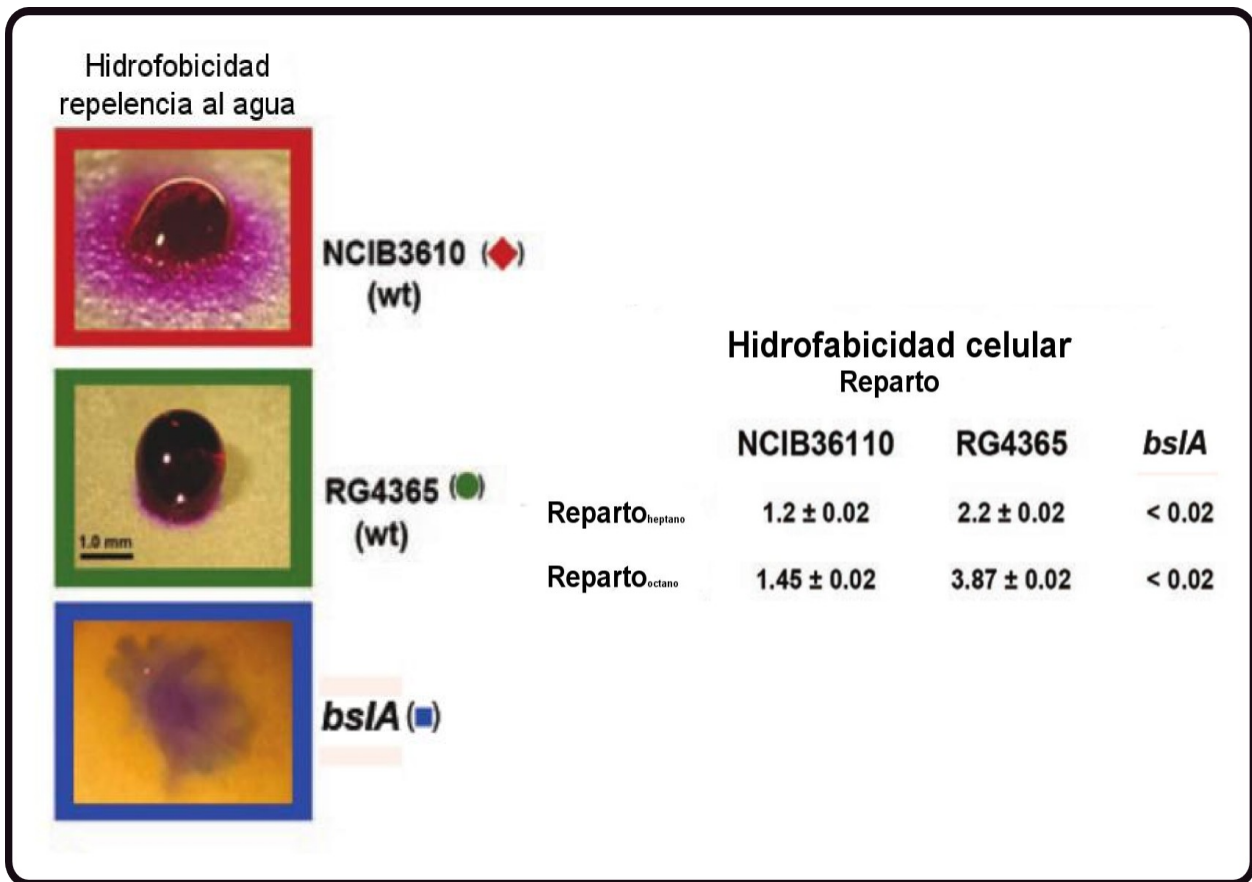


Figura 47: Superficie repelente al agua de la cepa BSN salvaje y su mutante en *bslA*. Las células NCIB3610 y RG4365, repelen la penetración del agua en la matriz celular. En contraste, las cepas deficientes en *bslA* no fueron capaces de repeler el agua la cual penetró casi inmediatamente y de manera uniforme a lo largo de la colonia. La hidrofobicidad celular se calcula utilizando el ensayo BATH (Zhang y Miller, 1992) de reparto entre una mezcla de hidrocarburos (octano o heptano) y cultivo de NCIB3610, RG4365 y la mutante en *bslA*.

Considerando este planteo propuesto, el fenotipo de sliding de células deficientes en *eps* y células deficientes en *bslA* podría ser complementado cuando ambos tipos de células están presentes juntas durante el deslizamiento. En apoyo de esta hipótesis, un estudio previo sobre la formación de biofilms en *B. subtilis*, también sugiere que estos componentes pueden ser compartidos entre las cepas que producen uno pero no otro componente dentro de una misma colonia (van Gestel y col., 2014; van Gestel

y col., 2015). Como se muestra en la Figura 48, la mezcla de células productoras de EPS y no de BslA con células productoras de ésta última pero no de EPS, permite que ambos tipos celulares se deslicen sobre la superficie del agar.

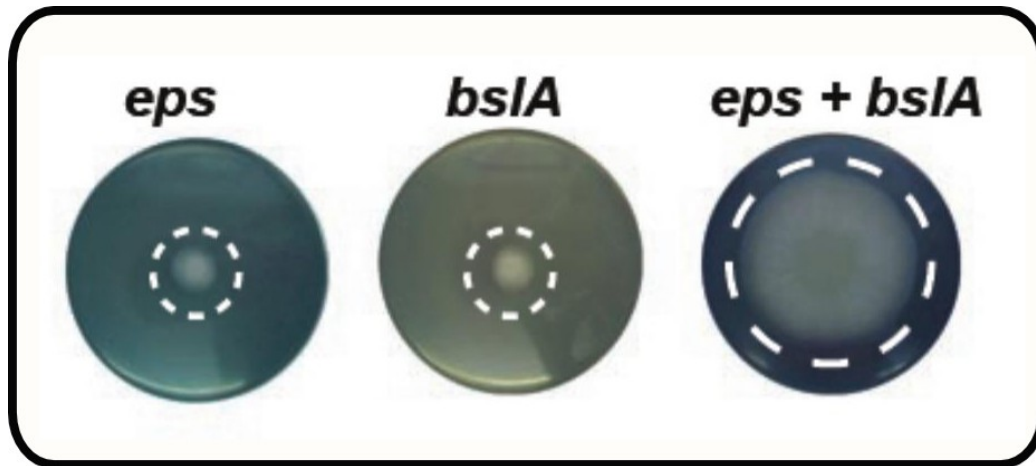


Figura 48: Complementación entre cepas incapaces de deslizarse. Ni las cepas deficientes en *bslA* ni *eps* son capaces deslizarse por separado, pero cuando se inoculan juntas, se restablece el fenotipo de deslizamiento.

Mientras que los genes implicados en la síntesis de ácidos grasos (AG) (es decir *fabF*, *fabHBA*, *fabG*, etc.) eran sobre-expresados en células salvajes, bajo condiciones de sliding permisivas, los genes implicados en la degradación de AG (es decir *fadR*, *fadA*, *fadE*, etc.) se reprimieron.

¿Estamos ante un caso de síntesis de lípidos activa para la formación y remodelación de la membrana, necesaria para este tipo de movimiento?

Con el fin de confirmar esta hipótesis basada en los resultados *in sílico*, se procedió a bloquear específicamente la síntesis de AG *de novo* en *B. subtilis*. Las células se crecieron bajo condiciones permisivas tanto de swarming como de sliding. Para este fin, se trataron la células de *B. subtilis* con el antibiótico cerulenina, que es un inhibidor específico de la enzima condensante FabF (Pedrido y col., 2013), a concentraciones sub-CIM (por debajo de  $2 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ), que no afectan el crecimiento vegetativo (Figura 49 a-b; Gottig y col., 2005).

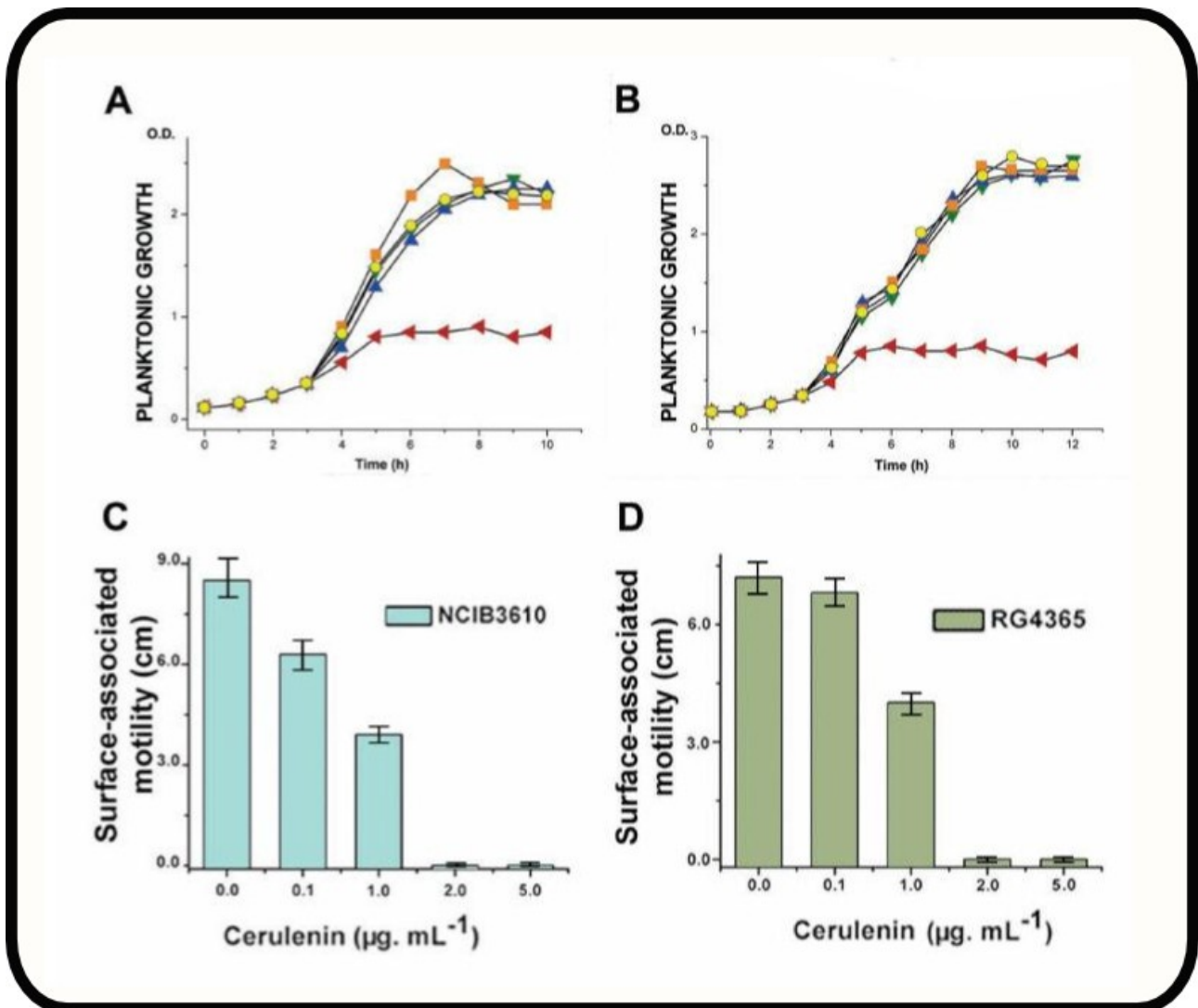


Figura 49: En esta gráfica se muestran los promedios de tres experimentos independientes.

Las concentraciones cerulenina fueron las siguientes (Ay B) Crecimiento planctónico con agitación. (◄) 5.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , (▲) 2.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , (▼) 1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , (●) 0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , y (■) sin agregado. (C-D)

Muestran un efecto inhibitor dependiente de la dosis de cerulenina tanto en el swarming como del sliding en células de *B. subtilis*.

Nuestros resultados muestran que a concentraciones sub-CIM de cerulenina se produjo un impedimento dependiente de la dosis, sobre la movilidad, tanto de sliding como de swarming en *B. subtilis* (Figura 49 y 50).

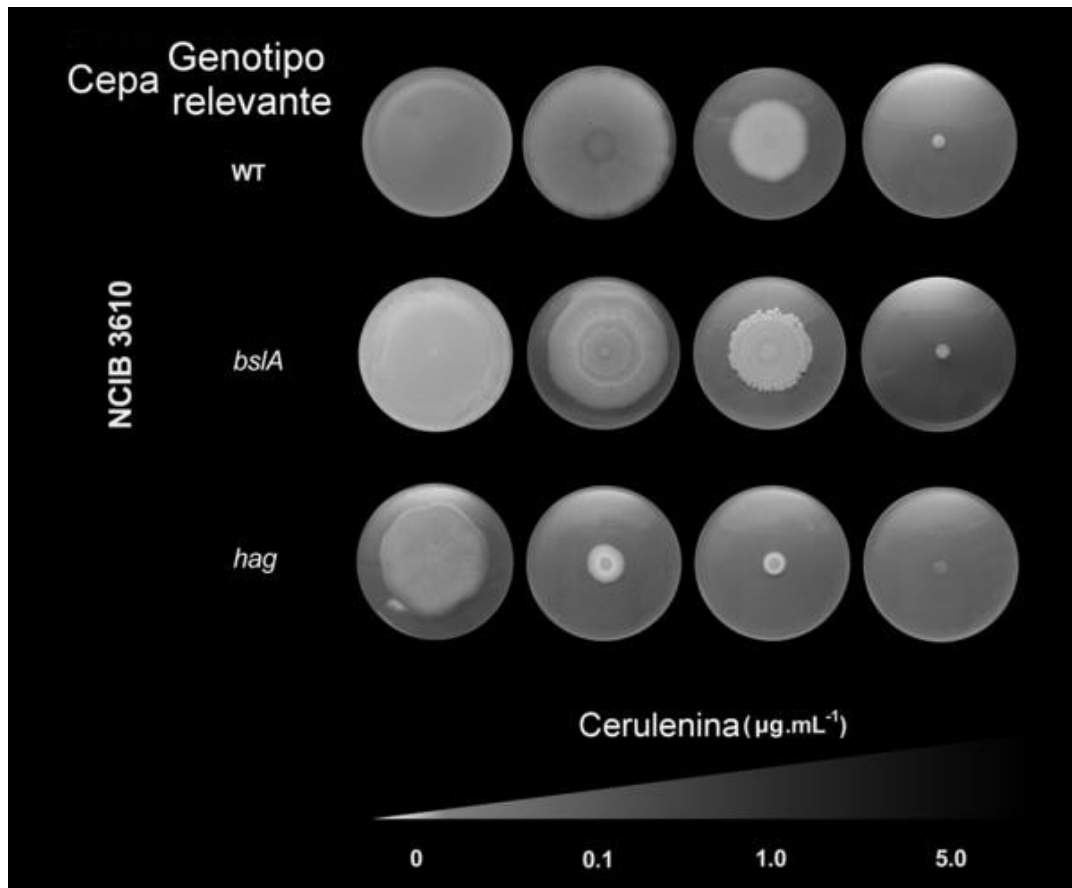


Figura 50: Efecto dosis/respuesta dependiente de las concentraciones sub-MIC de cerulenina de las cepas de tipo salvaje de NCIB3610 en el swarming y sliding y de sus mutantes en *bslA* y *hag*, respectivamente. Se realizaron experimentos de swarming y sliding como se indica en materiales y métodos, pero con la inclusión de la concentración de cerulenina que se indica en las placas de agar soft.

Estos resultados confirman los datos de microarrays y sugieren que una síntesis activa de AG *de novo* constituye un requisito para el desplazamiento sobre superficies. Sorprendentemente, la suplementación con AG exógenos (nC16:0 y nC18:1, ácidos palmítico y oleico, respectivamente) en las placas de LB con agar soft que contenían cerulenina ( $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) no pudo recomponer la inhibición de la movilidad sobre la superficie en *B. subtilis*, pero permitió la reanudación del crecimiento del planctónico de cultivos tratados de forma similar con cerulenina pero incubado bajo condiciones de agitación (Figura 51).

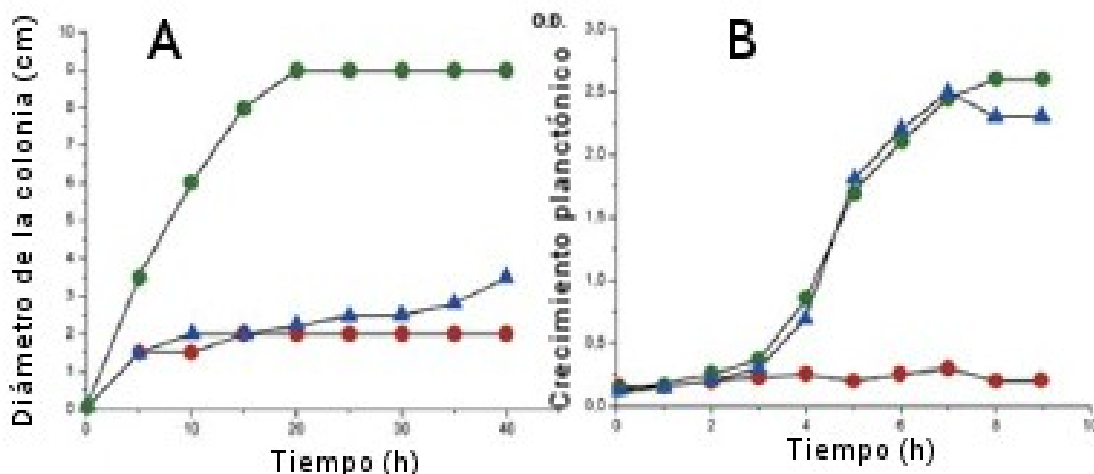


Figura 51: La suplementación con ácidos grasos (palmítico (nC16:0) y oleico (nC18:1)) (A) no puede restaurar la capacidad de deslizamiento de RG4365 salvajes tratadas con una concentración sub-CIM de cerulenina y pero logra complementarlo con el agregado de extracto de RG4365 crecido de manera exponencial (B). Los gráficos son el resultado de un experimento representativo que se repitió cinco veces. Los siguientes símbolos representan: (-●-) cerulenina 2.0 µg.mL<sup>-1</sup> gráfico de la izquierda y cerulenina 5,0 µg.mL<sup>-1</sup> gráfico de la derecha, (-▲-) cerulenina 2.0 µg.mL<sup>-1</sup> + AG, gráfico de la izquierda y cerulenina 5,0 µg.mL<sup>-1</sup> gráfico de la derecha+ AG; (-●-) ninguno.

¿Por qué la adición de los AG nC16:0 y nC18:1 no suprime el efecto negativo de la cerulenina en el sliding, pero permite la reanudación del crecimiento planctónico?

Para responder a esta pregunta, se analizó el perfil de AG en muestras de cepas de *B. subtilis* salvajes cultivadas bajo condiciones permisivas de sliding y de cultivos líquidos con agitación (Figura 52).

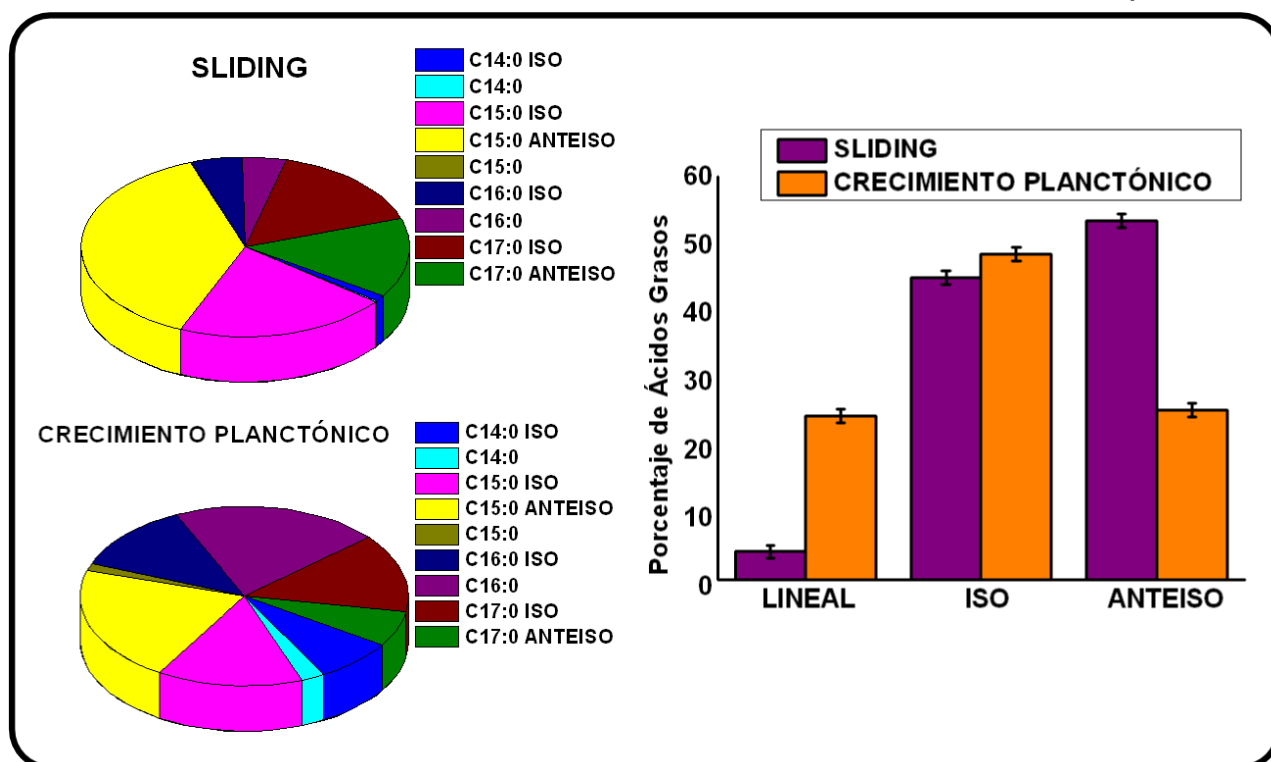


Figura 52: El perfil de ácidos grasos de novo sintetizado por las células de tipo salvaje *B. subtilis* RG4365 en condiciones de crecimiento planctónicas en LB líquido (círculo de abajo) y sliding activo en placas LB agar soft (círculo arriba). Se presentan los promedios de ocho repeticiones.

*B. subtilis* a diferencia de *E. coli*, sintetiza ácidos grasos saturados lineales y ramificados (iso- y anteiso) a 37 °C para mantener una fluidez adecuada de la membrana. Nosotros encontramos que bajo condiciones de sliding activo, hay un predominio de la síntesis de AG saturados con puntos de fusión inferiores (anteiso-C15:0 y anteiso-C17:0) y una disminución en la síntesis de la AG con puntos de fusión más altos (lineal C15:0 y C16:0). En general, durante el sliding activo, el porcentaje de AG lineales pasa del 25,0 a 4,0% mientras que el contenido de AG-anteiso se eleva del 26,0 al 54,0%. Simultáneamente, el contenido global de AG-iso permanece alrededor del 50,0%, independientemente de las condiciones de crecimiento. Por esta razón creemos que, el notable incremento de la síntesis de AG-anteiso con bajo punto de fusión, y la disminución simultánea en la síntesis de AG lineales, permitiría la síntesis de lípidos de membrana de puntos de fusión más bajos para la biogénesis de membranas que posean una mayor fluidez. Proponemos que la síntesis de membranas celulares con una fluidez superior, sería

necesaria para facilitar la translocación en grupos de células de *B. subtilis* en superficies sólidas en ausencia de flagelo. En este escenario, el aumento de la fluidez de la membrana, que podría requerirse para el deslizamiento, fue superior al que se alcanzó al suplementar con AG lineales a los cultivos tratados con cerulenina bajo condiciones permisivas de sliding. Para probar esta idea se suplementó a células de *B. subtilis* que se incubaron en condiciones de permisivas de sliding en la presencia de cerulenina con AG ramificados (figura 53).

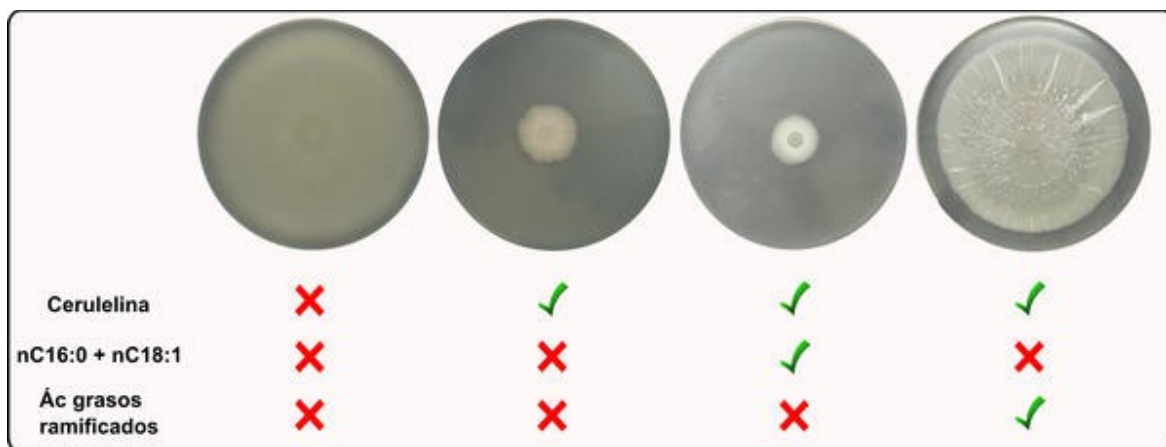


Figura 53: El agregado de AG exógenos ramificados, pero no AG lineales (ácidos palmítico (C16:0) y oleico (C18:1)) restauran la capacidad del sliding de *B. subtilis* en la ausencia de síntesis AG *de novo*.

Como se predijo por la hipótesis, la capacidad de deslizamiento fue totalmente restaurada cuando los AG ramificados se agregaron a células con una síntesis *de novo* de AG interrumpida.

En base a estos resultados podemos aseverar que el factor transcripcional maestro Spo0A, es el regulador clave del sliding en *B. subtilis* y que los comportamientos sociales de *B. subtilis* de formación del biofilm y la movilidad tipo sliding, comparten varios de sus componentes esenciales (EPS, BslA, síntesis *de novo* de ácidos grasos):

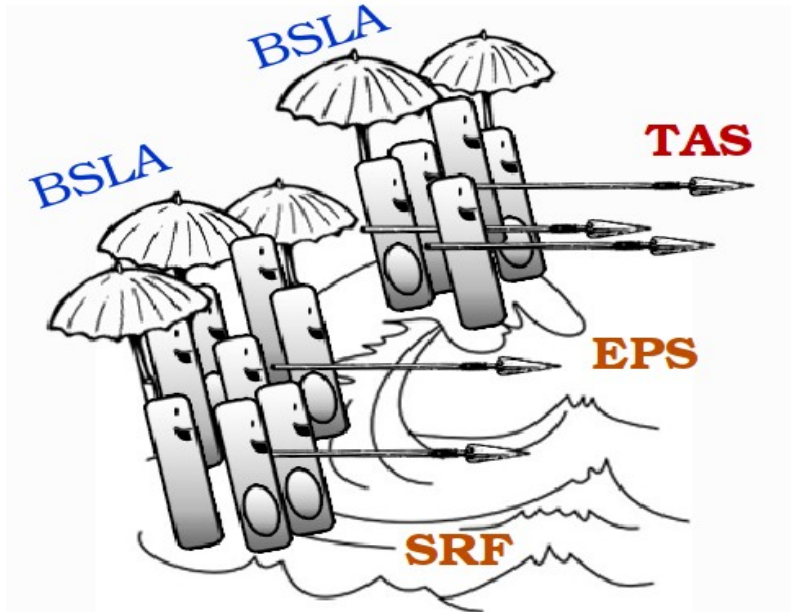


Figura 54: Funciones propuestas para de la surfactina, EPS, TasA y BslA en el deslizamiento social de *B. subtilis*.

Hasta este momento, sabemos cuáles son los genes implicados en el sliding activo y que los mismos se encuentran bajo el control de Spo0A, pero no sabemos cómo es que se inicia el deslizamiento. Por lo reportado hasta este momento, sabemos que Spo0A en su forma activa, Spo0A-P, recibe los fosfatos a través de una cascada de fosforilación conocida como "phosphorelay". Esta posta de fosfatos, recibe los grupos fosforilos de al menos 4 de las 5 quinasas sensoras KinA-D.

En el próximo capítulo nos concentraremos en encontrar cuál o cuáles de estas quinasas podrían ser las responsables de gatillado (activación) del sliding y cuál/es son las señales ambientales responsables de esta respuesta. La importancia de dilucidar este mecanismo, reside en la relevancia intrínseca del mismo, el cual, no sólo está relacionado con la interacción benéfica con el tejido vegetal, sino también en la implicancia de la colonización por parte de un organismo patógeno o probiótico con su hospedero.

## Capítulo 4

### Regulación del sliding

Como se mencionó en el capítulo anterior, a partir de aquí nos concentramos en dilucidar cuál o cuáles serían las quinasas responsables de la activación de Spo0A para el gatillado del sliding y cuál o cuáles podrían ser las señales que lo activen. La comprensión de este mecanismo nos provee una herramienta valiosa la comprensión de las interacciones entre un microorganismo, en este caso *B. subtilis* y la superficie a colonizar, que puede ser beneficiosa como por ejemplo el tejido vegetal y la mucosa intestinal de mamíferos o del patógeno con su hospedador.

#### 4.1 El sistema de señalización del phosphorelay coordina múltiples comportamientos multicelulares en *B. subtilis*.

Hasta ahora, se han descrito dos comportamientos multicelulares de *B. subtilis* que están bajo el control del sistema de señalización mediado por el phosphorelay: formación de cuerpos fructíferos (incluida la formación de esporas) y el desarrollo del biofilm (Branda y col., 2001; Vlamakis y col., 2013; Mhatre y col., 2014). Como se demuestra en este trabajo, la movilidad tipo sliding es un comportamiento cooperativo que se encuentra bajo el control del regulador maestro en *B. subtilis*, Spo0A y por lo tanto, de la posta de fosfatos.

La concentración de Spo0A-P está determinada por la actividad de al menos cuatro quinasas (KinA, KinB, KinC y KinD) que o bien actúan directamente sobre Spo0A o indirectamente a través de phosphorelay. El phosphorelay está compuesto en primer instancia por Spo0F, que es fosforilado por cualquiera de las quinasas: KinA, KinB, KinC o KinD y luego pasa su grupo fosforilo a Spo0B, que saldrá a fosforilar Spo0A. Hay una quinta quinasa, KinE, que también puede alimentar esta vía, pero no se conoce su función aún.

En esta etapa, hemos podido identificar quién es el regulador del sliding y cuáles son los genes necesarios para que se desarrolle este comportamiento social, por lo tanto, la pregunta que debemos responder ahora es: ¿Qué histidin quinasa del phosphorelay regula el sliding?

Para responder esta pregunta, se construyeron cepas mutantes isogénicas RG4365 en las distintas quinasas que llevan sus fosfatos al phosphorelay a fin de analizar su comportamiento ante condiciones permisivas de sliding.

Como se muestra en la Figura 55, la cepa salvaje y las mutantes *kinA*, *kinD* y *KinE* muestran un patrón similar de movimiento tipo sliding. Por otra parte, para el caso de la mutante en *kinB* y, en menor medida *kinC*, muestran un retaso parcial en la capacidad de deslizarse. Para confirmar que KinB y KinC son quinasas sensoras que intervienen en el control del deslizamiento, se construyó una cepa doble mutante *kinB-KinC*, y se comparó su fenotipo de deslizamiento en comparación con las mutantes isogénicas *spo0A* y *spo0F* los cuales, presentan un fenotipo completamente nulo para el deslizamiento en superficie. Como se muestra en la figura 56, la cepa doble mutante *kinB-KinC* muestra un fenotipo nulo comparable como el que presentan las mutantes en *spo0A* y *spo0F*.

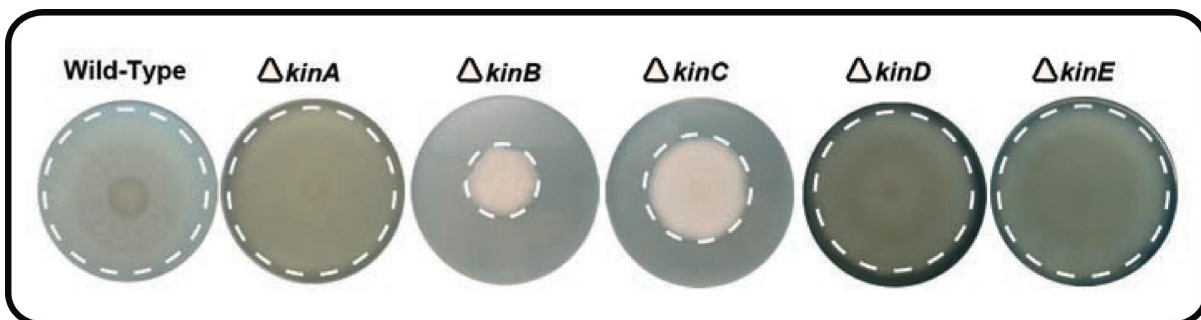


Figura 55: Las quinasas sensoras del phosphorelay, KinB y KinC, son las responsables de la movilidad social tipo sliding en *B. subtilis*. Fenotipo de sliding de cepas simples mutantes en *kin*, de la cepa de *B. subtilis natto* después de 36 h de incubación en placas de LB soft a 37 °C.



Figura 56: Fenotipo de sliding completamente deficiente de cepas *spo0A*, *spo0F* y doble mutante *kinB-KinC* de *B. subtilis natto* en las mismas condiciones de incubación.

En la Figura 57, la cinética de deslizamiento de las distintas cepas mutantes en las quinasas del phosphorelay, confirman que KinB y KinC son los dos quinasas de sensores que rigen el deslizamiento en *B. subtilis* y que la actividad KinB es más importante que la actividad KinC para el movimiento tipo sliding.

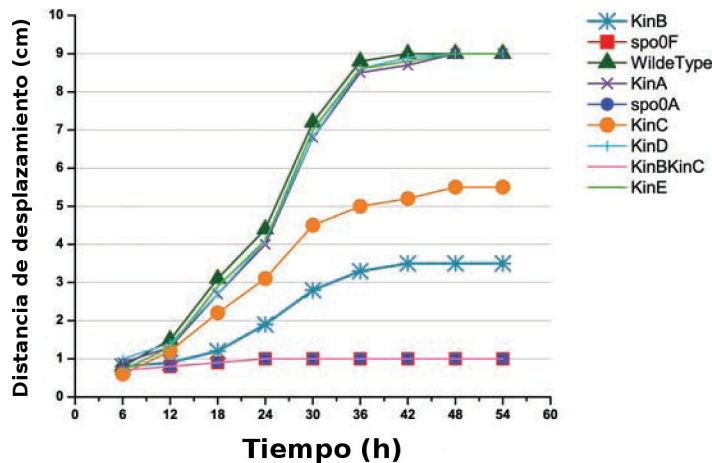


Figura 57: Cinética de la movilidad de deslizamiento de diferentes mutantes en el phosphorelay a distintos tiempos.

Como era de esperar la trans-complementación (en el locus *amyE*, gen no esencial) de las cepas mutantes en *kinB* y *kinC* con una copia salvaje de *kinB* y *kinC*, respectivamente, restaura por completo el fenotipo de deslizamiento (Figura 58).

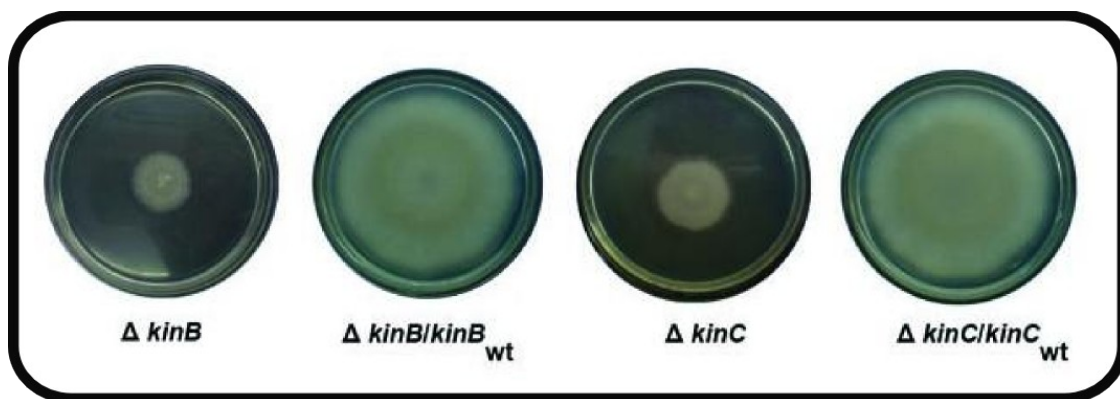


Figura 58: Complementación de las cepas *kinB* y *kinC* en el sliding.

¿Es llamativo que encontremos 2 quinasas del phosphorelay involucradas en la activación del sliding? No, ya que es sabido que en la cepa NCIB3610 las cuatro quinasas se dividen en pares redundantes en la regulación del

comportamiento social. Estos pares son el par KinA y KinB para la esporulación y la KinC y KinD para la formación de biofilm. Esta hipótesis la verificamos también en la cepa RG4365 *B. subtilis natto* que, como podemos observar en la Figura 59, así como para la cepa NCIB3610 (Chen y col., 2012; Beauregard y col., 2013), KinC y KinD regulan el desarrollo del biofilm en respuesta a polisacáridos derivados de las plantas que constituyen una de las señales capaces de inducir ambas quinasas (Beauregard y col., 2013). De todas maneras poco se sabe acerca de las señales ambientales que estas quinasas reconocen y que, podría estar involucrada en la interacción de *B. subtilis* con el tejido vegetal.

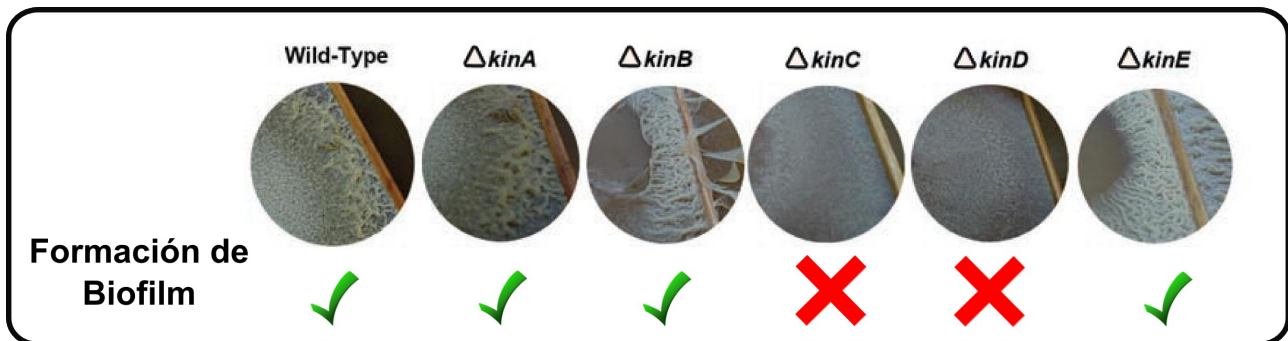


Figura 59: La esporulación, biofilm y movilidad de deslizamiento son dependientes de Spo0A en *B. subtilis* regulada por duplas de quinasas sensoras del phosphorelay. En la figura se puede observar como en las cepas *kinC* y *kinD* no se produce la estimulación de la formación de biofilm (rugosidad) al ser estimuladas por el tejido vegetal.

Curiosamente, hemos propuesto en este trabajo, que una de las quinasas que controla el deslizamiento es, KinB que, junto con KinA regulan la entrada en la esporulación y que la segunda quinasas involucrada es KinC, que como mencionamos anteriormente, junto con *kinD*, inician la formación del biofilm (Aguilar y col., 2010; López y col., 2009-a; Chen y col., 2012; Lundberg y col., 2013; Beauregard y col., 2013).

Por lo tanto, y basándonos en la literatura proponemos que *B. subtilis* utiliza las histidin quinasas del phosphorelay, de a pares para controlar diferentes comportamientos multicelulares. Los pares de histidina quinasas son KinA/KinB, KinC/KinD y KinB/KinC los cuales controlan la formación de esporas y cuerpos fructíferos (Trach y Hoch, 1993, Wang y col., 1997; Branda y col.,

2001; Higgins y Dworkin, 2012, Fujita y Losick, 2005), desarrollo del biofilm (López y col., 2009-a; Aguilar y col., 2010; Chen y col., 2012; Lundberg y col., 2013; Beauregard y col., 2013 y esta Tesis) y el deslizamiento social respectivamente, (Figura 60).

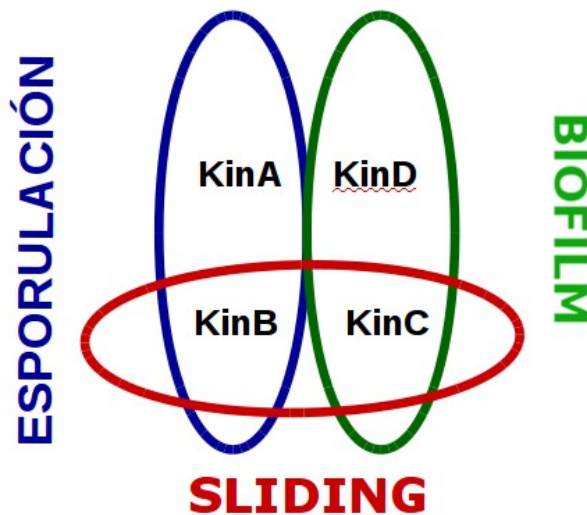


Figura 60: Esquema de participación de las quinasa en los distintos comportamientos multicelulares de *B. subtilis*.

#### 4.2. La señal de deslizamiento.

¿Cuál es la naturaleza de la señal, que actúa sobre KinB y/o KinC, responsable de desencadenar el deslizamiento en *B. subtilis*? Para responder a esta pregunta fundamental tenemos que tener en cuenta dos premisas.

En primer lugar, la señal de inducción del sliding, responsable de la autofosforilación de KinB y KinC, no debe ser lo suficientemente fuerte como para activar la fosforilación de Spo0A a altos niveles, dependiente de KinB-P/KinC-P y así desencadenar en la formación de esporas, porque no observamos la inducción de genes esporulación en condiciones de sliding activo (Capítulo 2).

En segundo lugar, la misma señal que activa la autofosforilación de KinB y KinC para aumentar los niveles de Spo0A-P e inducir el deslizamiento a su vez debe prevenir la formación de demasiado Spo0A-P por KinC-P que inicie la formación del biofilm, debido a que ambos comportamientos multicelulares serían antagónicos entre sí y no sería operativo que se den ambos al mismo tiempo durante el desarrollo.

Un estudio reciente, sugiere que la actividad de KinB está regulada por la tasa de respiración a través de su segundo segmento transmembrana. Kolodkin-Gal y col. (2013) proponen que el segundo segmento transmembrana de KinB está asociado con dos citocromos, *caa3* y *bc*, los cuales, sensan la tasa respiratoria. Ellos interpretan que, en condiciones de reducida de transporte de electrones, KinB se activa para formar un biofilm más robusto y por lo tanto disponer de mayor superficie de contacto en la interfase con el aire y de esta manera incrementar la captación de O<sub>2</sub>. También proponen que KinA interactúa a través de su dominio PAS-PAC con la dupla NAD<sup>+</sup>/NADH actuando también como un sensor redox. Bajo condiciones de formación del biofilm, existe una población de células, encerradas en una matriz, con nutrientes que se agotan rápidamente (Vlamakis y col., 2013). Por lo tanto, si se produce una reducción en el transporte de electrones se activa la formación de biofilms dependiente de KinC-P y la esporulación y el sliding no estaría activo puesto que son eventos antagonistas. Basándonos en lo expresado, consideramos poco probable que, la tasa respiratoria, detectada por el segundo segmento transmembrana de KinB, sea la condición fisiológica que activa el deslizamiento. Consideramos que en deslizamiento activo, en medio semi-sólidos rico, las condiciones fisiológicas de las células en sliding son claramente diferentes a las células sésiles que se encuentran formando un biofilm.

De acuerdo con lo reportado en la literatura, el potasio intracelular representa una señal negativa para KinC (Lopez y col., 2009-a; Lundberg y col., 2013). Éste, es uno de los principales iones intracelulares, que es utilizado por la célula como uno de los principales osmoreguladores. Además, retrasa la activación a través de KinC al interactuar con el dominio sensor citoplásmico PAS-PAC de la quinasa. Se sabe que *B. subtilis* forma biofilm en respuesta a pequeñas moléculas producidas y secretadas por las bacterias circundantes y ella misma mediante un sistema de comunicación célula-célula conocido como "quorum sensing". Una de estas pequeñas moléculas es la surfactina. Esta, además, es capaz de extraer, de manera selectiva, el potasio intracelular mediante la formación de poros a través de la membrana. De esta manera, libera el dominio PAS-PAC de KinC activándolo para iniciar la formación del

biofilm. Además, la concentración intracelular de potasio disminuye a medida que las células de *B. subtilis* alcanzan la fase logarítmica tardía cuando comienza la síntesis de surfactina que, recordemos está regulado negativamente por SinR, el cual a su vez regula negativamente la expresión del operón *mstX-yugO*, un posible canal de extracción de potasio implicado en la formación del biofilm (Lopez y col., 2009-a; Lundberg y col., 2013). En este modelo la disminución en la concentración de potasio extracelular mediada por surfactina/YugO activa KinC.

Curiosamente, a diferencia de las colonias redondas formadas en placas de agar LB y LBY por la cepa RG4365 salvaje y su derivada isogénica en *kinC*, la cepa mutante en *kinB* forma colonias y biofilms con una morfología en forma de dendritas, con forma muy similar a la morfología de las colonias formadas por la cepa salvaje de *B. subtilis* crecidas en medio sólido deficiente en potasio reportado por Kinsinger y col. (2005) (Figura 61). En este trabajo, al incubar cepas de *Bacilli* en medios permisivos para la movilidad con y sin el agregado de potasio se puede observar que las bajas concentraciones de iones de potasio ( $\mu\text{M}$ ) favorecen la formación de colonias con forma de dendritas y los altos niveles (mM) favorecen la formación de colonias redondeadas.

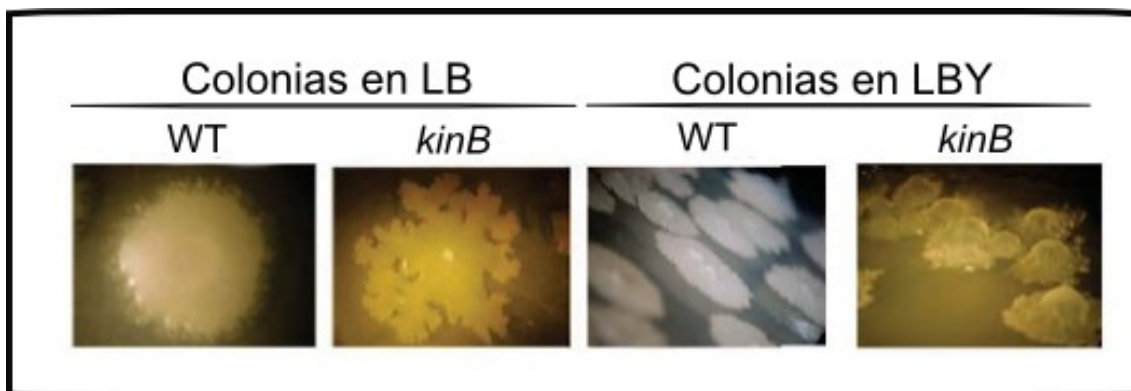


Figura 61: El potasio como señal fisiológica que regula la movilidad tipo sliding en *B. subtilis*. La morfología tipo dendritas de las colonias RG4365 *kinB* en LB (A) y los biofilms formados en LBY (B).

Debido a la similitud en la morfología de las colonias formadas por la cepa mutante en *kinB* en un medio rico, con la morfología de las colonias producidas por la cepa tipo salvaje en un medio sólido deficiente en potasio,

nos motivó para investigar si el potasio estaba implicado en la regulación de *kinB*. Sorprendentemente, como se muestra en la figura 62, hemos descubierto un efecto positivo, dependiente de la dosis de iones de potasio, en el sliding de las cepas salvaje y cepas *kinC*, ambas con una copia genómica funcional de *kinB*. La estimulación del sliding se observó en los niveles de potasio entre 50 mM a 100 mM con una concentración óptima de 75 mM para la estimulación del deslizamiento, que son comparables a las concentraciones de potasio que inhibían KinC para activar la formación de biofilms (Lopez y col., 2009-a; Lundberg y col., 2013). En contraste, no hubo ningún efecto activador del sliding, debido al agregado de potasio sobre las mutantes en *kinB* (Figura 62).

Estos resultados sugieren fuertemente que el potasio representa una señal positiva para la activación de KinB. Un examen más minucioso del fenotipo de las colonias y del biofilm producido por cepas mutantes en *kinB* (Figura 62), indicaría que KinB estaría inhibiendo la formación de biofilm mediada por KinC, puesto que la morfología de las colonias de las cepas *kinB*, en ambos medios sugiere la formación de biofilms más robustos.

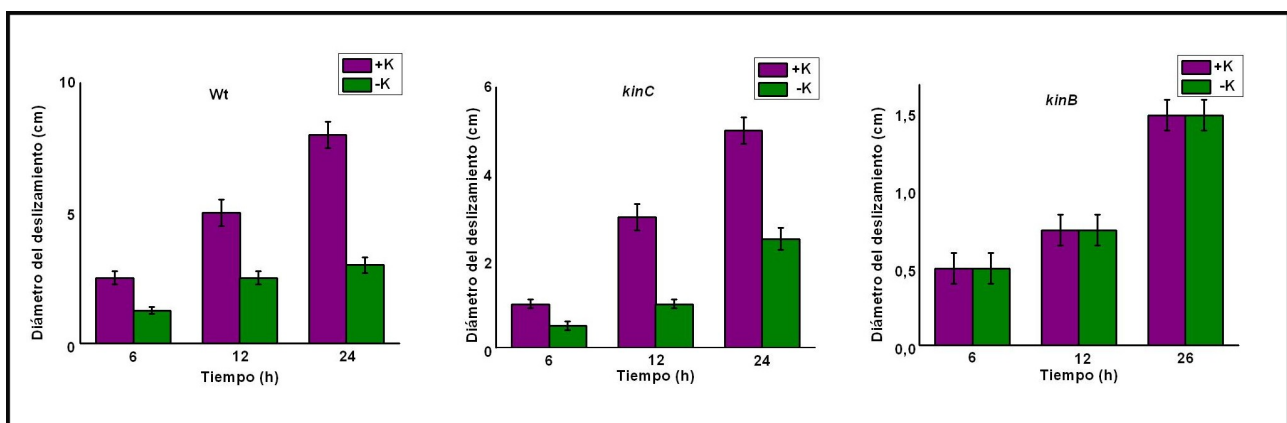


Figura 62: El potasio estimula deslizamiento de cepas competentes en KinB (de tipo salvaje y cepas mutantes *kinC*) pero no en células *kinB*-.

Así el efecto inhibitorio que tiene el potasio sobre la formación del biofilm dependiente de KinC es independiente del efecto positivo que tiene el mismo ión y a las mismas dosis sobre el sliding en cepas competentes en *kinB*.

Como se mencionó anteriormente, KinB es la histidina quinasa sensora, que, junto con KinA, regulan la esporulación de *B. subtilis*. Aunque una cepa mutante *kinB* es capaz de formar esporas (fenotipo  $spo^+$ ), una cepa doble mutante *kinA-kinB* es casi incapaz de esporular (fenotipo  $spo^0$ ) (Trach y Hoch 1993). Esto, nos motivó a investigar si el efecto positivo de potasio sobre el sliding dependiente de KinB, también era válido para la formación de esporas.

Como se muestra en la Tabla 13, el potasio no representa una señal que estimule la formación de esporas. Como vimos en la figura anterior, la capacidad de esporular de cepas tipo salvajes ( $kinA^+ kinB^+$ ) y cepas mutantes KinA ( $kinA^- kinB^+$ ) en presencia y ausencia de iones de potasio (75 mM) no muestran diferencias significativas respecto de la estimulación de la esporulación. Las células viables y las esporas se determinaron después de 30 h de crecimiento en medio SM como se describió previamente en la sección de Materiales y Métodos.

Tabla 13: Recuento de células viables y esporas ante el agregado de potasio.

| Genotipo relevante       | Viables (UFC/mL)  |                   | Esporas (UFC/mL)  |                   |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                          | -K <sup>+</sup>   | +K <sup>+</sup>   | -K <sup>+</sup>   | +K <sup>+</sup>   |
| Wt ( $A^+B^+$ )          | $3,5 \times 10^8$ | $4,0 \times 10^8$ | $1,0 \times 10^8$ | $3,5 \times 10^8$ |
| <i>kinA</i> ( $A^-B^+$ ) | $9,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^8$ | $1,0 \times 10^7$ | $9,0 \times 10^6$ |

Los resultados presentados son los más representativos de tres experimentos realizados por separado.

El potasio no logró estimular la esporulación en la cepa salvaje ni en la cepa *kinA*, aunque ambas poseen una copia genómica de *kinB* funcional. En consecuencia, el potasio constituye una señal específica para la movilidad tipo sliding que cumple precisamente las dos premisas propuestas ser demasiado débil para desencadenar la esporulación (primera premisa, figura 62), pero, al mismo tiempo, ser lo suficientemente fuerte como para activar el sliding sin permitir la formación de biofilms (segunda premisa, figura 61) (Lopez y col 2009-a; Lundberg y col., 2013). Además, el papel dual de los iones de potasio, que se encuentran presentes en altos niveles intracelulares en los primeros estadios de crecimiento, como activador de KinB e inhibidor de KinC, señalan a

KinB como la quinasa del phosphorelay responsable del inicio del movimiento cooperativo tipo sliding.

La pregunta que debemos contestar a continuación se centra en qué tipo de señal representa el potasio para la quinasa. ¿Esta señal que activa KinB es directa o indirecta?

Para responder este interrogante decidimos analizar la estructura de KinB en búsqueda de dominios conservados y/o secuencias motif presentes que pudieran estar involucradas en la respuesta al potasio. Para esto decidimos analizar la estructura de los canales de potasio en búsqueda de secuencias específicas para este catión.

Los canales de  $K^+$  se encuentran en casi todos los organismos, tanto en los de vida libre como las bacterias y arqueas como en eucariotas (Johansson y Blatt, 2006), con la excepción de bacterias parasitarias o simbióticas que tienden a no tener canales de  $K^+$ , mientras que los que muestran el estilo de vida más versátil a menudo poseen más de un gen para canales de  $K^+$ . Se especula que la función de los canales de  $K^+$  en procariotas es permitir la adaptación al medio ambiente y cambios metabólicos. La conservación básica de estructuras y mecanismos en los canales de  $K^+$  han permitido comprender el comportamiento de estos canales en distintos organismos. Basándose en las estructuras cristalinas y alineamiento de secuencias se pudo establecer una estructura básica mínima que se encuentra en la mayoría de los canales de  $K^+$ . Los canales de  $K^+$  típicos son tetrámeros, compuestos predominantemente de subunidades idénticas que se agrupan para formar un canal de permeabilidad a iones a través de membrana, aunque en los animales se pueden encontrar también heterotetrámeros con subunidades con similitud inter o intra molecular.

El núcleo mínimo necesario para el funcionamiento de un canal de  $K^+$  consta de una subunidad con dos hélices transmembrana, tradicionalmente conocidos como TM1 y TM2, que flanquean una hélice de poro y la secuencia del filtro de  $K^+$ . El núcleo entonces se encuentra compuesto por TM1-P-TM2 (P, "poro ") donde P, es una hélice corta (Goldstein y Colatsky, 1996; Kuo y col., 2005). En la figura 63, se muestra una representación de un canal típico de

potasio encontrado en procariotas, donde TM5 y TM6 son equivalentes a la secuencia mínima típica, TM1 y TM2 que rodean la secuencia del filtro P (Doyle y col., 1998).

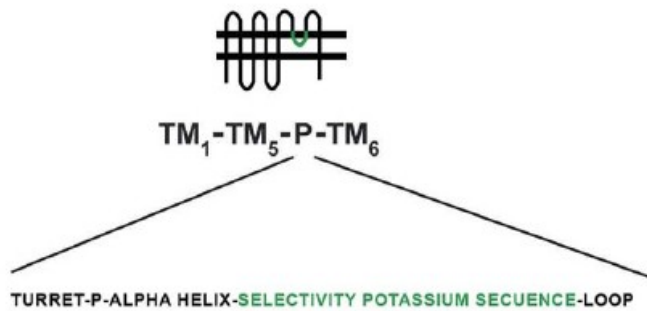


Figura 63: Una representación de la topología de membrana de un canal de potasio procariota típico que posee seis dominios transmembrana. La región del poro de potasio (P) rodeado por dos hélices alfa que se sumerge en la membrana está resaltado para indicar los componentes de la región del poro. (TM6). El filtro de selectividad para el potasio se destaca en verde.

Por otro lado se analizó la secuencia de KinB y descubrimos la secuencia SLKTNGTG que se encuentra en la región de unión de ATP de KinB, que está ausente en las otras cuatro quinasas sensoras del phosphorelay (Szurmant y Hoch, 2013) (Figura 64). Esta secuencia posee una homología significativa con la secuencia altamente conservada del filtro de K<sup>+</sup> (dominio-P), que se encuentra presente en el loop del poro de los canales de potasio, con una secuencia consenso TXXTXGYG (Heginbotham y col., 1994; Kuo y col., 2005). Se ha descrito, que mutaciones en la posición T de esta secuencia consenso resulta en la pérdida de selectividad del motivo hacia el potasio. (Figura 64).

|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--|--|
| M | E | I | L | K | D | Y | L | L | H | I | C | F | I | L | F | P | I | L | L | Y | Q | V | F | W | L | G | K | P | A | I | L | V | P | K | I | N | S | G | L |  |  |
| V | T | L | S | S | P | A | A | P | S | V | L | C | I | I | F | P | I | H | E | M | D | Y | I | Q | Y | G | L | Q | M | I | P | V | I | I | C | L | F | Y | I |  |  |
| S | T | A | S | G | L | T | V | A | A | S | V | L | C | F | E | L | L | F | Y | E | P | S | A | M | F | V | F | T | L | L | P | F | L | I | I | I | P | I | L |  |  |
| F | Q | K | K | W | P | F | M | S | K | A | K | L | L | L | S | L | L | I | S | C | V | E | I | F | L | F | F | A | S | S | W | I | L | S | A | L | N | I | N |  |  |
| L | N | F | Q | K | S | G | I | F | V | Y | E | A | A | V | S | G | L | F | R | S | S | V | L | L | S | I | Y | I | I | E | S | I | A | E | N | I | A | L |   |  |  |
| R | S | Q | L | I | H | S | E | K | M | T | I | V | S | E | L | A | A | S | V | A | H | E | V | R | N | P | L | T | V | V | R | G | F | V | Q | L | L | F | N |  |  |
| D | E | T | L | Q | N | K | S | S | A | D | Y | K | K | L | V | L | S | E | L | D | R | A | Q | G | I | I | T | N | Y | L | D | M | A | K | Q | Q | L | Y | E |  |  |
| K | E | V | F | D | L | S | A | L | I | K | E | T | S | S | L | M | V | S | Y | A | N | Y | K | S | V | T | V | E | A | E | T | E | P | D | L | L | I | Y | G |  |  |
| D | A | T | K | L | K | Q | A | V | I | N | L | M | K | N | S | I | E | A | V | P | H | G | K | G | M | I | H | I | S | A | K | R | N | G | H | T | I | M | I |  |  |
| N | I | T | D | N | G | V | G | M | T | D | H | Q | M | Q | K | L | G | E | P | Y | Y | S | L | K | T | N | G | T | G | L | G | L | T | V | T | F | S | I | I |  |  |
| E | H | H | G | T | I | S | F | N | S | S | F | Q | K | G | T | T | V | T | I | K | L | P | A | D | L | P | H |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |

Figura 64: Secuencia de KinB que podría poseer un motivo sensor de K<sup>+</sup>

Proponemos que KinB albergaría un motivo de filtro de selectividad citosólica sensible a los iones de potasio que le permite el sensado del metal

dentro de su secuencia de aminoácidos. Los seis segmentos continuos subrayados, indican los seis dominios transmembrana de KinB. La Histidina resaltada en verde corresponde al residuo de autofosforilación, los triplete de aminoácidos señalados en azul representan la parte superior y el loop de la parte inferior del dominio de unión a ATP de la quinasa. El cuadro amarillo destaca la secuencia citosólica de KinB con homología al filtro de selectividad de los canales de potasio.

Una clasificación de las regiones HK, ubica a KinB en un grupo dominado IIIB junto con KinA, KinC, KinD y KinE. Este grupo presenta homologías que se corresponden con la quinasa NtrB de *E. coli*, que es un sistema de dos componentes relacionado con el metabolismo del nitrógeno.

A pesar de los diversos motivos de proteínas y dominios presentes en diferentes tipos de canales de potasio (Kuo y col., 2005), la secuencia selectiva de  $K^+$  presente en KinB (que llamaremos simplicidad  $K^*$ ) es el único elemento común relacionado con canales de  $K^+$ , dentro de la secuencia de KinB (Figuras 63 y 64). Esta posible secuencias sensora se solapa con la región de unión al ATP dentro de la región histidin quinasa (HK) (Derst y Karschin, 1998; Doyle 1998; Fabret y col., 1999; Choe, 2002). Además de la ausencia de los motivos que rodean el filtro de selectividad (Figuras 63 y 64), KinB también carece de los diferentes dominios que han sido descritos en diferentes los canales de potasio (Derst y Karschin, 1998; Choe, 2002; Kuo y col., 2005).

Además, la secuencia  $K^*$  reside en la región citosólica de la quinasa mientras que en todos los canales de potasio conocidos (de eucariotas y procariotas) el filtro de  $K^+$  se encuentra en los dominios transmembrana (Figura 63). Si bien estas características topológicas excluyen a KinB como un canal de potasio, abriría la posibilidad de que la quinasa actuara como un sensor de la concentración de potasio intracelular través de su secuencia  $K^*$  citosólica presente dentro del dominio HK de la misma.

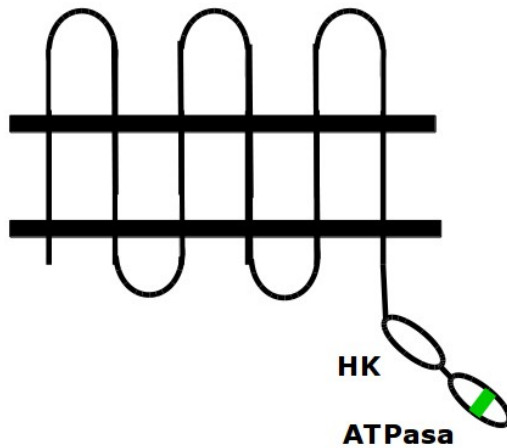


Figura 65: Esquema representativo de la topología de KinB. Se indican los dominios citoplásmicos conocidos (HK y ATPse) de la quinasa. La posición de sensorio de potasio putativo de la quinasa también se resalta en verde y con la letra K\*.

Por lo tanto, quisimos comprobar si la secuencia K\* era responsable del sensorio del potasio que gatilla el sliding. Para este fin, se construyeron dos tipos de cepas mutantes *kinB*, que posean 2 mutaciones específicas en K\* (figura 66). En un caso, tres de los cuatro aminoácidos conservados del consenso K\* se sustituyeron por alaninas (el último de los aminoácidos conservados de la secuencia de consenso, G, no se alteró ya que se superpone con un supuesto motivo predicho como ATPasa de la quinasa, para dar lugar a la mutante KinB<sub>K\*→A</sub>. (figura 66). En la segunda cepa mutante construida de *kinB*, siete de los ocho aminoácidos de K\* fueron eliminados (cepa mutante KinB<sub>ΔK\*</sub>). Una consideración importante para ambas cepas mutantes antes del análisis de sus roles en el sliding, es que deben ser funcionales en el sentido clásico de la función de esta quinasa (es decir, promover la formación de esporas). En este sentido, la actividad promotora del sliding mediada por KinB debe dissociarse de las actividades de esporulación y formación de biofilm, un escenario que podría explicar por qué la capacidad de sliding dependiente de KinB y las capacidades de formar biofilm y esporas dependientes de KinB no son activadas simultáneamente. A continuación en la figura 66 se presenta una representación esquemática de las mutantes construidas a fin de determinar el papel que juega el potasio y la secuencia K\* en el desarrollo del sliding.

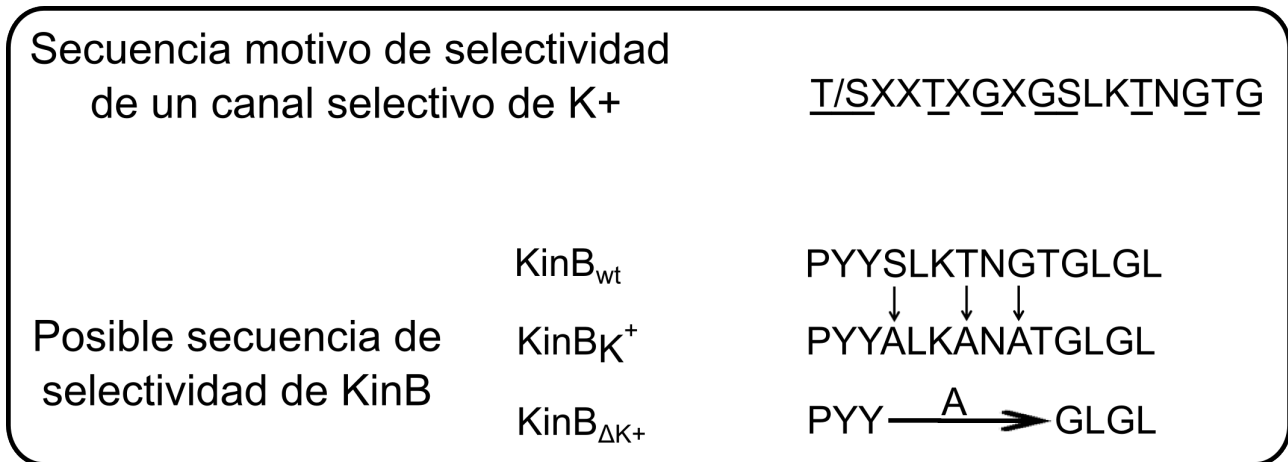


Figura 66: KinB alberga un dominio de detección de potasio con homología al filtro de selectividad de los canales de potasio.

En la figura anterior, se muestra la secuencia de ocho aminoácidos de KinB (SLKTNGTG) con homología al filtro de selectividad presente en los canales de potasio (S/TXXTXGXG). De los ocho aminoácidos del motif, la posición siete de los canales de potasio es generalmente asignada a un aminoácido aromático (principalmente Tirosina, Y, aunque también fenilalanina puede estar presente). En KinB, esta posición está ocupada por una treonina (T), el cual es un aminoácido cuya cadena lateral es hidrofílica. Sin embargo, se ha demostrado que las sustituciones no conservativas del residuo Y en la posición siete del filtro han dejado intacta la selectividad al potasio demostrando que un grupo aromático en la posición siete no es esencial en la determinación de la selectividad hacia el metal, que como ya se detalló anteriormente la selectividad está relacionada con la integridad de la posición 4 (T) en la secuencia consenso. Más recientemente, se encontró que otros aminoácidos (como ser, Leucina, Aspártico, etc.) pueden estar presentes en la posición siete del filtro de selectividad de los canales de potasio sin afectar la funcionalidad de las mismas.

Sorprendentemente, mientras que la complementación de una cepa doble mutante *kinAkinB* (originalmente *spo0* y deficiente en el deslizamiento) con una copia de tipo salvaje de *kinB*, restaura la capacidad de esporular y deslizarse, ambos tipos de alteraciones en KinB (KinB<sub>K\*→A</sub> y KinB<sub>ΔK\*</sub>) fueron capaces de restaurar por completo la capacidad de la cepa para formar esporas, pero no así la capacidad de sliding mediada por KinB en un

background genético *kinAkinB* (Tabla 14). De esta manera se comprobó una de las premisas postuladas con anterioridad en la cual debía ser la esporulación independiente del sliding. Simultáneamente, ambas construcciones en KinB, no fueron capaces de restablecer el la capacidad de deslizamiento de las cepas mutantes *kinB* y *kinBkinC* y además no fueron capaces de responder a la estimulación por el agregado de potasio en condiciones de sliding (Figura 67).

Estos resultados confirman que la secuencia sensible a K<sup>+</sup> presente en KinB (K\*) desempeña un papel esencial en la detección de potasio que conduce a la capacidad de deslizarse, que es independiente del segmento transmembrana 2 de la histidin quinasa responsable del sensado de la actividad de transporte de electrones, responsable de la formación de biofilm y esporas (Trach y Hoch, 1993).

Tabla 14: La esporulación y la capacidad de sliding son funciones separadas de KinB.

| Cepa  | Esporulación (UFC/mL) | Deslizamiento (cm) |
|---|-----------------------|--------------------|
| Wt (A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> )                 | 2,0 x 10 <sup>8</sup> | 8,5 ± 0,3          |
| A <sup>-</sup> B <sup>-</sup>                       | <10                   | <4,0 ± 0,3         |
| A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> /B <sub>wt</sub>      | 5,0 x 10 <sup>7</sup> | 8,5 ± 0,3          |
| A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> /B <sub>K-&gt;A</sub> | 6,0 x 10 <sup>7</sup> | <4,0 ± 0,3         |
| A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> /B <sub>ΔK*</sub>     | 5,0 x 10 <sup>7</sup> | <4,0 ± 0,3         |
| B <sup>-</sup>                                      | 2,0 x 10 <sup>8</sup> | <4,0 ± 0,3         |
| B <sup>-</sup> /B <sub>wt</sub>                     | 2,0 x 10 <sup>8</sup> | 8,5 ± 0,3          |
| B <sup>-</sup> /B <sub>K-&gt;A</sub>                | 2,0 x 10 <sup>8</sup> | <4,0 ± 0,3         |
| B <sup>-</sup> /B <sub>ΔK*</sub>                    | 2,0 x 10 <sup>8</sup> | <4,0 ± 0,3         |
| B <sup>-</sup> C <sup>-</sup>                       | 2,0 x 10 <sup>8</sup> | <1,5 ± 0,3         |
| B <sup>-</sup> C <sup>-</sup> /B <sub>wt</sub>      | 2,0 x 10 <sup>8</sup> | 5,5 ± 0,3          |
| B <sup>-</sup> C <sup>-</sup> /B <sub>K-&gt;A</sub> | 2,0 x 10 <sup>8</sup> | <1,5 ± 0,3         |
| B <sup>-</sup> C <sup>-</sup> /B <sub>ΔK*</sub>     | 2,0 x 10 <sup>8</sup> | <1,5 ± 0,3         |

Las cepas mutantes en KinB que son afectadas en la integridad de la secuencia del filtro selectivo, fueron capaces de restablecer la esporulación de la cepa doble mutante *kinA-kinB* (A<sup>-</sup>B<sup>-</sup>), pero no fue capaz de restaurar la

actividad de deslizamiento dependiente de KinB, así como tampoco en background *kinB* ( $B^-$ ), y *kinBkinC* ( $B^-C^-$ ).

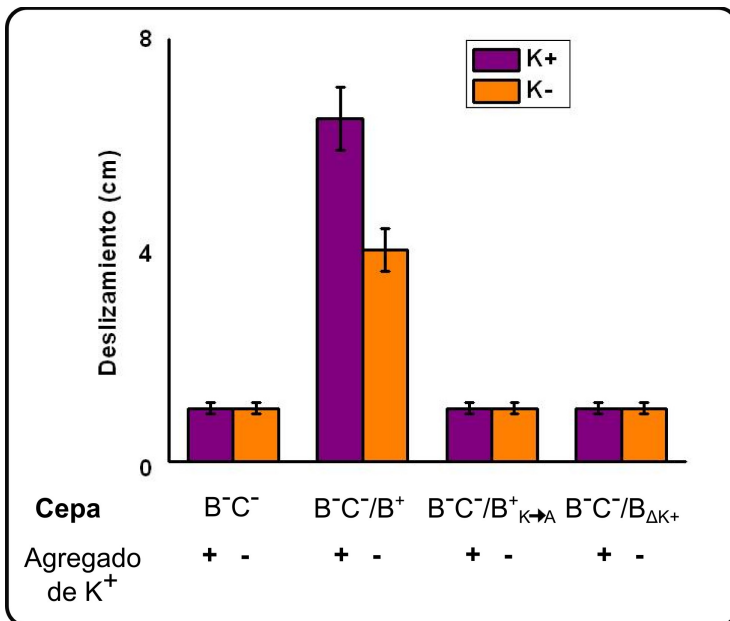


Figura 67: La mutación en la secuencia de selectividad de potasio en KinB abolió la capacidad de *B. subtilis* para deslizarse en respuesta a la adición de potasio. Los resultados presentados son representativos de cuatro experimentos independientes.

### 4.3. El potasio constituye la señal para la interconexión fina entre el deslizamiento social y el desarrollo del biofilm.

El potasio representa el ion más abundante en el citoplasma ya que es uno de los principales iones usados como osmorregulador (~ 200 mM en *E. coli* frente a 7 mM contenido en medio LB) (Kuo y col., 2005). A diferencia de la mayoría de los otros cationes intracelulares, la alta concentración intracelular de potasio no interfiere significativamente con el crecimiento vegetativo. Sin embargo, aparte del efecto estimulante del potasio sobre KinB, se sabe que el potasio es un fuerte inhibidor de la actividad KinC (Lopez y col., 2009-a; Lundberg y col., 2013) pero, enigmáticamente, se requiere la actividad conjunta de ambas histidin quinvasas (KinB y KinC) para el movimiento tipo sliding (Figura 57).

Una posible explicación a esta aparente paradoja es que KinB y KinC deben trabajar en diferentes momentos del desarrollo del sliding acompañado de la caída de la concentración intracelular de potasio que ocurre durante la transición de la fase logarítmica a la fase estacionaria temprana, el cual coincide con la producción de surfactina y la inactivación de SinR.

En este escenario, es decir, en placas de LB agar soft, en el que, al inicio del sliding, en el borde de una colonia en sliding activo (donde las células más jóvenes estarían presentes), la concentración del potasio intracelular sería alto, porque las células disponen de abundantes nutrientes y están en fase logarítmica. Durante esta etapa, KinB, que es la primera quinasa del phosphorelay que se expresa y por lo tanto está presente durante el crecimiento de la célula, (Jiang y col., 2000) debe estar activa, debido a la alta concentración de potasio presente durante la fase logarítmica, para conducir la síntesis de la maquinaria de sliding. KinC mientras tanto, tendría una baja actividad debido a su expresión reducida en los primeros estadios de crecimiento, puesto que tiene un pico máximo de expresión durante la primer hora de la fase estacionaria y además, la poca cantidad de KinC presente estaría inactivada debido a la presencia de altos niveles de potasio intracelular (Lopez y col., 2009-a; Lundberg y col., 2013).

A medida que las células deslizantes se acercan a la fase logarítmica tardía en las placas de LB agar soft (probablemente en el centro del disco de sliding estén las células más viejas), KinC, la surfactina y la proteína exportadora de potasio, YugO, se expresan en la membrana celular (Lopez y col., 2009-a; Lundberg y col., 2013) por lo tanto, la concentración de potasio intracelular disminuye, junto con la actividad de KinB que es reemplazado por un KinC más activo para mantener los niveles adecuados de Spo0A-P requerido para la expresión continua de genes necesarios para un deslizamiento activo (es decir, *bslA*, *sfr*, *eps*, *fab*, tal como se mencionó en el Capítulo 3), y la formación de biofilm, en el centro de la colonia.

En apoyo a esta hipótesis sobre la regulación espacio-temporal de las quinasas, cuando una cepa salvaje de *B. subtilis* (con KinA y KinB funcionales), es inoculada en el centro de una placa con agar soft en la cual sea capaz de deslizarse y además formar biofilms (es decir, LBY agar soft), es posible observar la formación de estructuras típicas de un biofilm en la parte central del disco de deslizamiento, mientras que en el frente de avance de la colonia la estructura sigue siendo plana (Figura 68, imagen de la izquierda). Este resultado sugiere fuertemente que, bajo condiciones permisivas de

deslizamiento, KinC es activa en el interior del disco de deslizamiento y KinB en el frente de avance.

De acuerdo con este resultado, cuando una cepa *kinC* (con KinB funcional) se incubaba en condiciones similares, el tamaño de la colonia en sliding, como se esperaba, era más pequeña que el de la colonia formada por la células de tipo salvaje, y lo más importante, no hay estructuras que se asemejen a un biofilm (Figura 68, foto del medio).

En coincidencia con lo planteado, una cepa *kinB* (con KinC funcional), en el interior de la colonia se forma el típico biofilm de estructura arrugada y en las regiones exteriores, el borde, las células se deslizan muy lentamente o casi nada, también se observa una rápida formación del biofilm (Figura 68, imágenes de la derecha).

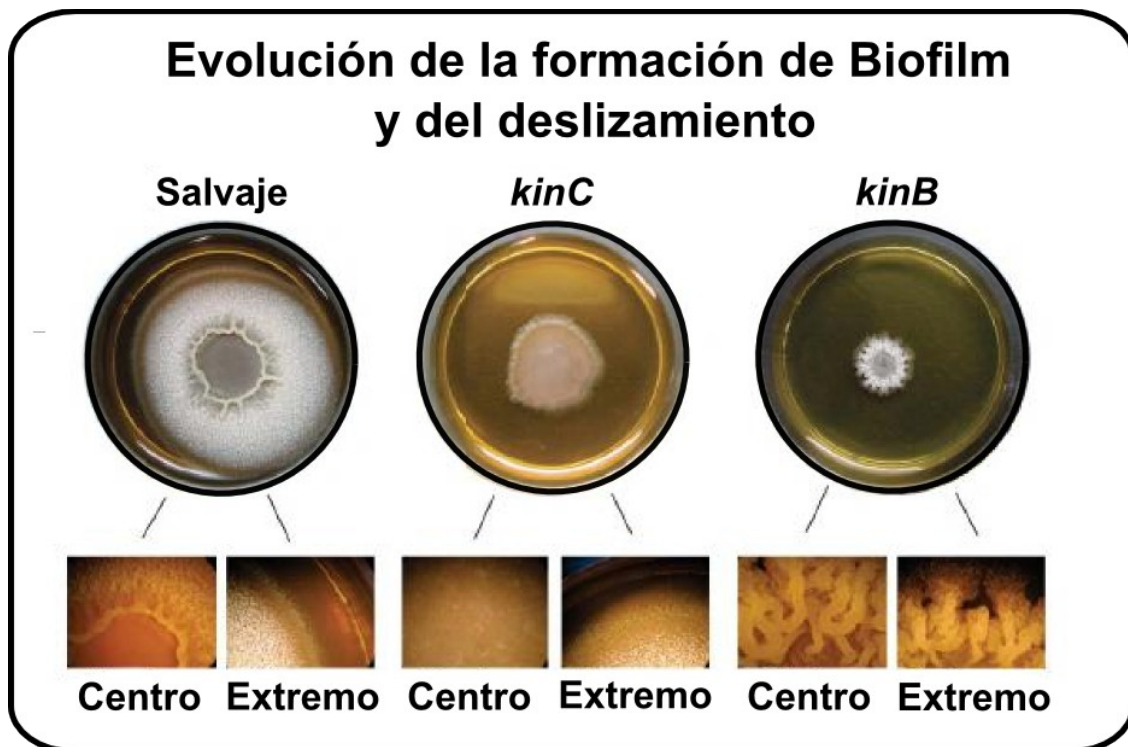


Figura 68: Regulación espacio-temporal de las quinasas que inducen el inicio del sliding.

Colectivamente, los resultados presentes en esta sección sugieren que los iones potasio y KinB-P actúan antes que KinC para activar el inicio del sliding. Una vez que las concentraciones de potasio comienzan a disminuir, en distintas regiones de la colonia, disminuye la actividad de KinB y aumenta la de

KinC, confirmando la regulación espacio-temporal de ambas quinasas (Figura 69).

Además, la formación de biofilms dependiente de KinC-P que se observa en centro de la colonia, donde se encuentran las células "más viejas", luego de la incubación en un medio que permite tanto la formación de biofilms y sliding (LBY agar-soft) (fotos de centro a la izquierda en la Figura 69) sugiere que la activación de KinB mediada por potasio para formar Spo0A-P y empezar la movilidad de tipo sliding es insuficiente para inducir no sólo la formación de esporas KinB-P dependiente, sino también insuficiente para provocar la formación de biofilms dependiente de KinB-P (Figura 69).

Los resultados anteriores sugieren que, tan pronto como las células se inoculan en placas de LBY con 0,7% de agar, la primera actividad que tiene lugar es el sliding, puesto que KinB es la primer quinasa que se activa y actúa mientras KinC permanece inactivo. Esta actividad diferencial de KinB y KinC es debido a la presencia del potasio intracelular que activa e inhibe cada quinasa, respectivamente. A medida que continúa el sliding, hay una caída en la concentración del potasio intracelular en las células en la parte central del disco de deslizamiento. Bajo estas condiciones fisiológicas KinB se vuelve inactivo y KinC, activo en el interior del disco deslizante mientras que KinB permanece activo en la parte más joven (frente de avance) de la comunidad en deslizamiento (figura 69).

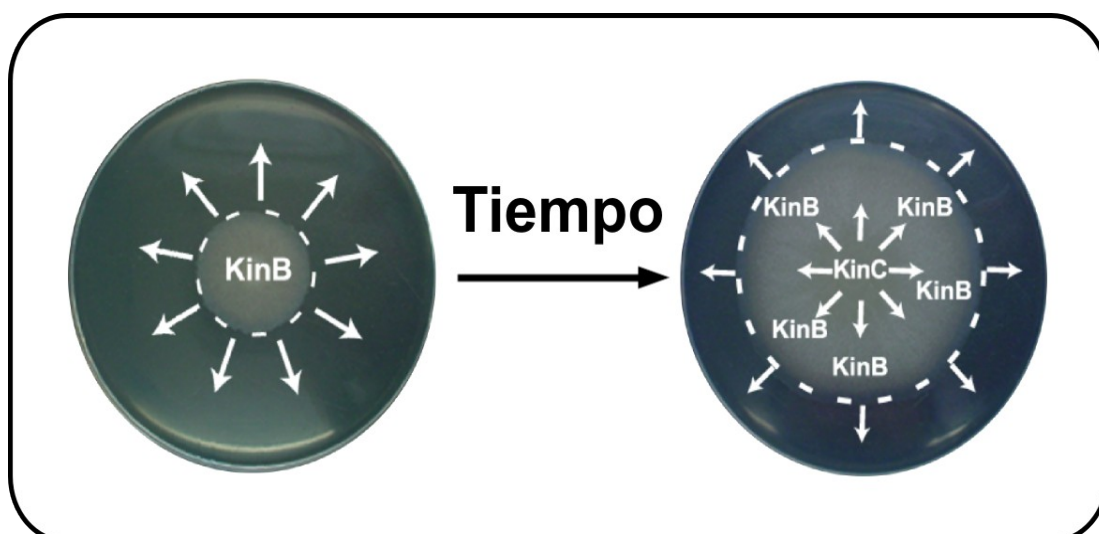


Figura 69: Regulación espacio temporal de las quinasas KinB y KinC.

## Capítulo 5

### **El Modelo.**

Inicialmente se han considerado a las bacterias como una unidad individual. En el pasado, diversos estudios se han centrado en el desarrollo de un organismo unicelular, sometido a diferenciación celular dentro de una suspensión homogénea en cultivo líquido. Sin embargo, en ambientes naturales, los microorganismos comúnmente existen como comunidades multicelulares (biofilms) que presentan un elevado grado de estructuración. Distintos tipos de células se organizan espacialmente dentro de éstas comunidades altamente estructuradas llamadas biofilm. Los biólogos evolutivos han tenido un interés de larga data en la elucidación de los mecanismos que sustentan la cooperación. Siempre tratando de responder una pregunta fundamental. ¿Por qué un individuo restringe su propio desarrollo para beneficiar a toda la población? La evolución de la cooperación ha sido ampliamente estudiado en animales, mientras que las investigaciones en microbios son más recientes. Las células microbianas cooperan mediante la secreción y el intercambio de productos que benefician a la comunidad, pero son costosas de producir. Numerosos ejemplos se han descrito que ejemplifican la cooperación entre microbios y la dinámica entre la producción y los miembros de la población no productores (West y col., 2006; Nadell y col., 2008). Es importante destacar que el establecimiento de la cooperación se traduce simultáneamente en estrategias que aseguren la estabilidad de la colonia. La colonización microbiana de superficies proporciona una de las soluciones para mantener esta estabilidad y la cooperación. Cuando los microorganismos se asientan y habitan superficies bióticas o abióticas hay variaciones espaciales en la composición de nutrientes, lo que produce diferencias ambientales sutiles que permiten una variedad de interacciones ecológicas. La cooperación es crítica en ciertas comunidades microbianas, esta división de tareas se hace más evidente en los biofilms, donde el grado de cooperación depende fuertemente de las condiciones de cultivo. En la naturaleza, la mayoría de los microbios persisten en comunidades sedentarias

adheridas a la superficie y proporcionan una buena ilustración de la complejidad microbiana, células diferenciadas que residen en un biofilm presentan rasgos cooperativos, como la secreción de EPS, y estos rasgos son ventajosos a nivel de la colonia, ya que mejoran su resistencia y capacidad de crecer.

Como vimos hasta el momento, tanto el sliding y el estilo de vida sésil dentro del biofilm son controlados positivamente por la misma vía de regulación, que a su vez, controla el gatillado de la esporulación. Ambos comportamientos sociales son supuestamente antagónicos entre si y están regulados por Spo0A-P. Con todos estos resultados surgen varias preguntas: ¿Cómo es que se regula una vía de activación y no otra siendo que están reguladas por el mismo factor de transcripción? Y además, ¿por qué no se activan la vía de formación de esporas y biofilm a medida que se produce un aumento de la autofosforilación de KinB durante el deslizamiento y si ocurre si la concentración de agar se eleva al 1,5%?

Este no es el primer ejemplo sobre cómo *B. subtilis* coordina la expresión de distintas actividades celulares usando la misma vía de regulación, el phosphorelay. Fujita y Losick. (2005), reportaron que un aumento gradual de los niveles y la actividad de Spo0A resulta en la expresión diferencial conjuntos de genes en *B. subtilis*. Por ejemplo, los altos niveles de Spo0A-P estimulan la esporulación y los bajos niveles de Spo0A-P estimulan la formación de biofilm (Chai y col., 2008). Por lo tanto, y basándonos en lo antes dicho, nuestra hipótesis sostiene que el sliding y el desarrollo del biofilm, requieren de diferentes niveles de Spo0A-P para que se active una vía y no otra. Hasta ahora, ha quedado claramente demostrado que las condiciones permisivas de sliding utilizados en este trabajo (LB agar soft) y que la entrada de potasio que activa KinB (la cual al mismo tiempo inhibe la actividad KinC) (Lopez y col. 2009-a), son adecuadas para permitir el deslizamiento, pero insuficientes para desencadenar la esporulación y la formación de biofilm. Por lo tanto, la movilidad tipo sliding en *B. subtilis* parece ser activado antes de la formación del biofilm y la esporulación. Pero, ¿cómo puede ser que se active el sliding y no otra vía de desarrollo (esporulación y biofilm), cuando se activa KinB? En

otras palabras, que comportamiento necesita niveles más bajos de Spo0A-P para activarse? Para responder este interrogante postulamos dos modelos alternativos. En un primer modelo, (Figura 70, modelo I), las células de la colonia incipiente primero se deslizan y luego se forman las estructuras del biofilm en el centro. En la otra situación (Figura. 70, modelo II), las células de la colonia incipiente adheridas a la superficie, primero producen un biofilm sésil y luego las células que se encuentran en el borde de la colonia comienzan a deslizarse. En ambos modelos, el comportamiento social que se activa primero (deslizamiento o biofilm) es el que requiere la menor cantidad de Spo0A-P (Fujita y Losick, 2005; Chai y col., 2008). Para poder monitorear los niveles *in vivo* de Spo0A-P medimos la expresión de *abrB*, que es el gen reportero más sensible a los niveles Spo0A-P presentes en la célula (Arabolaza y col., 2003; Fujita y Losick 2005). Spo0A-P es un fuerte represor de la expresión de *abrB* y niveles muy bajos de Spo0A-P (insuficientes para desencadenar biofilm y la esporulación) son suficientes para reprimir la expresión de *abrB* (Arabolaza 2003; Fujita y Losick, 2005). En pocas palabras, cuanto mayor sea el nivel de expresión de la fusión *abrB-lacZ*, menor será la cantidad de Spo0A-P presente en la célula al momento de tomar la muestra.

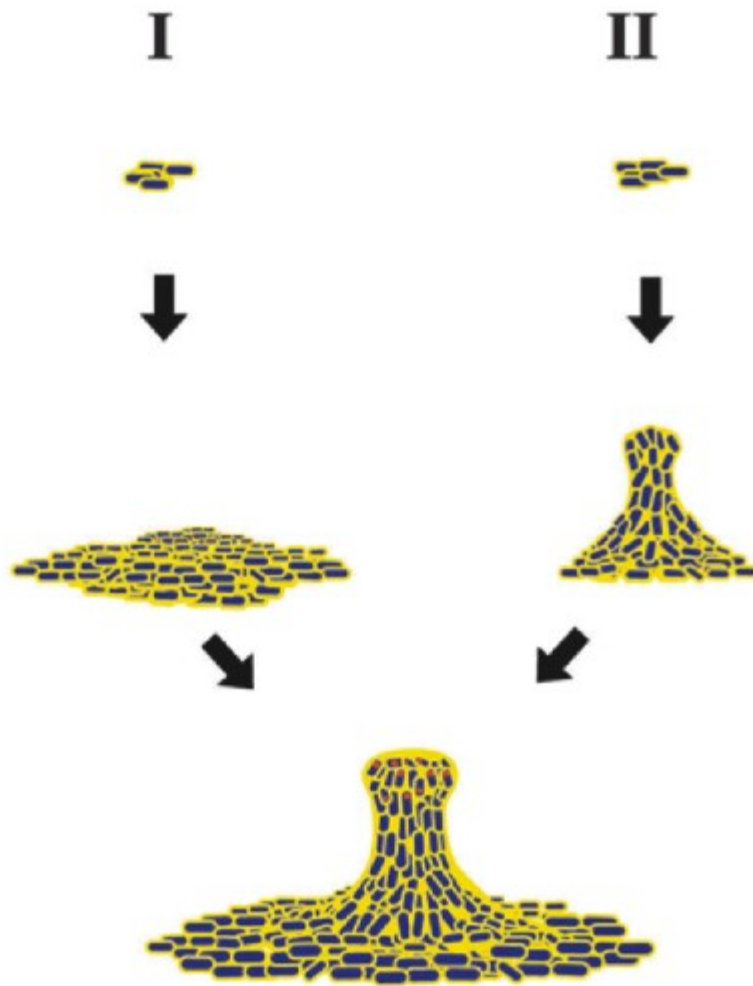


Figura 70: Dos modelos posibles para la regulación temporal y espacial de la multicelularidad (sliding, biofilms y cuerpos fructíferos) en *B. subtilis*.

Por lo tanto, para obtener una visión más clara de los niveles de Spo0A-P presente durante el desarrollo del sliding y el biofilm, se midió la actividad  $\beta$ -galactosidasa generada por la expresión de una fusión transcripcional *abrB-lacZ* bajo diferentes condiciones:

- se hace crecer las células en un medio de cultivo que favorece preferentemente la esporulación: SM 1.5% de agar.
- se hace crecer las células en un medio permisivo del sliding: placas de LB agar al 0,7%.
- se hace crecer las células en un medio que favorece preferentemente la formación de biofilm: placas de LBY 1,5% de agar placas.

d) se hace crecer las células en un medio no permisivo de sliding ni de biofilm ni de esporulación: placas de LB agar al 1,5%.

Luego, se tomaron muestras de las células desarrolladas en las placas a distintos tiempos y se midió la actividad  $\beta$ -galactosidasa producido por la expresión de *abrB* (Figura 71). Como se esperaba, la expresión del gen reportero, *abrB*, fue la más baja cuando las células fueron crecidas en placas de SM con 1,5% de agar y la más alta cuando el las células fueron crecidas en LB 1,5%. Indicando que los valores más altos de Spo0A-P se encontraban en las células crecidas en el medio específico de esporulación, mientras que los valores más bajos de la molécula fosforilada se encontró el las células crecidas en un medio rico que no favorece ningún comportamiento de diferenciación en particular.

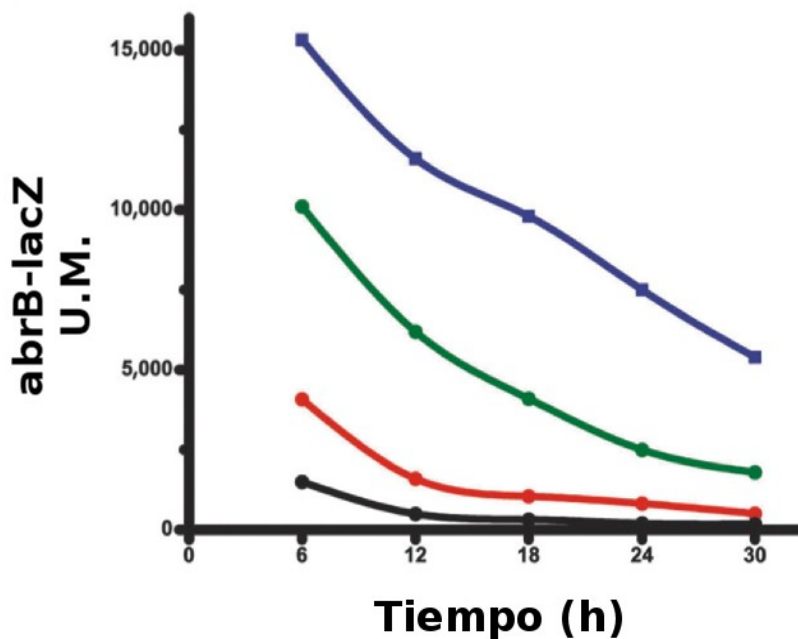


Figura 71: Medidas de la expresión del gen *abrB* y dos modelos para la progresión de la pluricelularidad en *B. subtilis*. Como se describe en el texto la producción de la actividad  $\beta$ -galactosidasa a partir de  $P_{abrB-lacZ}$  fue medida en células de *B. subtilis* crecidas en placas de Petri sembradas en medios que favorecen la expresión de diferentes conductas sociales bajo el control de Spo0A-Pi: movilidad tipo sliding (LB 0,7% agar), la formación de biofilms (LB 1,5% agar), la esporulación (SM 1,5% de agar), o ninguno (LB 1,5% agar).

Las células se tomaron de placas de Petri en los tiempos indicados en la figura. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Símbolos: LB 1,5% de agar ((-•-)), LB 0,7% de agar (- • -), LB 1,5% de agar (- • -), y 1,5% de agar SM (- • -).

Interesantemente, los niveles de expresión *abrB* bajo condiciones de deslizamiento activo, esto es, en placas de LB soft (LB con agar al 0,7%) eran significativamente mayor que los niveles observados *AbrB* bajo condiciones de

formación de biofilm activo, es decir, crecidas en placas de LBY agar al 1,5%. Estos resultados (Figura 71), sugieren que los niveles de Spo0A-P requerido para activar la movilidad tipo sliding son menores que los niveles de Spo0A-P necesarios para que se active la formación de biofilms y por lo tanto, el comportamiento tipo sliding se activaría antes que la formación de biofilms en *B. subtilis*, apoyando el Modelo I de la Figura 70.

Para confirmar este modelo, la cepa  $\Delta spo0A sad67$  (Ireton y col., 1993; Arabolaza y col., 2003; Fujita y Losck, 2005), en la cual el nivel de Spo0A activo que se sintetiza depende de la cantidad de IPTG, fue cultivada en placas de LBY 0,7% de agar suplementada con diferentes concentraciones de IPTG. En este experimento, se pretendió desafiar nuestra hipótesis de la activación secuencial de los comportamientos sociales de formación de biofilm, sliding o formación de cuerpos fructíferos para la esporulación. Como se esperaba, en ausencia de IPTG *sad67* no se expresa y *B. subtilis* es incapaz de desarrollar cualquiera de sus diferentes comportamientos multicelulares puesto que no se produce Spo0A activo. Sin embargo, tan pronto como el medio LBY 0,7% de agar, se suplementa con una baja cantidad de IPTG (0,01  $\mu\text{M}$ ), *B. subtilis* empieza a deslizarse (Figura 72). Cuando se aumenta la concentración de IPTG a 10  $\mu\text{M}$  (y por lo tanto se produce más Spo0A activo en las células), *B. subtilis* desencadena la formación de biofilm en la colonia. Cuando la cantidad de IPTG agregado a la placa es mayor, (1000  $\mu\text{M}$ ), el crecimiento de *B. subtilis* se limita (debido a los altos niveles de Spo0A activo que inhiben la división vegetativa) (Ireton y col., 1993; Arabolaza y col., 2003; Fujita y Losick, 2005) ya que se activa directamente la formación de cuerpos fructíferos repletos de esporas.

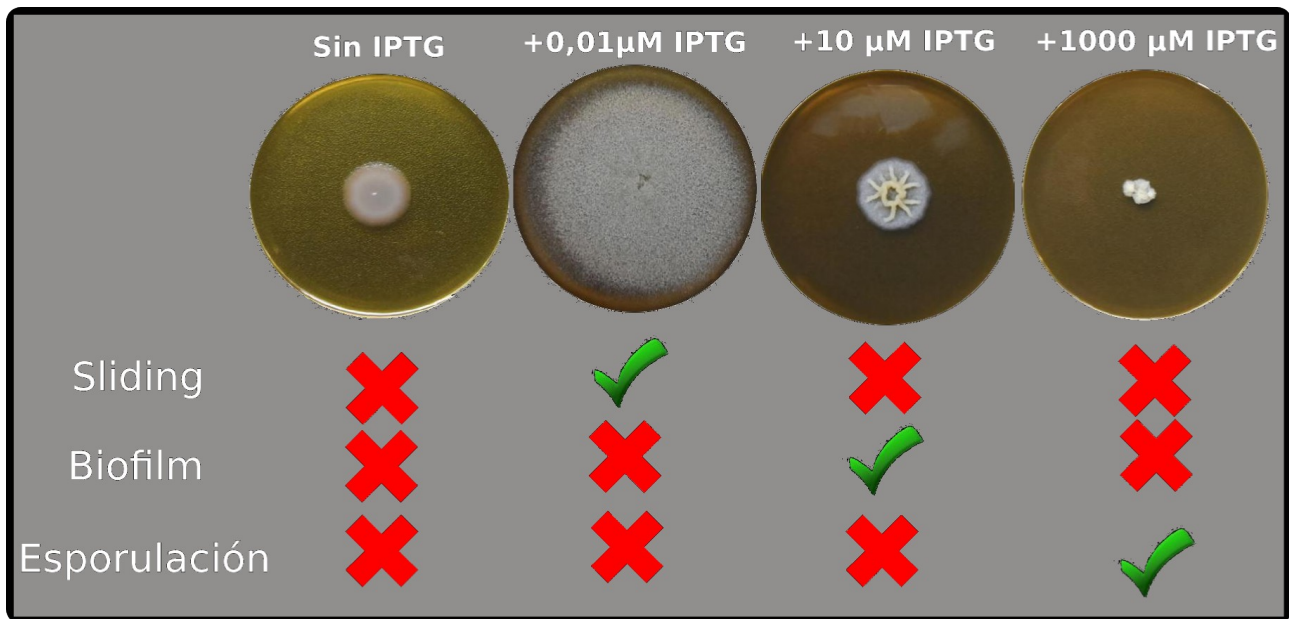


Figura 72: Estimulación del comportamiento social de *B. subtilis* en respuesta a la concentración de IPTG en placa de Petri. Los resultados son representativos de siete experimentos independientes realizados por triplicado.

Colectivamente, estos resultados sugieren fuertemente que el aumento en los niveles de Spo0A activo, Spo0A-P (Fujita y Losick, 2005; Chai y col., 2008), permite la expresión de los diferentes comportamientos de *B. subtilis*, además de presentar una secuencia temporal en la cual en un primer momento tiene lugar el desplazamiento social, sliding, luego la formación multicelular del biofilm y, finalmente, formación de cuerpos fructíferos, esporulación. La figura que se presenta a continuación esquematiza la activación de las distintas quinasas, según el modelo que, tras un minucioso análisis proponemos para el comportamiento social de *B. subtilis* (Figura 73).

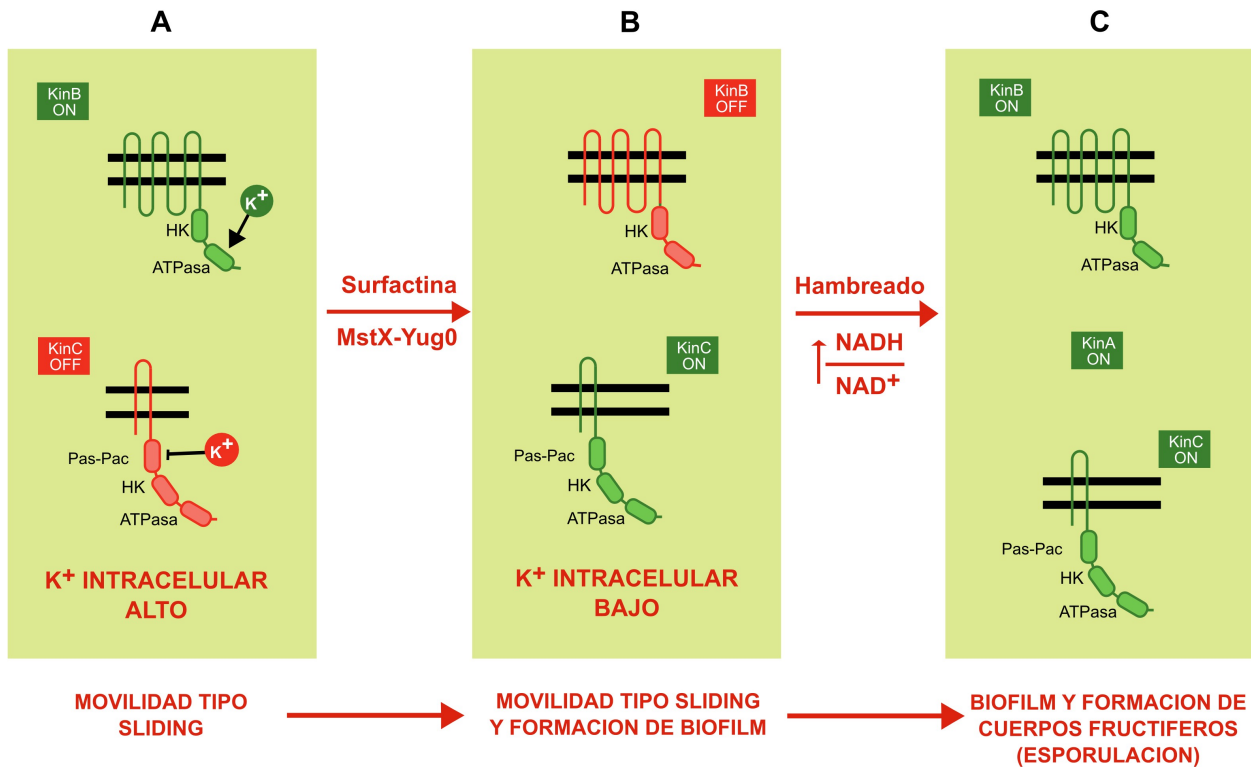


Figura 73: Un modelo de trabajo para la regulación espacio-temporal de las diferentes conductas sociales en *B. subtilis*.

Como se muestra en la figura 73 (A) cuando *B. subtilis* se encuentra sobre una superficie (por ejemplo, LB soft), su comportamiento social queda bajo el control del regulador maestro, Spo0A. Inicialmente, KinB se autofosforila debido a la presencia de una alta concentración intracelular de iones de potasio. Al mismo tiempo, el alto nivel de potasio inhibe la activación de KinC (autofosforilación). En estadios tempranos del desarrollo, los niveles de KinB-P formado (tras su activación mediada por el dominio  $K^*$ ) son suficientes para producir bajos niveles de Spo0A activo (Spo0A-P) para desencadenar la expresión de la maquinaria de sliding. En etapas del desarrollo más avanzadas (Figura 73 B), hay una caída en la concentración intracelular de iones de potasio en las células situadas en la parte interior de la colonia que se encuentra en crecimiento a través del sliding, esto conduce a la inactivación de KinB y la activación de KinC (su dominio PAS-PAC queda deshibido). KinC-P alimenta el phosphorelay para producir niveles más altos de Spo0A-Pi que los producidos por KinB antes y que mantienen activo el deslizamiento en placas

de LB agar soft. En condiciones especiales de cultivo (es decir, en placas de LBY agar soft), KinC-P también es capaz de desencadenar la formación de biofilm en la parte central de la colonia. En la frontera de las dos colonias en deslizamiento, tanto en placas de agar LB y LBY, KinB permanece activo mientras que KinC permanece inactivo, debido a la alta concentración intracelular de iones de potasio en las células. En etapas tardías del desarrollo (Figura 73 C), KinC permanece activo mientras que KinB y KinA se activan por la deficiencia de nutrientes. Las tres quinasas activadas (KinA-P, KinB-P y KinC-P) producen niveles altos de Spo0A-P para permitir la formación de cuerpos de fructificación (lleno de esporas) en las puntas de los biofilms. Por lo tanto, la movilidad tipo sliding es activada por KinB-P antes de la formación de biofilms, pero que ambos fenómenos compartan esencialmente componentes estructurales similares abre la posibilidad de que los niveles de expresión de estos componentes podrían ser diferentes durante el sliding y la formación del biofilm con el fin de permitir que uno u otro comportamiento puedan tener lugar dependiendo de los requerimientos de la población (Fall y col., 2006; Rudrappa y Bais, 2007; Kovács y col., 2009; Beauregard y col., 2013).

Hasta el momento de esta Tesis, el sliding, había sido considerado como un movimiento comunitario pasivo. Basándonos en los resultados obtenidos, pudimos demostrar que se trata de un comportamiento social altamente regulado en las bacterias que lo llevan a cabo, pero dentro de un contexto comunitario, la colonia bacteriana. Este es otro ejemplo de comportamiento multicelular, en el cual, gracias a las presiones selectivas que pueden haber llevado a su evolución, los posibles orígenes y etapas intermedias por los que tuvo que atravesar con el fin de asegurar la supervivencia del grupo o comunidad son un misterio. Aquí, un mismo regulador transcripcional (Spo0A-P) es capaz de regular de manera eficiente diversos mecanismos dependiendo de las necesidades de las células dentro de la comunidad bacteriana (Lyons y Kolter, 2015). La evolución de la vida en este planeta ha pasado por muchos saltos en la complejidad organizativa. Para entender cómo hemos llegado a la muy compleja biosfera existente hoy en día, es necesario conocer tanto la forma, es decir los mecanismos moleculares que representan las causas

próximas y por qué, lo que representa las ventajas selectivas, causas últimas, se producen estos saltos. De todas las transiciones entre niveles de organización, el advenimiento de la pluricelularidad es quizás la más interesante por varias razones. Pluricelularidad redefine por completo el concepto de lo que es un organismo individual, es lo que representa una transición desde el mundo microscópico hacia el mundo macroscópico. La pluricelularidad, también permitió una vasta expansión fenotípica y la diversificación genotípica, principalmente a través de la diferenciación celular y el desarrollo temporal de las estructuras morfológicas dentro de un organismo. Y, por último, pluricelularidad es probablemente un paso necesario a lo largo del camino evolutivo de la inteligencia y la conciencia. Definir la "vida", definiendo pluricelularidad es un esfuerzo vago, sin embargo, hay dos factores básicos necesarios para ser considerado un organismo multicelular: adhesión célula-célula para formar una nueva unidad evolutiva, y la comunicación intercelular que conduce a la actividad coordinada. Estos son los requisitos mínimos para redefinir un grupo de células en lugar de cualquier célula única como un "individuo". La adhesión es un término utilizado aquí únicamente para indicar conglomerado de cualquier tipo como por ejemplo la agregación dentro de una matriz extracelular, la formación de filamentos por división celular incompleta, o el contacto directo mediado por proteínas transmembrana. La coordinación dentro de un organismo multicelular en teoría podría lograrse sin la comunicación intercelular, por ejemplo, con un plan de desarrollo estricto codificado en el genoma. Pero ese plan rígido sería vulnerable a las desviaciones leves o variables aleatorias del entorno, y nunca se ha observado. Por el contrario, la coordinación puede lograrse sin la formación de grupos adhesión, pero comunicándose entre sí por medio de sistemas de *quórum sensing* que se encuentran distribuidos en todo el mundo microbiano. Sin embargo, este caso es más análogo a una comunidad de individuos que interactúan, como por ejemplo las colonias de insectos. Watnick y Kolter (2000), definieron el biofilm como "Ciudad de los microbios", haciendo un paralelismo entre las ciudades donde habitamos y convivimos con distintos individuos en nuestra vida cotidiana. La división del trabajo, ya sea dentro de

un organismo o una sociedad, conduce a una producción más eficiente y a la utilización de los recursos (van Gestel y col., 2015). Comprender el mecanismo por el cual llegan a ocurrir los comportamientos sociales que se dictan en conjunto dentro de una colonia nos aproxima sutilmente a la comprensión de la evolución de las comunidades, desde las bacterianas hasta las formas más complejas de convivencia social.



*Figura 74: Migraciones o movilidades (traslocaciones) y asentamientos o ciudades (biofilm) como atributos de la vida bacteriana en comunidad.*

## Conclusiones

### Capítulo 1:

A partir de muestras de tierra que provenían de campos sembrados de la región pampeana, materia fecal de rumiantes y de heno en excelente estado de conservación se aislaron 500 cepas presuntivas del género *Bacillus*. Mediante ensayos preliminares de deshidratación y control de la actividad anti-fúngicas, se seleccionaron 4 cepas. Estas, controlan las cepas fúngicas de interés, *in vitro* manteniendo la mayoría un control sostenido en el tiempo además se probó a escala de laboratorio y a pequeña escala sus cualidades para deshidratar el tejido vegetal. Muestras de ADN de estas cepas se secuenciaron para conocer su género y especie, los resultados arrojaron que las 4 cepas salvajes pertenecían al género *Bacillus* siendo 3 de ellos cercanas a la especie *amyloliquefaciens* (PR2, PR39, PR40) y una *subtilis* (PR33).

Al estudiar estas cepas en el laboratorio se pudo determinar que todas esporulaban en un 100% al cabo de las 48h, sin embargo, la cepa PR39 presentaba un orden menos comparada con las demás, incluso comparada con el control (HS).

Por un análisis el comportamiento multicelular, como ser la formación de biofilm y deslizamiento, se pudo determinar que todas formaban biofilms más robustos que el control. Sin embargo, al ensayar el desplazamiento en medio semisólido se pudo determinar que las cepas PR2 y PR39 se desplazan más lentamente que las demás antes de las 3h, de todas maneras luego de las 6h todas las cepas alcanzan igual distancia.

Un parámetro crucial a determinar para el éxito de un producto comercial es la capacidad de germinación que posean las cepas salvajes, ya que el producto se comercializará en forma de esporas y es de fundamental importancia que estas germinen y proliferen. Para determinar estos parámetros se ensayó la velocidad de germinación. En primera instancia se determinó la velocidad de germinación de esporas puras al ser expuestas al germinante estándar AFGK. Mediante este ensayo se pudo concluir que la cepa

## Conclusiones

PR2 lo hacía a menor velocidad que el control, mientras que las demás lo hacían de manera comparable o superior al control.

Siguiendo con la misma línea de razonamiento, consideramos de importancia estudiar la capacidad de germinar y proliferar que tengan las cepas aisladas al estar en contacto con el tejido vegetal (hojas). Para esto se realizaron recuentos de células viables y esporas. De esta manera, se pudo determinar que las cepas NCIB3610 y PR33 aumentaban un orden luego de las 3 h de incubación, mientras que la cepa PR40 aumentaba 2 ordenes. Luego de 24 h todas las cepas tenían 1 orden más que el determinado en el punto anterior. Luego de 48 h se estabilizan en un determinado orden o título.

Finalmente podemos concluir que las cepas PR33 (*B. subtilis*) y PR40 (*B. amyloliquefaciens*) presentan un mejor comportamiento *in vitro* y a escala de laboratorio. Actualmente, se han diseñados ensayos realizar para evaluar a campo la eficiencia de estas cepas con el objeto de poner en el mercado un producto comercial.

## Capítulo 2:

Las células de RG4364 están desprovistas de flagelos, razón por la cual se desplazan más lentamente que la cepa control NCIB 3610. Esta cepa de BSN se mueve en un medio semisólido mediante sliding y es inmóvil en medio líquido.

En búsqueda de posibles reguladores de este tipo de deslizamiento se mutaron genes reguladores de distintos estadios en *B. subtilis* como ser *spo0A*, *sinR* y *abrB* y se observó que Spo0A regula el sliding, SinR no está involucrado mientras que AbrB actúa como represor parcial del deslizamiento. Puesto que Spo0A es el regulador maestro de la esporulación también se deletó la expresión del primer factor sigma de la esporulación con el fin de determinar si el regulón de la esporulación estaba involucrado y se pudo determinar que no.

Se pudo concluir que el sliding no es un movimiento pasivo, sino que está altamente regulado y que bien podía ser relevante durante la interacción bacteria-hospedador.

### Capítulo 3:

Mediante estudios de transcriptómica llevados a cabo en condiciones permisivas y no permisivas de sliding de cepas salvajes y de mutantes en *spo0A* se pudo determinar cuáles genes estaban activos durante el sliding:

- se sobreexpresan genes relacionados con componentes de la matriz extracelular del biofilm como ser los operones *tapA-sipW-tasA* y *srf*.

- no se expresan genes relacionados con la esporulación.

- se expresan genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos y se reprimen genes relacionados con su degradación.

- se sobreexpresan genes relacionados con la formación del biofilm *bslA* y *tasA*

$\Delta tasA$  no alteró el fenotipo de sliding, mientras que  $\Delta epsG$  y  $\Delta bslA$  sí. La intercomplementación de estas cepas restituye el fenotipo de sliding.

*abrB* se encuentra reprimido en condiciones de sliding.

Se incrementó la expresión de genes relacionados con la producción de metabolitos antimicrobianos.

Se sobreexpresan *sivA*, que es un inhibidor de KinA para evitar que se gatille la esporulación.

Aumentó la expresión de genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos al mismo tiempo se reprimió la expresión de los genes relacionados con la degradación. Un análisis del perfil de ácidos grasos en condiciones permisivas del sliding mostró que disminuye la proporción de ácidos grasos lineales del 25% al 4% mientras que la proporción de AG-ante-iso de bajo punto de fusión pasa de 24% al 54%. El contenido de AG-iso se mantiene cercano al 50% independientemente de las condiciones. Esto estaría implicado en la formación de una membrana más fluida para el movimiento tipo sliding que se requiere un fuerte y activo contacto célula-célula.

### Capítulo 4:

Las quinasas involucradas en el gatillado del sliding son KinB y KinC. La doble mutante en las quinasas muestra un fenotipo de deslizamiento totalmente nulo. La transcomplementación con genes *kinB* y *kinC* intactos en

*amyE* de estas quinasas mutadas reconstituyen el fenotipo de deslizamiento wt.

La señal que sensa la quinasa es el potasio, que inhibe la fosforilación de KinC al interactuar con su dominio PAS-PAC en estadios tempranos, pero al entrar en fase estacionaria tardía comienza la producción de surfactina que actúa como quelante intracelular de potasio des-inhibiendo a KinC para el sliding y la formación del biofilm.

El potasio no estimula la esporulación, es decir que los niveles de Spo0A-P serían sólo suficientes para estimular el inicio del sliding pero no la formación de esporas.

Luego de un análisis de la secuencia de aminoácidos de KinB y de proteínas de unión a potasio, se pudo determinar que KinB posee un dominio que mantiene una alta homología con canales transportadores del metal, éste se solapa con una región de unión a ATP dentro del dominio de la quinasa HK. Esta región, a diferencia con los canales de potasio, es un dominio citoplasmático, que estaría sensando la concentración intracelular del metal. Para probar esta hipótesis se crearon distintas mutantes de *kinB* en esta región y se pudo determinar que perdían la capacidad de deslizarse en medio semisólido pero no la capacidad de esporular. Se pudo formular, en base a resultados experimentales, un modelo mecánico sobre la regulación espacio temporal de las quinasas durante el sliding.

### Capítulo 5:

La concentración de Spo0A-P determina que vía de las reguladas por este regulador maestro se va a activar primero en condiciones permisivas del desarrollo multicelular de *B. subtilis*:

-en primer lugar se desarrolla el sliding, que es la vía que requiere menor concentración del regulador activo.

-en segundo lugar cuando las células son más "viejas", se forma el biofilm para asegurar la supervivencia de las células atrapadas dentro de la colonia, con una concentración intermedia del regulador fosforilado.

## Conclusiones

-finalmente, se gatilla la esporulación, que requiere una mayor cantidad de Spo0A-P, que es la última alternativa de supervivencia.

Con estos resultados propusimos un modelo no solo para explicar el desarrollo del sliding sino también todo el comportamiento social de *B. subtilis*. En este modelo se propone una separación espacio-temporal de las tareas dentro de la colonia o comunidad.

-Inicialmente, KinB se autofosforila debido a la presencia de una alta concentración intracelular de iones de potasio. Al mismo tiempo, el alto nivel de potasio inhibe la activación KinC. En estadios tempranos del desarrollo, los niveles de KinB-P formado son suficientes para producir bajos niveles de Spo0A activo para desencadenar la expresión de la maquinaria de sliding. En etapas del desarrollo más avanzados hay una caída en la concentración intracelular de iones de potasio en las células situadas en la parte interior de la colonia, que se encuentra en expansión a través del sliding que conduce a la inactivación de KinB y la activación de KinC. KinC-P alimenta el phosphorelay para producir niveles más altos de Spo0A-P que mantiene activo el deslizamiento en placas de agar soft. En condiciones especiales de cultivo (es decir, en placas de LBY agar soft), KinC-P también es capaz de desencadenar la formación de biofilm en la parte central de la colonia. En la frontera de las dos colonias en deslizamiento, tanto en placas de agar LB y LBY, KinB permanece activo mientras que KinC permanece inactivo, debido a la alta concentración intracelular de iones de potasio en estas células de los bordes. En etapas tardías del desarrollo, KinC permanece activo mientras que KinB y KinA se activan por la deficiencia de nutrientes. Las tres quinasas activadas (KinA-P, KinB-P y KinC-P) producen niveles más altos de Spo0A-P para permitir la formación de cuerpos de fructíferos (lleno de esporas) en las puntas de los biofilms.

## Resumen

**Primera Parte:**

La henificación, en sus distintas variantes, es la principal forma de conservar alfalfa pura o consociada. Existen dos formas principales de conservación del forraje: la henificación y el silaje. El primero actúa, principalmente, por deshidratación y el segundo por acidificación. La principal variable que se debe controlar en el proceso de henificar forraje, es la humedad. La reducción drástica de la humedad resulta clave una vez que el forraje ha sido cortado y conduce a la conservación de una mayor proporción del valor nutritivo original al conservar más hojas que tallos en el heno, reduciendo así la proliferación de diversos microorganismos contaminantes principalmente hongos indeseados.

Para llevar a cabo esta primer etapa del trabajo, de índole aplicada, se realizó un aislamiento de cepas de *Bacillus* con alta capacidad esporulante, provenientes de distintas fuentes naturales como ser muestras henos de diferentes calidades y tierras de regiones cultivadas de la zona pampeana de nuestro país. De aquí se obtuvieron aproximadamente una 500 cepas del género *Bacillus*, las cuales fueron estudiadas en sus capacidades para controlar el crecimiento de distintas cepas fúngicas contaminantes típicos de henos y que producen grandes pérdidas de calidad de los forrajes, lo que se traduce en pérdidas económicas para el productor animal. Esto se ve reflejado luego en una disminución de la calidad de la carne y una menor producción de leche. Las cepas fúngicas que más interesaron controlar fueron *Fusarium verticilloides*, *Aspergillus flavus*, *Mucor sp* y *Penicillium sp*.

Otro parámetro que se estudió para realizar una selección tentativa de las cepas que constituirán un futuro producto comercial fue su capacidad de deshidratar alfalfa. Para ello desarrollamos ensayos novedosos de deshidratación de alfalfa, que en conjunto con los ensayos de actividad antifúngica, permitieron seleccionar cuatro cepas salvajes de *Bacillus*.

Estas cepas, se estudiaron en cuanto a su capacidad de desplazarse en medios semi-sólidos, el cual es un parámetro asociado a la capacidad de

colonizar diversos nichos, que en nuestro caso sería la superficie de las hojas de alfalfa, su capacidad de esporular, el cual es un factor clave al momento de la producción industrial y por último su capacidad de formar biofilms, la cual está asociada a la producción de sustancias bio-activas. Además, se estudió la capacidad de las esporas de las cepas de *Bacillus* seleccionadas para llevar a cabo un ciclo de vida completo sobre el tejido vegetal: germinación-crecimiento vegetativo-esporulación-germinación. Finalmente, las cepas seleccionadas fueron escaladas a nivel piloto en fermentadores, secuenciadas para conocer su identidad de especie exacta. Estos estudios, en conjunto, permitirán el patentamiento, con propiedad intelectual de la UNR y el CONICET, y la formulación y registro del producto comercial por parte de BIOTAY S.A. en el SENASA.

### **Segunda Parte:**

Diversas cepas de *Bacillus* han sido usadas como organismo modelo para el estudio en el laboratorio de numerosos aspectos biológicos y fisiológicos como ser división celular, competencia genética, formación de la spora y producción antimicrobianos.

Estos estudios han considerado al bacilo como entidad individual, siendo tratados como organismos aislados y separados de su entorno. Sin embargo, en los últimos años ha resultado de fundamental interés el estudio de las bacterias como organismos de comportamiento multicelular ya que, paradójicamente, el mundo de las bacterias contiene numerosos ejemplos de este tipo de comportamiento comunitario, tales como la formación de biofilms, la formación de cuerpos fructíferos y el desplazamiento cooperativo sobre superficies. En ambientes naturales, el cooperativismo entre las células le brindaría a la población bacteriana una ventaja adaptativa muy importante.

En este trabajo de Tesis, en una segunda instancia, nos hemos abocado al estudio y caracterización de uno de los comportamientos sociales de movimiento sobre superficies menos estudiados y por ende muy poco comprendido que son capaces de llevar a cabo ciertas bacterias en ambientes tanto naturales como en el laboratorio. Este tipo de movimiento es el sliding o

deslizamiento, un tipo de deslizamiento independiente del flagelo. Para llevar a cabo estos estudios escogimos a *Bacillus subtilis*, bacilo Gram-positivo formador de esporas, como modelo de estudio. Empleamos dos cepas de *Bacillus*, una fue la cepa salvaje NCIB3610 relacionada con la cepa Marburg, la cual está reportada como capaz de desplazarse por medio de sliding y de swarming. El sliding es definido como una translocación "pasiva" sobre la superficie que sería impulsada por el crecimiento cooperativo de las células y facilitada por la producción de surfactante. Mientras tanto, el swarming se define como un movimiento multicelular activo y coordinado de las bacterias a través de las superficies accionado por los flagelos. La otra cepa escogida fue la cepa salvaje de origen japonés *Bacillus subtilis natto* (RG4365), la cual es utilizada para la preparación de una comida funcional probiótica típica nipona. Esta última cepa es totalmente inmóvil en medio líquido pero, por lo demostrado en este trabajo de Tesis, es capaz de desplazarse en medio semisólido.

En una primera instancia se determinó la razón por la cual una de tales cepas era móvil en medio líquido y la otra cepa no. Se sospechaba que la cepa RG4365, no poseía flagelo. Por lo tanto se procedió, como una primera instancia evaluativa, a realizar un ensayo de tinción de flagelos a partir de células incubadas tanto en medio semi-sólidos como en medio de cultivo líquido. Este ensayo reveló que la cepa RG4365 no los poseía, mientras que la cepa NCIB3610 sí, por lo tanto se pudo determinar, en principio, que el movimiento que presenta la cepa nipona en medio semi-sólido sería del tipo sliding. Al medir la velocidad del desplazamiento sobre superficies de ambas cepas se encontró que la cepa RG4365 se movía aunque más lentamente que la cepa NCIB3610. A continuación y para confirmar nuestra presunción, se inactivó el gen *hag*, el cual codifica la subunidad de la flagelina en *B. subtilis*. Se pudo observar que ambas cepas se movían en el medio semi sólido, pero no en medio líquido, mediante sliding y a la misma velocidad.

Un análisis posterior de los posibles reguladores del sliding demostró que el regulador maestro de la transcripción Spo0A era el responsable del sliding en ambas cepas salvajes. Spo0A, es el responsable de muchos de los

comportamientos sociales o de adaptación de *B. subtilis* como ser el gatillado de la esporulación, la síntesis de ácidos grasos durante la diferenciación celular, la formación de biofilm pero no así del swarming. Se determinó mediante distintas construcciones génicas que los genes relacionados con el inicio de la esporulación no estaban implicados en el deslizamiento mientras que, AbrB, un represor de la formación de biofilm y de la expresión de genes relacionados con la adaptación a la fase estacionaria, estaba implicado parcialmente junto con Spo0A en la regulación del sliding, ambos como represores y activadores, respectivamente.

Para profundizar nuestro estudio se realizó un análisis de transcriptómica donde se evaluaron los genes que se expresaron en distintas condiciones de incubación de tanto cepas salvajes como de mutantes en *spo0A*, en condiciones permisivas y no permisivas para el desplazamiento (sliding). Este estudio reveló que en condiciones permisivas de sliding se activaban genes relacionados con la formación de biofilm como por ejemplo *tasA*, *epsG*, *bslA*. También se determinó que el lipopéptido surfactina era un componente indispensable para el sliding. Además, se sobre-expresaban genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos (AG) como ser *fabF*, *fabHBA*, *fabG*, no así genes relacionados con la degradación de AG, sugiriendo que se requeriría para el sliding de la síntesis de AG *de novo*.

Mediante un análisis del perfil de AG que se realizó en distintas condiciones permisivas y no permisivas de sliding se pudo determinar que la composición de la membrana lipídica del bacilo varía pese a que la temperatura permanecía constante. Se registró una disminución de la síntesis de AG lineales y aumentó el contenido de AG ante-iso de bajo punto de fusión, que le estaría brindando a la membrana una mayor fluidez para que la célula, en ausencia de la fuerza propulsora del flagelo, pudiese desplazarse de manera comunitaria a través de superficies a 37 °C, temperatura en la cual la síntesis de AG insaturados se encuentra inhibida.

Puesto que en este punto ya hemos podido determinar cuál es el regulador de respuesta responsable del deslizamiento y los genes necesarios para llevarlo a cabo, nos propusimos estudiar, si hubiese, la señal que gatillaba

el movimiento. Como se mencionó en párrafos anteriores, Spo0A es el regulador de respuesta responsable del sliding, el cual es activo en su forma fosforilada (Spo0A-Pi). Este fosfato es adquirido por Spo0A a partir de una posta de fosfatos conocida como phosphorelay. El phosphorelay es un sistema de transducción de señales similar a un sistema de dos componentes pero expandido, el cual está compuesto por cinco quinasas sensoras (KinA-E). Se sabe que cualquiera de las cuatro quinasas KinA, KinB, KinC o KinD (hasta el momento no hay ningún fenotipo reportado para KinE) detectan diferentes señales ambientales, se autofosforilan a partir de ATP y luego transfieren ese grupo fosfato, en primer instancia a Spo0F, que a su vez pasa su grupo fosforilo a Spo0B, el cual transfiere el fosfato a Spo0A, volviéndola activa.

Para llevar a cabo el estudio sobre cuál/es quinasa/s serían las responsables del deslizamiento, en primer lugar se evaluó la capacidad de deslizarse de las cepas mutantes en la síntesis de cada una de las quinasas y se encontró que dos de ellas estaban implicadas en el sliding, KinB y en menor grado KinC.

Está reportado que las quinasas del phosphorelay se encuentran divididas en sus funciones en grupos de redundancia donde KinA y KinB son las principales quinasas asociadas a la esporulación, mientras que KinC y KinD son las principales responsables de la formación de biofilm. Ahora, en base a nuestros estudios se adiciona otra dupla o dúo regulador, KinB/KinC, sobre el comportamiento social del sliding. Recientemente se reportó que KinB a través de su segundo segmento transmembrana está asociado con los citocromos *caa3* y *bc*, cumpliendo de esta manera, un rol en el sensado del estrés nutricional dentro de un biofilm maduro. Sin embargo, descartamos la hipótesis de que la función que cumple KinB en el sensado del estrés nutricional esté relacionada con el sliding puesto que a medida que la colonia se expande sobre el medio de cultivo fresco los requisitos nutricionales estarían satisfechos y no se lo podría equiparar con el estilo de vida de las células "compactadas y mayormente inmóviles" dentro de un biofilm en cuya parte más íntima escasearían los nutrientes y el oxígeno activando estas señales a KinB. Por otro lado, se conoce que el potasio (K<sup>+</sup>) cumple un rol

inhibitorio sobre la actividad estimuladora de la formación del biofilm de KinC al interactuar con su dominio PAS-PAC. La surfactina producida durante la formación del biofilm actuaría como molécula quelante del potasio intracelular liberando, de esta manera la inhibición producida por el  $K^+$ . Además, se sabe que la concentración intracelular del ion mencionado disminuye a medida que la célula alcanza la fase estacionaria. Otros estudios, analizaron las características de la formación de la colonia en un biofilm sólido de *B. subtilis* en medios definidos con y sin  $K^+$  y se encontró que en medios depletados del metal, las colonias (biofilms) se desarrollaron en forma de dendritas. En nuestros estudios, cuando se analizaron las características de las cepas mutantes en las quinasas se pudo apreciar, en principio como una curiosidad, que todas las mutantes en *kinB* formaban colonias estrelladas y con mayor predisposición a formar biofilm que la cepa salvaje. A posteriori demostramos la existencia de una estimulación del sliding dependiente de la concentración de  $K^+$  que no se presentaba en cepas deficientes en *kinB*. Estos resultados, nos indicaron la estimulación positiva que el potasio tiene sobre esta quinasa KinB.

Con los resultados hasta aquí obtenidos, nos avocamos al estudio de la estructura de KinB y su posible relación con el potasio. Para esto, se analizaron las estructuras típicas de proteínas sensoras de potasio o que lo unen, en particular los canales de potasio presentes tanto en eucariotas como en procariotas. De este análisis surgió una posible región, que no poseen ninguna de las otras quinasas del phosphorelay, que se encuentra solapada con el sitio de unión a ATP de la quinasa KinB en la región citoplasmática, la cual posee una alta similitud con la secuencia de aminoácidos consenso de la región filtro o dominio selectivo de unión de potasio conservada en todos los canales de potasio conocidos a la fecha.

A partir de este hallazgo, se realizaron diferentes mutaciones puntuales sobre el gen *kinB* en la región codificante para el supuesto sitio de reconocimiento de  $K^+$  que posee la quinasa KinB y se estudió su efecto sobre el sliding. Estas mutaciones deberían no afectar la capacidad de esporular, de manera de saber que la mutante en KinB es activa en esporulación, y poder evaluar qué ocurriría con la activación del sliding. Verificada esta hipótesis, es

## Resumen

decir que los mutantes en KinB con el sitio de selectividad para potasio mutados, no activaban el sliding y eran totalmente inmóviles, pero sí esporulaban, pudimos proponer un nuevo rol de KinB, junto con KinC, como las quinasas reguladoras del movimiento social tipo sliding a través del sensado de la fluctuación de potasio intracelular en distintas regiones (centro y periferia) que se da durante la expansión (sliding) de la colonia.

Nuestra hipótesis, avalada por resultados experimentales de índole genética y fisiológica no descritos en este resumen, propone que existe una regulación espacio-temporal de las quinasas en una colonia en deslizamiento activo. En un principio, cuando la colonia está compuesta por unas pocas células, la concentración intracelular de potasio es alta y está siendo sensada por KinB, que además, es la quinasa que se expresa primero permitiendo la activación del sliding y la inhibición por potasio del biofilm dependiente de KinC. A medida que la colonia se va desarrollando, KinC se expresa a mayores niveles, pero sigue inhibida en la periferia de la colonia en expansión por la presencia del  $K^+$  pero ya no así en el centro de la colonia donde las células se encontrarían en fase logarítmica tardía y por ende las concentraciones de potasio disminuirían por la presencia de surfactina y transportadores de  $K^+$  activos que expulsarían el catión al medio extracelular. Esto último libera a KinC de su inhibición e inicia la formación de biofilm en el centro de la comunidad bacteriana, dejando las células en expansión en los bordes de la colonia, con KinB siendo estimulada por potasio para seguir avanzando en búsqueda de nuevos nichos. A tiempos mayores de incubación, en el centro de la colonia, donde se formó el biofilm, los nutrientes comienzan a escasear, el estrés nutricional continúa aumentando hasta llegar a niveles de activación de KinA, lo cual permite la formación de cuerpos fructíferos donde finalmente las células esporulan.

Los resultados de esta investigación son altamente novedosos ya que describen un mecanismo cooperativo de movilidad social, el sliding, presente no solo en *Bacillus* sino también en varios patógenos productores de enfermedades infecciosas relevantes (Tuberculosis, Lepra, Ántrax, etc). Hemos identificado los componentes estructurales (BslA, Fas, TasA, EPS) de la

## Resumen

maquinaria del mismo, los genes reguladores implicados en el mismo (Spo0A Y AbrB) y su forma de regulación (phosphorelay) identificando los sensores (KinB Y KinC), la señal (potasio intracelular) y la manera en que funciona (regulación espacio-temporal a través de la unión al sitio de selectividad de KinB y la región PAS-PAC de KinC). Además nuestros resultados podrían tener una relevancia importante en la determinación del comportamiento de los *Bacilli* en la naturaleza, donde deben colonizar nuevos nichos desplazándose de un lugar a otro, por ejemplo en la zona de la rizósfera de las plantas. Relacionado a esto, es de amplio conocimiento el uso de *B. subtilis* como agente de biocontrol a través de la producción de sustancias bio-activas y su reconocido uso en la agroindustria como inoculante o promotor del crecimiento vegetal.

Precisamente, el desarrollo de esta beca Doctoral se llevó a cabo en el marco de un proyecto co-financiado con la empresa BIOTAY S.A. a través de un convenio de transferencia tecnológica tipo PID, entre la UNR, la empresa BIOTAY S.A., el FONCyT y el Conicet, donde el objetivo es desarrollar un producto comercial de base biotecnológica formulado con cepas del género *Bacillus* autóctonas para el mejoramiento de forrajes conservados (henos) destinados a la alimentación animal.

## Referencias

- Abee T, Kovács A T, Kuipers O P, van der Veen S. (2011). Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Curr Opin Biotechnol.* 22: 172–179.
- Abreu F, Silva KT, Martins J L, Lins U. (2006). Cell viability in magnetotactic multicellular prokaryotes. *Int Microbiol.* 9:267-272.
- Abreu F, Morillo V, Nascimento F F, Werneck C, Cantao M E, Ciapina L P, de Almeida L G, Lefevre C T, Bazyliniski D A, de Vasconcelos A T, (2014). Deciphering unusual uncultured magnetotactic multicellular prokaryotes through genomics. *ISME J*, 8:1055-1068.
- Abreu F, Martins J L, Silveira T S, Keim C N, de Barros H G. (2007). '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*', a multicellular, magnetotactic prokaryote from a hypersaline environment. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57:1318-1322.
- Aguilar C, Vlamakis H, Guzman A, Losick R, Kolter R. (2010). KinD is a checkpoint protein linking spore formation to extracellular-matrix production in *Bacillus subtilis* biofilms. *Mbio.* 1(1):e00035-10.
- Amard B, Bertrand-Sarfati J. (1997). Ma old cherty stromatolites of the Franceville Group, Gabon Precambrian. 81:197-221.
- Angelini T E, Roper M, Kolter R, Weitz D A, Brenner M P. (2009). *Bacillus subtilis* spreads by surfing on waves of surfactant. *PNAS.* 106:18109 –18113.
- Anagnostopulos C, Spizizen J. (1961). Requirements for Transformation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 81:741-746.

## Referencias

- Arabolaza A L, Nakamura A, Pedrido M E, Martelotto L, Orsaria L, Grau R R. (2003). Characterization of a novel inhibitory feedback of the anti-anti-sigma SpoIIAA on Spo0A activation during development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 47:1251–1263.
- Bais H P, Fall R, Vivanco J M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol.* 134:307–319.
- Baldi P, Long A D. (2001). A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized t-test and statistical inferences of gene changes. *Bioinformatics.* 17:509 –519.
- Banse A V, Hobbs E C, Losick R. (2011). Phosphorylation of Spo0A by the histidine kinase KinD requires the lipoprotein med in *Bacillus subtilis*. *Bacteriol.* 193:3949-55.
- Beauregard P B, Chai Y, Vlamakis H, Losick R, Kolter R. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:E1621–E1630.
- Blair K M, Turner L, Winkelman J T, Berg H C, Kearns D B. (2008). A molecular clutch disables flagella in the *Bacillus subtilis* biofilm. *Science* 320:1636 –1638.
- Bottone E J, Peluso R W. (2003). Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an antifungal compound that is active against *Mucoraceae* and *Aspergillus* species: preliminary report. *J Med Microbiol.* 52:69-74.
- Branda S S, González-Pastor J E, Ben-Yehuda S, Losick R, Kolter R. (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *PNAS.* 98:11621–11626.
- Branda S S, Chu F, Kearns D B, Losick R, Kolter R. (2006). A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol Microbiol.* 59:1229-38.

- Bruno O A, Romero L A, Ustarroz E. (1997). Forrajes conservados: Henos, Henolaje Empaquetado, Silajes, Calidad de las Reservas y Respuesta animal Invernada bovina en zonas mixtas. Agro 2 de Córdoba. INTA, Centro Regional Córdoba, EEA Marcos Juárez. Sitio argentino de Producción Animal.
- Burbulys D, Trach K A, Hoch J A. (1991). Initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. Cell 64:545–552.
- Calvio C, Celandroni F, Ghelardi E, Amati G, Salvetti S, Cecilianì F, Galizzi A, Senesi S. (2005). Swarming Differentiation and Swimming Motility in *Bacillus subtilis* are controlled by *swrA*, a Newly Identified Dicistronic Operon. J Bacteriol. 187:5356–5366.
- Chai Y, Chu F, Kolter R, Losick R. (2008). Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 67:254 –263.
- Chang W T, Chen Y C, Jao C L. (2007). Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. Bioresour Technol. 1224-30.
- Chen Y R, Zhang R, Du H J, Pan H M, Zhang W Y, Zhou K, Li J H, Xiao T, Wu L F. (2015). A novel species of ellipsoidal multicellular magnetotactic prokaryotes from Lake Yuehu in China. Environ Microbiol. 17:637-47
- Chen Y, Cao S, Chai Y, Clardy J, Kolter R, Guo J, Losick R. (2012). A *Bacillus subtilis* Sensor Kinase Involved in Triggering Biofilm Formation on the Roots of Tomato Plants. Mol Microbiol. 85:418–430.
- Chen R, Guttenplan S B, Blair KM, Kearns D B. (2009). Role of the  $\sigma^D$ -dependent autolysins in *Bacillus subtilis* population heterogeneity. J Bacteriol 191: 5775–5784.

- Choe S. (2002). Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci.* 3:115–121.
- Chu F, Kearns D B, Branda S S, Kolter R, Losick R. (2006). Targets of the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 59:1216-28.
- Chung J D, Stephanopoulos G, Ireton K, Grossman A D. (1994). Gene expression in single cells of *Bacillus subtilis*: evidence that a threshold mechanism controls the initiation of sporulation. *J Bacteriol.* 176: 1977-84.
- Cutting S M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol* 28:214 –220.
- Cunningham K A, Burkholder W F. (2009). The histidine kinase inhibitor Sda binds near the site of autophosphorylation and may sterically hinder autophosphorylation and phosphotransfer to Spo0F. *Mol Microbiol.* 71:659-77.
- Dartois V, Djavakhishvili T, Hoch J A. (1997). KapB is a lipoprotein required for KinB signal transduction and activation of the phosphorelay to sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 26:1097-108.
- Derst C, Karschin A. (1998). Evolutionary link between prokaryotic and eukaryotic K<sup>+</sup> channels. *J Exp Biol.* 201:2791–2799.
- de Hoon M J, Eichenberger P, Vitkup D. (2010). Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network. *Curr Biol.* 20:R735-45.
- Diethmaier C, Pietack N, Gunka K, Wrede C, Lehnik-Habrink M, Herzberg C, Hubner S, Stulke J. (2011). A Novel Factor Controlling Bistability in *Bacillus subtilis*: the YmdB Protein Affects Flagellin Expression and Biofilm Formation. *J Bacteriol.* 193:5997–6007.

## Referencias

Domsch K, Gams W, Anderson T. (2007). Compendium of Soil Fungi, Second Edition Eching: IHW Verlag.

Doyle D A, Morais Cabral J, Pfuetzner R A, Kuo A, Gulbis J M, Cohen S L, Chait B T, MacKinnon R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*. 280:69 –77.

Emmert E A, Handelsman J. (1999). Biocontrol of plant disease: a Gram(-) positive perspective. *FEMS Microbiol Lett* 171:1–9.

Epstein A K, Pokroy B, Seminara A, Aizenberg J. (2011). Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration. *PNAS*. 108:995–1000.

Fabret C, Feher V A, Hoch J A. (1999). Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J Bacteriol*. 181:1975–1983.

Fall R, Kearns D B, Nguyen T. (2006). A defined medium to investigate sliding motility in a *Bacillus subtilis* flagella-less mutant. *BMC Microbiol*. 17:6:31.

Flemming H C, Wingender J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 8:623-633.

Flores E, Herrero A. (2010). Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nat Rev Microbiol*. 8: 39–50.

Fujita M, 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 & Dev*. 19:2236–2244.

## Referencias

- Garti-Levi S, Eswara A, Smith Y, Fujita M, Ben-Yehuda S. (2013). Novel modulators controlling entry into sporulation in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 195:1475–1483.
- Gottig N, Pedrido ME, Méndez M, Lombardía E, Rovetto A, Philippe V, Orsaria L, Grau R. (2005). The *Bacillus subtilis* SinR and RapA developmental regulators are responsible for inhibition of spore development by alcohol. J Bacteriol. 187:2662–2672.
- Goldstein S A, Colatsky T J. (1996). Ion channels: too complex for rational drug design? Neuron. 16:913–919.
- Grau R, de Mendoza D. (1993). Regulation of the synthesis of unsaturated fatty acids by growth temperature in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 8:535–542.
- Goldman B, Bhat S, Shimkets L J. (2007). Genome evolution and the emergence of fruiting body development in *Myxococcus xanthus*. PLoS One, 2:e1329.
- Grossman D A, Witham N D, Burr D H, Lesmana M, Rubin F A, Schoolnik G K, Parsonnet J. (1995). Flagellar serotypes of *Salmonella typhi* in Indonesia: relationships among motility, invasiveness, and clinical illness. J Infect Dis. 171:212-6.
- Hamon M A, Lazazzera B A. (2001). The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 42:1199-209.
- Harshey R. (2003). Bacterial motility on a surface. Many Ways to a Common Goal. Annu Rev Microbiol. 57:249–73.

## Referencias

- Harwood, Cutting. (1990). *Molecular Biological Methods for Bacillus*. John Wiley & Sons Ltd, England. Chapter 4: 175-209.
- Henrichsen J. (1972). Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev.* 36:478 –503.
- Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R. (1994). Mutations in the K<sub>2</sub> channel signature sequence. *Biophys J.* 66:1061–1067.
- Higgins D, Dworkin J. (2012). Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiol Rev.* 36:131-48.
- Hobley L, Ostrowski A, Rao F V, Bromley K M, Porter M, Prescott A R, MacPhee C E, Van Aalten D M, Stanley-Wall N R. (2013). BslA is a self-assembling bacterial hydrophobin that coats the *Bacillus subtilis* biofilm. *PNAS.* 110:13600 –13605.
- Igarashi T, Setlow B, Paidhungat M, Setlow P. (2004). Effects of a *gerF* (*lgt*) Mutation on the Germination of Spores of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 186: 2984–2991.
- Ireton K, Rudner D Z, Siranosian K J, Grossman A D. (1993). Integration of multiple developmental signals in *Bacillus subtilis* through the Spo0A transcription factor. *Genes & Dev.* 7:283–294.
- Islam S T, Mignot T. (2015). The mysterious nature of bacterial surface (gliding) motility: A focal adhesion-based mechanism in *Myxococcus xanthus*. *Semin Cell Dev Biol.* 28 1084-9521.
- Jarrell K F, McBride M J. (2008). The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol.* 6:466–476.

## Referencias

- Jiang M, Shao W, Perego M, Hoch J A. (2000). Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 38:535–542.
- Johansson I, Blatt M R. (2006). Interactive domains between pore loops of the yeast K<sup>+</sup> channel TOK1 associate with extracellular K<sup>+</sup> sensitivity. Biochem J. 393:645, 655.
- Justice S S, Hunstad D A, Cegelski L, Hultgren S J. (2008). Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. Nat Rev Microbiol. 6:162-168.
- Kearns D, Losick R. (2003). Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol.49:581–590.
- Kearns D B, Chu F, Branda S S, Kolter R, Losick R. (2005). A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 55: 739 –749.
- Kearns D. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. Nat Rev Microbiol. 8: 634–644.
- Kinsinger R F, Kearns D B, Hale M, Fall R. (2005). Genetic requirements for potassium ion-dependent colony spreading in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 187:8462– 8469.
- Kinsinger R F, Shirk M C, Fall R. (2003). Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. J Bacteriol 185:5627– 5631.
- Kobayashi K, Iwano M. (2012). BslA (YuaB) forms a hydrophobic layer on the surface of *Bacillus subtilis* biofilms. Mol Microbiol. 85, 51–66.

## Referencias

- Kolodkin-Gal I, Elsholz A K, Muth C, Girguis P R, Kolter R, Losick R. (2013). Respiration control of multicellularity in *Bacillus subtilis* by a complex of the cytochrome chain with a membrane-embedded histidine kinase. *Genes & Dev.* 27:887– 899.
- Kolter R, Greenberg E P. (2006). Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature.*441:300-2.
- Kovács A. (2014). Impact of spatial distribution on the development of mutualism in microbes. *Frontiers in Microbiology, Microbial Symbioses Volume 5, Article 649.*
- Kovács A, Smits W K, Mironczuk A M, Kuipers O P. (2009). Ubiquitous late competence genes in *Bacillus* species indicate the presence of functional DNA uptake machineries. *Environ Microbiol.* 11:1911–1922.
- Kovács A, Kuipers O P. (2011). Rok regulates *yuaB* expression during architecturally complex colony development of *Bacillus subtilis* 168. *J Bacteriol.* 193:998 –1002.
- Kovács A, van Gestel J, Kuipers O P. (2012). The protective layer of biofilm: a repellent function for a new class of amphiphilic proteins. *Mol Microbiol.* 85:811.
- Kuipers O P, de Jong A, Baerends R J, van Hijum S A, Zomer A L, Karsens H A, den Hengst C D, Kramer N E, Buist G, Kok J. (2002). Transcriptome analysis and related databases of *Lactococcus lactis*. *Antonie Van Leeuwen-hoek* 82:113–122.
- Kuo M M, Haynes W J, Loukin S H, Kung C, Saimi Y. (2005). Prokaryotic K<sup>+</sup> channels: from crystal structures to diversity. *FEMS Microbiol Rev.* 29:961,985.

## Referencias

- Leslie J F, Summerell B A. (2006). The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Professional, Ames, Iowa. Ed. Wiley.
- Lombardía E, Rovetto A J, Arabolaza A L, Grau R. (2006). A LuxS-dependent cell-to-cell language regulates social behavior and development in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 188:4442, 4452.
- López D, Fischbach M A, Chu F, Losick R, Kolter R. (2009-a). Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. PNAS. 106:280, 285.
- López D, Vlamakis H, Losick R, Kolter R. (2009-b). Paracrine signaling in a bacterium. Genes & Dev. 23:1631–1638.
- Lundberg M E, Becker E C, Choe S. (2013). MstX and a putative potassium channel facilitate biofilm formation in *Bacillus subtilis*. PLoS One 8:e60993.
- Lyons N, Kolter R. (2015). On the evolution of bacterial multicellularity. Cur Op Microbiol. 24:21–28.
- Martínez A, Torello S, Kolter R. (1999). Sliding motility in mycobacteria. J Bacteriol. 181:7331–7338.
- Mandic-Mulec I, Doukhan L, Smith I. (1995). The *Bacillus subtilis* SinR protein is a repressor of the key sporulation gene *spo0A*. J Bacteriol. 177:4619-27.
- Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. (1982). Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. N. Y., USA.
- McLoon A L, Kolodkin-Gal I, Rubinstein S M, Kolter R, Losick R. (2011). Spatial regulation of histidine kinases governing biofilm formation in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 193:679-85.

- Mhatre E, Monterrosa R G, Kovács A. (2014). From environmental signals to regulators: modulation of biofilm development in Gram-positive bacteria. *J Basic Microbiol.* 54:616 – 632.
- Mirel D B, Chamberlin M J. (1989). The *Bacillus subtilis* flagellin gene (*hag*) is transcribed by the sigma 28 form of RNA polymerase. *J Bacteriol.* 171:3095–3101.
- Moir A, Corfe B M, Behravan J. (2002). Spore germination. *Cell Mol Life Sci.* 59:403-9.
- Molle V, Fujita M, Jensen S T, Eichenberger P, González-Pastor J E, Liu J S, Losick R. (2003). The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 50:1683–1701.
- Murray T, Kazmierczak B. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* Exhibits Sliding Motility in the Absence of Type IV Pili and Flagella. *J Bacteriol.* 190:2700–2708.
- Nadell C, Xavier J, Foster K. 2008. The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol Rev.* 33:206–224.
- Nicholson W L., Munakata N, Horneck, G, Melosh H J. Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol.* 64, 548-572.
- Ongena M, Jacques P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16:115-25.
- Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, Arpigny J, Thonart P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ Microbiol.* 9:1084-90.

- Ostrowski A, Mehert A, Prescott A, Kiley T B, Stanley-Wall N R. (2011). YuaB functions synergistically with the exopolysaccharide and TasA amyloid fibers to allow biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 193:4821-31.
- Paredes-Sabja D, Bond C, Carman R J, Setlow P, Sarker M R. (2008). Germination of spores of *Clostridium difficile* strains, including isolates from a hospital outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease (CDAD). *Microbiology.* 154:2241-50.
- Paredes-Sabja D, Setlow P, Sarker M R. (2011). Germination of spores of *Bacillales* and *Clostridiales* species: mechanisms and proteins involved. *Trends Microbiol.* 19:85-94.
- Park S Y, Pontes M H, Groisman E A. (2015). Flagella-independent surface motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PNAS.* 112:1850 –1855.
- Pedrido M E, de Oña P, Ramirez W, Leñini C, Goñi A, Grau R. (2013). Spo0A links de novo fatty acid synthesis to sporulation and biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 87:348 –367.
- Perego M. (2001). A new family of aspartyl phosphate phosphatases targeting the sporulation transcription factor Spo0A of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 42:133-43.
- Perego M, Hoch J A. (1996). Cell-cell communication regulates the effects of protein aspartate phosphatases on the phosphorelay controlling development in *Bacillus subtilis*. *PNAS.* 93:1549-53.
- Piggot P J, Hilbert D W. (2004) Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol.* 7:579-86.

## Referencias

- Rodríguez-Ruiz J, Belarbi E, Sánchez J L G, Alonso D L. (1998). Rapid simultaneous lipid extraction and transesterification for fatty acid analyses. *Biotechnol Tech.* 12:689 – 691.
- Romero L A. (2004). Ensilaje de leguminosas con énfasis en alfalfa y soja. INTA Expone. Oliveros
- Rossi C A, González G L, Torrá E. (2008). Evaluación forrajera de hojas y frutos de "Acacia negra" (*Gleditsia triacanthos*). *Revista Argentina de Producción Animal.* 1:349-543.
- Rudrappa T, Bais H P. (2007). *Arabidopsis thaliana* root surface chemistry regulates in planta biofilm formation of *Bacillus subtilis*. *Plant Signal Behav.* 2:349 –350.
- Schultz D, Wolynes P, Ben Jacob E, Onuchic J. (2009). Deciding fate in adverse times: sporulation and competence in *Bacillus subtilis*. *PNAS.* 106:21027-34.
- Sanders T. (2003). Food safety and risk assessment: naturally occurring potential toxicants and anti-nutritive compounds in plant foods. *Forum Nutr.* 56:407-9.
- Seminara A, Angelinic T, Wilkingb J, Vlamakis H, Ebrahime S, Kolter R, Weitz A, Brennerb M. (2012). Osmotic spreading of *Bacillus subtilis* biofilms driven by an extracellular matrix. *PNAS.* 109:1116-1121.
- Setlow P. (2003). Spore germination. *Curr Opin Microbiol.* 6:550-6.
- Shrout J. (2015). A fantastic voyage for sliding bacteria. *Trends Microbiol.* 23:244-6.

## Referencias

- Singh P, Cameotra S. (2004). Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Biotechnol.* 22:142-6.
- Sonenshein A. (2000). Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol.* 3:561-6.
- Srivastava P. (2005). Vindhyan akinites: An indicator of mesoproterozoic biospheric evolution. *Orig Life Evol Biosph.* 35:175-185.
- Stein T. (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol.* 56:845-57.
- Stöver A G, Driks A. (1999). Secretion, localization, and antibacterial activity of TasA, a *Bacillus subtilis* spore-associated protein. *J Bacteriol.* 181:1664 –1672.
- Strauch M, Spiegelman G, Perego M, Johnson W, Burbulys D, Hoch J. (1989). The transition state transcription regulator *abrB* of *Bacillus subtilis* is a DNA binding protein. *EMBO J.* 5 :1615- 1621.
- Strauch M, Hoch J. (1993). Signal transduction in *Bacillus subtilis* sporulation. *Curr Opin Genet Dev.* 3:203-12.
- Stragier P, Losick R. (1996). Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet.* 30:297-41.
- Szurmant H, Hoch J A. (2013). Statistical analyses of protein sequence alignments identify structures and mechanisms in signal activation of sensor histidine kinases. *Mol Microbiol.* 87:707–712.
- Trejo M, Douarchea C, Bailleux C, Poularda C, Mariota S, Regnard C, Raspada E. (2013). Elasticity and wrinkled morphology of *Bacillus subtilis* pellicles. *PNAS.* 110: 2011–2016.

- Trach K A, Hoch J A. (1993). Multisensory activation of the phosphorelay initiating sporulation in *Bacillus subtilis*: identification and sequence of the protein kinase of the alternate pathway. *Mol Microbiol.* 8:69 –79.
- Ventroni L, Lattanzi F A, Bertram N A, Cangiano C. (2008) Eficiencia de utilización de la radiación y partición de la materia seca en alfalfa. *Revista Argentina de Producción Animal.* 28:349-543.
- Vlamakis H, Chai Y, Beaugerard P, Losick R, Kolter R. (2013). Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Microbiol.* 11:157–168.
- Vlamakis H, Aguilar C, Losick R, Kolter R. (2008). Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes & Dev.* 22:945–953.
- van Gestel J, Weissing F J, Kuipers O P, Kovács A. (2014). Density of founder cells affects spatial pattern formation and cooperation in *Bacillus subtilis* biofilms. *ISME J.* 8:2069 –2079.
- van Gestel J, Vlamakis H, Kolter R. (2015). From cell differentiation to cell collectives: *Bacillus subtilis* uses division of labor to migrate. *PLoS Biol.* 13:e1002141
- van Hijum S A, de Jong A, Buist G, Kok J, Kuipers O P. (2003-a). UniFrag and GenomePrimer: selection of primers for genome-wide production of unique amplicons. *Bioinformatics.* 19:1580 –1582.
- van Hijum S A, Garcia de la Nava J, Trelles O, Kok J, Kuipers O P. (2003-b). MicroPreP: a cDNA microarray data pre-processing framework. *Appl Bioinformatics* 2:241–244.

- Verhamme D T, Murray E J, Stanley-Wall N R. (2009). DegU and Spo0A jointly control transcription of two loci required for complex colony development by *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 191:100 –108.
- VidyaLaxme B, Rovetto A, Grau R, Agrawal R. (2014). Synergistic effects of probiotic *Leuconostoc mesenteroides* and *Bacillus subtilis* in malted ragi (*Eleusine corocana*) food for antagonistic activity against *V. cholerae* and other beneficial properties. *J Food Sci Technol.* 51:3072–3082.
- Wang L, Grau R, Perego M, Hoch JA. (1997). A novel histidine kinase inhibitor regulating development in *Bacillus subtilis*. *Genes & Dev.* 11:2569 –2579.
- Watnick P, Kolter R. (2000). Biofilm, City of Microbes. *J Bacteriol.* Minireview 18:2675–2679.
- West S A, Griffin A S, Gardner A, Diggle S P. (2006). Social evolution theory for microorganisms. *Nat Rev Microbiol.* 4: 597–607.
- Winkelman J T, Blair K M, Kearns D B. (2009). RemA (*YlzA*) and RemB (*YaaB*) regulate extracellular matrix operon expression and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 191:3981-91.
- Zeigler D, Pragai Z, Rodriguez S, Chevreux B, Muffler A, Albert T, Bai R, Wyss M, Perkins J. (2008). The Origins of 168, W23, and Other *Bacillus subtilis* Legacy Strains. *J Bacteriol.* 190:6983-95.
- Zhang Y, Miller RM. (1992). Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Appl Environ Microbiol.* 58:3276 –3282.