



Vigilada Mineducación

Evaluación de características fenotípicas de variantes morfológicas de la cepa *Bacillus tequilensis* EA-CB0015

Andrea Ramírez Villa

Proyecto de Grado

Asesora:

Msc. Yessica A. Montoya Giraldo

Co- asesora:

PhD. Valeska Villegas Escobar

UNIVERSIDAD EAFIT
ESCUELA DE CIENCIAS
BIOLOGÍA
MEDELLÍN
2021

Evaluación de características fenotípicas de variantes morfológicas de la cepa *Bacillus tequilensis* EA-CB0015

Andrea Ramírez-Villa ^a, Valeska Villegas-Escobar ^b, Yessica Alejandra Montoya-Giraldo ^c

^a Estudiante de Biología. Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad EAFIT, Medellín, Antioquia, Colombia

^b Asesor. Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad EAFIT, Medellín, Antioquia, Colombia

^c Asesor principal. Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad EAFIT, Medellín, Antioquia, Colombia.
e-mail: ymontoy2@eafit.edu.co

Resumen

La variación fenotípica bacteriana es una estrategia de supervivencia que consiste en aumentar la diversidad y la aptitud de la población celular, por medio de la generación de cambios aleatorios en la expresión génica, ha sido reportada en especies patógenas y no patógenas, siendo esencial su estudio en los ámbitos médicos y biotecnológicos. En este caso, la cepa *Bacillus tequilensis* EA-CB0015 (*BtqEA15_WT*) ingrediente activo de un agente biocontrolador contra la sigatoka negra, ha presentado variantes morfológicas. Con el fin de identificar algunas diferencias fenotípicas de la cepa *BtqEA15_WT* y las variantes morfológicas que emergen de ella, se hicieron evaluaciones a nivel microscópico, macroscópico y bioquímico de las cepas estudiadas. Para esto, se hizo una caracterización de las colonias formadas por cada una de las cepas, donde se observó que las variantes presentaban una morfología similar entre ellas que difiere de la morfología de colonia formada por *BtqEA15_WT*. A nivel de célula, se determinó que todas las cepas fueron Gram positivas, con forma de bacilo y no presentaron diferencias significativas en su tamaño. Sin embargo, la única cepa variante que, evidenció presencia de endosporas fue la *BtqEA15_M2*. Finalmente, a nivel bioquímico, tanto el porcentaje de esporulación como la actividad antagónica y la formación de biopelícula, se vieron reducidas en las cepas variantes, mientras que, en la motilidad no se identificó reducción alguna en las cepas. Las diferencias fenotípicas identificadas entre las variantes morfológicas muestran la pérdida de rasgos importantes que potencialmente, pudieran afectar su supervivencia sobre la hoja de banano.

Palabras clave: Variantes fenotípicas, *Bacillus tequilensis* EA-CB0015, morfología, motilidad, esporulación, antagonismo, biopelícula.

1. Introducción

Las bacterias son microorganismos unicelulares que pueden cooperar entre ellos para desarrollar el comportamiento de un organismo multicelular, es decir, las células de una cepa bacteriana en busca de adaptarse y sobrevivir ante cambios detectados del ambiente que la ponen bajo estrés comienzan a diferenciarse en subpoblaciones con funciones especializadas que son controladas por la expresión de un grupo específico de genes (Arnaouteli *et al.*, 2021; Cairns *et al.*, 2014; Gallegos-Monterrosa *et al.*, 2021; Kalamara *et al.*, 2018). Estas funciones especializadas, tales como motilidad, esporulación, virulencia, biopelícula, entre otras, le confieren a la cepa bacteriana no sólo un comportamiento específico, sino también una morfología de colonia determinada (Ambrico *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2016; van Teeseling *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2016). Sin embargo, en estudios recientes se ha identificado que en cepas bacterianas como *Acidovorax radialis*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus brevis*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras, no se presenta una única morfología de colonia, si no que a partir de ellas han emergido colonias con una descripción morfológica y algunas modificaciones en las funciones especializadas, diferentes a la colonia inicial (Berditsch *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2012; Malone, 2015). Estas nuevas morfologías, también llamadas variantes fenotípicas (Phillips *et al.*, 2019), son el resultado de variaciones asociadas a los rasgos bioquímicos, morfológicos y fisiológicos en una población isogénica modulado por señales ambientales, lo que se define como variación fenotípica o variación de fase (Cayrou *et al.*, 2021; Goldberg *et al.*, 2014; van Teeseling *et al.*, 2017; Wisniewski-Dyé & Vial, 2008). Esta, funciona como un mecanismo ON/OFF y consiste en aumentar la diversidad y la aptitud de la población celular, por medio de la generación de cambios aleatorios y reversibles en la expresión génica como resultado de modificaciones genéticas, como mutaciones espontáneas y reordenamientos genómicos, o mecanismos epigenéticos en unos locus determinados, aunque también se ha evidenciado la variación fenotípica a nivel celular por mecanismos como el ruido, la señalización y la condición de la célula (Li *et al.*, 2012; Phillips *et al.*, 2019; West & Cooper, 2016).

De los géneros de bacterias más estudiados para evaluar las variaciones fenotípicas, es *Bacillus* spp., siendo la especie más estudiada *Bacillus subtilis*, una bacteria ubicua, Gram positiva formadora de endosporas, aerobia y anaerobia facultativa, que posee motilidad flagelar, formación de biopelícula y es altamente implementada a nivel comercial por su producción de metabolitos secundarios (Ambrico *et al.*, 2019; Tasaki *et al.*, 2017). Esta especie también se ha caracterizado por presentar variantes fenotípicas, en un estudio realizado por Batson en 1934 donde evaluaba tres cepas bacterianas logró identificar al menos cuatro tipos de colonias distintas de cada una de las cepas en estudio (Batson, 1934). A partir de ensayos como estos, se fue esclareciendo la idea de que poblaciones isogénicas bajo ciertas condiciones podrían exhibir células en estados fisiológicos diferentes dando lugar a diversas morfologías de colonias bacterianas (Ambrico *et al.*, 2019).

Otra especie de este género bacteriano que presenta este comportamiento es la cepa *Bacillus tequilensis* EA-CB0015 (*BtqEA15_WT*) (Gen Bank accession number KC006063), aislada de la filosfera de plantas de banano del Urabá Antioqueño, esta cepa se caracteriza por

formar biopelícula, formar endosporas, producir tensoactivos, compuestos indólicos (Ceballos *et al.*, 2012) y por inhibir el crecimiento de diferentes hongos (Arroyave-Toro *et al.*, 2017; Montoya Giraldo, 2020). Por estos rasgos fenotípicos, ha sido empleada como ingrediente activo de un agente controlador biológico para el control de la Sigatoka negra, una enfermedad de cultivos de banano (Gutierrez-Monsalve *et al.*, 2015). Sin embargo, durante el desarrollo de este producto biológico, se identificaron dos morfotipos diferentes a la cepa original, nombrados *BtqEA15_M1* y *BtqEA15_M2*, los cuales al ser evaluados mostraron una reducción en su capacidad para formar biopelículas, esporular, en la actividad antagonica y en la motilidad, comparado con *BtqEA15_WT*, características que podrían reducir la eficiencia del producto biológico de interés a desarrollar, al reducir su capacidad inhibitoria, reducir el tiempo de vida en anaquel y no lograr una buena colonización en los cultivos a aplicar (T. Z. Cuellar-Gaviria *et al.*, 2021; Montoya Giraldo, 2020). Durante el estudio y la caracterización de estas dos variantes fenotípicas emergentes de la cepa *BtqEA15_WT* (Montoya Giraldo, 2020), se identificaron dos nuevos morfotipos denominados *BtqEA15_M3* y *BtqEA15_M4* aislados de un ensayo de evolución adaptativo de laboratorio (ALE) realizados en medio DRU teniendo como base la cepa *BtqEA15_WT* para conocer la evolución morfológica de la *BtqEA15_WT* en el tiempo (Montoya Giraldo, 2020).

En busca de comprender más a fondo las diferencias fenotípicas que pudieran presentarse entre la *BtqEA15_WT* y sus variantes morfológicas, en este trabajo de investigación se realizaron evaluaciones macroscópicas y microscópicas para dar una descripción clara de las colonias formadas por las cepas bacterianas evaluadas, y se realizaron evaluaciones de algunos de los rasgos bioquímicos más importantes del género *Bacillus* spp., incluyendo: esporulación, motilidad, formación de biopelícula, y antagonismo, para describir el fenotipo de cada una de ellas.

2. Materiales y métodos

2.1. Microorganismos, medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Las variantes de la cepa *BtqEA15_WT*, evaluadas en este proyecto, fueron previamente identificadas y aisladas de diferentes condiciones de cultivo. Por un lado, la cepa *BtqEA15_M1* se aisló durante un proceso de fermentación líquida a partir de la cepa *BtqEA15_WT*, mientras que la variante *BtqEA15_M2* se aisló en medio de cultivo sólido (T. Cuellar-Gaviria, 2021; Montoya Giraldo, 2020). Por otra parte, las cepas *BtqEA15_M3* y *BtqEA15_M4* fueron aisladas de un ensayo de evolución adaptativo de laboratorio realizado a partir de la cepa *BtqEA15_WT* en medio D (33.4 g/L de glucosa (PanReac Applichem), 32.5 g/L de extracto de levadura (Oxoid), 4.0 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (PanReac Applichem), 1.0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck), 0.5 g/L de K_2HPO_4 (PanReac Applichem), 0.042 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Caloerba), 0.031 g/L de CaCl_2 (Carloerba)) (Mosquera *et al.*, 2014) y en medio Tryptic Soy Broth (TSB, Merck), por 19 y 25 días, respectivamente (Montoya Giraldo, 2020). Estas cepas bacterianas, junto con las cepas *Bacillus subtilis* 168 y *Bacillus subtilis* NCIB 3610, usadas como control negativo y positivo

respectivamente, para algunos ensayos, fueron conservadas en TSB suplementado con 20% de Glicerol (PanReacAppliChem) a -80°C y activadas en medio de cultivo Tryptic Soy Agar al 50% (TSA, Merck) a 37°C por 24h, antes de cualquier uso experimental. Adicionalmente, las cepas fúngicas empleadas para los ensayos de antagonismo fueron *Colletotrichum acutatum* EA-HP012, aislada del cultivo de tamarillo por (Arroyave-Toro et al., 2017) y *Fusarium Oxysporum* isla bonita aislada en cultivos de banano en el Urabá antioqueño (Zapata Henao, 2019). Estos hongos se conservaron en papel filtro de celulosa a una temperatura de 4°C y se activaron en medio Potato Dextrose Agar (PDA, Merck) a una temperatura de 21°C con un tiempo de crecimiento de 10 a 14 días, antes de hacer el ensayo de actividad antagónica (Arroyave-Toro et al., 2017).

2.2. Caracterización morfológica a nivel macroscópico y microscópico de las cepas bacterianas

La activación de las cepas fue realizada en tres momentos diferentes con el objetivo de describir su morfología a nivel de colonia (color, forma y tamaño). De cada cepa activada en los diferentes momentos, se eligió una colonia para ser caracterizada mediante el uso del estereoscopio (ZEISS Discovery V8) usando objetivos Plan S 1.0x FWD 81 mm de magnificación 10X a 80X con cámara incorporada marca ZEISS AxioCam ICc 1 of 60N-C and 0.63X, la cual fue usada para tomar las fotos. La evaluación del tamaño de colonia se realizó cada día, después del primer día de incubación de las cepas, durante tres días consecutivos, y la descripción de forma y color, se hizo sólo al tercer día de incubación de las cepas. En total se evaluaron tres colonias por cepa.

Para la descripción microscópica, se activaron las cepas en medio TSA 50% (Merck) y se tomó una colonia pura de cada una pasadas las 24h de incubación para realizar una tinción Gram, y una colonia con 32h de incubación, para una tinción de esporas. Los resultados obtenidos se visualizaron con el objetivo 100 X en un microscopio AxioStar Plus ZEISS equipado con una cámara AxioCamICc3. Se tomaron dos colonias por cepa y en total se hicieron mediciones de 90 células para cuantificar su tamaño. Respecto a la tinción de esporas, se tomaron 2 colonias por cepa y se identificó la presencia de espora y la ubicación de la misma dentro de la célula.

2.3. Ensayo de esporulación

En un primer momento, para determinar cuáles cepas bacterianas tenían la capacidad de esporular, se procedió a realizar la activación de las cepas en TSA al 50% (Merck) y se incubaron a 37°C por 48h. De cada cepa bacteriana activada, se tomó una colonia y se depositó en un eppendorf de 1.5 mL con 1 mL de agua destilada estéril, donde se resuspendió mediante el uso de un vórtex Corning LSE vortex mixer. Una vez disueltas las colonias en el agua, se hizo una tinción de esporas al igual que un rayado por agotamiento en TSA al 50% (Merck) y se incubaron a 37°C

por 24h. Seguido a esto, los mismos eppendorf con las cepas diluidas en el agua fueron sometidos a un choque térmico en un bloque de calor Stuart, sample concentrator (SBH CON/1) a 80°C por 15 minutos y se llevó a cabo el mismo procedimiento de tinción y sembrado, descrito anteriormente. La siembra por agotamiento de cada una de las cepas tanto antes y después del choque térmico se llevó a cabo por triplicado.

Las cepas bacterianas que crecieron después del tratamiento del choque térmico, indicando su capacidad de esporulación, fueron activadas y resuspendidas en agua una vez más, como se explicó previamente. A partir de esta solución madre, se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} , de las cuales se sembraron por superficie las diluciones 10^{-4} y 10^{-3} para antes y después del choque en la cepa *BtqEA15_M2* y las diluciones 10^{-4} para antes y después del choque en la cepa *BtqEA15_WT* en TSA al 50% (Merck) y se incubaron a 37°C por 24h. Posteriormente, las mismas diluciones seriadas fueron sometidas a un choque térmico (80°C por 15 minutos) y se sembraron por superficie en TSA al 50%. (Merck). Finalmente, las colonias que crecieron antes y después del choque térmico de cada una de las cepas se contaron y se determinó la eficiencia de esporulación como la relación entre las células que crecieron después del choque término y las células totales que crecieron antes del choque térmico. Cada dilución fue sembrada por triplicado antes y después del choque térmico (Jiang et al., 2020; Montoya Giraldo, 2020).

2.4. Formación de biopelícula

La formación de biopelícula generada por cada cepa bacteriana se estimó a nivel cualitativo, a partir de las indicaciones modificadas descritas por (Gingichashvili *et al.*, 2017; Shemesh & Chaia, 2013). En primer lugar, las cepas bacterianas se activaron en TSA 50% (Merck) y pasadas las 24 h de incubación, se tomó una colonia por cepa para inocular 10 mL de caldo de Lisogenia con Glicerol y Manganeso (LBGM) (10 mL/L de glicerol (PanReacAppliChem) al 1%, 15mg/L de sulfato de manganeso (Panreac) al 0.1 mM, 10g/L NaCl (Merck), 10g/L de Triptona (Oxoid), 5g/L de extracto de levadura (Oxoid)), contenido en un erlenmeyer de 100 mL. Se llevaron a incubación a 120 rpm, 37°C por 12h y cumplido el tiempo, se ajustó la densidad óptica (OD_{600}) hasta 1.0 empleando el espectrofotómetro GENESYS 10S UV-ViS y teniendo como blanco el medio LBGM. Finalmente, se inocularon en cajas de Petri pequeñas (60 mm) 4 mL de medio fresco LBGM con 1 mL de los cultivos bacterianos y se incubaron por 48h a 37°C en condiciones estáticas. A la hora 24 y 36 de incubación se tomó registro fotográfico de la biopelícula formada por cada cepa. Se hicieron 3 réplicas por bacteria evaluada y el ensayo se repitió dos veces en diferentes momentos.

2.5. Ensayo de motilidad

La motilidad tipo swimming y swarming de las cepas bacterianas fue evaluada siguiendo el protocolo de (Ghelardi *et al.*, 2012; Kearns & Losick, 2003) con algunas modificaciones propuestas por (Montoya Giraldo, 2020). Para ello, se activaron las cepas en TSA al 50% (Merck) con las condiciones dadas anteriormente. Después de 24 h de incubación, una colonia por cepa fue tomada e inoculada en 10 mL de medio Luria Bertani (LB) al 100% (5 g/L de NaCl (Merck), 10 g/ L Triptona (Oxoid), extracto de levadura 5 g/ L (Oxoid)), contenido en un Erlenmeyer de 100 mL. La cepa *BtqEA15_WT* fue sometida a un choque térmico de 80°C por 15 minutos en un bloque de calor *Stuart sample concentrator (SBH CON/1)* antes de ser agregada a los 10 mL de medio LB, con el fin de garantizar que las variantes morfológicas no surgieran durante el desarrollo del ensayo. Luego de inocular el medio LB con las colonias de cada cepa bacteriana, se llevaron a 120 rpm, 37°C por 12 h. Pasado este tiempo, los cultivos bacterianos fueron centrifugados a 4500 rpm a 4°C por 15 minutos en una centrífuga Hettich Universal 320, el sobrenadante se descartó y el pellet fue resuspendido en medio LB al 100% hasta alcanzar una OD_{600} de 1.0, determinada a partir de espectrofotometría usando el espectrofotómetro GENESYS 10S UV-ViS. Posteriormente, se tomaron 3 µL de cada cultivo bacteriano para inocular el centro de la caja petri con el medio de cultivo semisólido para swimming y swarming preparados con 24h de anticipación, los cuales contenían 10% de LB y un porcentaje de agar bacteriológico (Oxoid) específico para cada uno, 0.3% para swimming y 0.7% para swarming. Las cajas inoculadas con las bacterias se llevaron a incubación a 30°C, y cada cierto tiempo se hacía la medición del diámetro alcanzado por las bacterias en ese tiempo, con un pie de rey. Tanto para swimming como para swarming, se inició con un tamaño de diámetro aproximado de 4 a 7 mm, la cual iba creciendo a medida que pasaba el tiempo de incubación. Las medidas de los diámetros de motilidad alcanzados por cada una de las cepas se tomaron a las 2, 5, 7 y 9 horas de incubación para swimming y a las 3, 6, 8 y 10 h de incubación para swarming. Se hicieron tres replicas por cepa por ensayo (swimming y swarming) y se hicieron dos repeticiones.

2.6. Evaluación de la actividad antifúngica

La técnica del anillo explicada por Dhingra y Sinclair (1995) fue puesta en práctica con el propósito de evaluar a nivel *in vitro* la actividad antifúngica de las cepas bacterianas contra *F. oxysporum* isla bonita y *C. acutatum* EA-HP012 (Arroyave-Toro *et al.*, 2017). Para esto, se tomó una muestra del micelio del hongo de 5 mm aproximadamente después de 10-12 días de haber sido activados en medio PDA a una temperatura de 21°C. La muestra se ubicó en el centro de una caja Petri (90 mm) con PDA, de tal forma que el micelio del hongo estuviese en contacto con el medio. Posterior a esto, se impregnó el interior de la tapa de una caja Petri pequeña (60 mm) con cada una de las bacterias, previamente activadas en TSA al 50% (Merck), con las cuales

se sembraba alrededor de la muestra de hongo que estaba en la caja PDA, formando así un anillo alrededor del mismo.

Como control negativo, se inoculó una muestra del hongo en PDA, pero en este caso no se sembraba alrededor de éste la muestra bacteriana, sino que se demarcaba en la parte externa de la caja Petri la circunferencia de la tapa de una caja Petri pequeña. Cuando el crecimiento del hongo alcanzaba dicha demarcación, se registraron las medidas de los micelios radiculares alcanzados en las demás cajas, con un pie de rey. Finalmente, la actividad antagónica de las cepas bacterianas se calculaba con la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{(\text{Diámetro del control}) - (\text{Diámetro de hongos con las cepas})}{(\text{Diámetro del control})} \times 100$$

Este ensayo se hizo por triplicado para cada cepa bacteriana contra los hongos evaluados y se hicieron dos repeticiones independientes para *C. acutatum* y solo una vez para *F. oxysporum*.

2.7. Análisis estadístico

Se empleó el programa estadístico RStudio versión 1.4.1106 para la comparación de las características fenotípicas entre las cepas variantes y la cepa *BtqEA15_WT*, usando la función de Tukey con un nivel de confianza del 95%. El cumplimiento de los supuestos se verificó con la prueba de Levene para la homocedasticidad, la prueba de Shapiro Wilks para la normalidad y la prueba de Durbin Watson para la independencia de los datos.

3. Resultados

3.1. Descripción morfológica a nivel celular y de colonia de la cepa *BtqEA15_WT* y sus variantes

La cepa *BtqEA15_WT* se caracteriza por formar colonias puntiformes, con consistencia seca, textura rugosa, margen ondulada, elevación plana y crateriforme, de color blanco crema, opaca, con un tamaño de colonia aproximado de 2.89 ± 0.03 mm, y de célula de 1.88 ± 0.07 μ m (Villegas-Escobar et al., 2013). Contrario a ello, las colonias formadas por las cuatro variantes presentaron características morfológicas diferentes. Por un lado, la cepa *BtqEA15_M1*, presentó colonias planas, lisas, circulares, de color blanco, translúcidas, con margen entera y mucosa, con un tamaño de colonia 1,64 veces mayor a la *BtqEA15_WT* (4.74 ± 0.07 mm), y un tamaño de células aproximado de 1.99 ± 0.05 μ m, siendo éstas Gram positivas, con forma de bastón y no formadora de endosporas. Descripción que se asemeja a las colonias formadas por la cepa *BtqEA15_M2*, las cuales son planas, blancas translúcidas, mucosas, lisas, con margen entera, pero más circulares que la *BtqEA15_M1*, con un tamaño aproximado de 4.64 ± 0.06 mm y son capaces de formar

endosporas. Sus células son Gram positivas, con forma de bastón y con un tamaño de 1.95 ± 0.05 μm . Por otra parte, la cepa Gram positiva, no formadora de endosporas, *BtqEA15_M3*, forma colonias con un tamaño aproximado de 4.27 ± 0.07 mm, puntiformes, blancas, traslúcidas, planas, lisas, con margen ondulada, y células con forma de bastón de tamaño 2.01 ± 0.08 μm . Finalmente, la cepa *BtqEA15_M4* presentó un tamaño de colonia 2,3 veces mayor que la *BtqEA15_WT* (6.65 ± 0.14 mm), con margen ondulada, consistencia mucosa, textura lisa y elevación plana. Sus células Gram positivas, en forma de bastón, tuvieron un tamaño aproximado de 1.91 ± 0.06 μm y no se evidenció formación de endosporas por parte de esta cepa. Las imágenes de cada una de las cepas descritas anteriormente se pueden observar en la Figura 1.

Adicionalmente, los resultados de tamaño de colonias mostraron que existe una diferencia estadísticamente significativa con el tamaño de colonia de la variante morfológica *BtqEA15_M4* respecto a la cepa *BtqEA15_WT*, siendo el tamaño de *BtqEA15_M4* dos veces mayor que la *BtqEA15_WT*, mientras que los tamaños de célula no presentaron ninguna diferencia estadísticamente significativa entre las cepas bacterianas evaluadas.

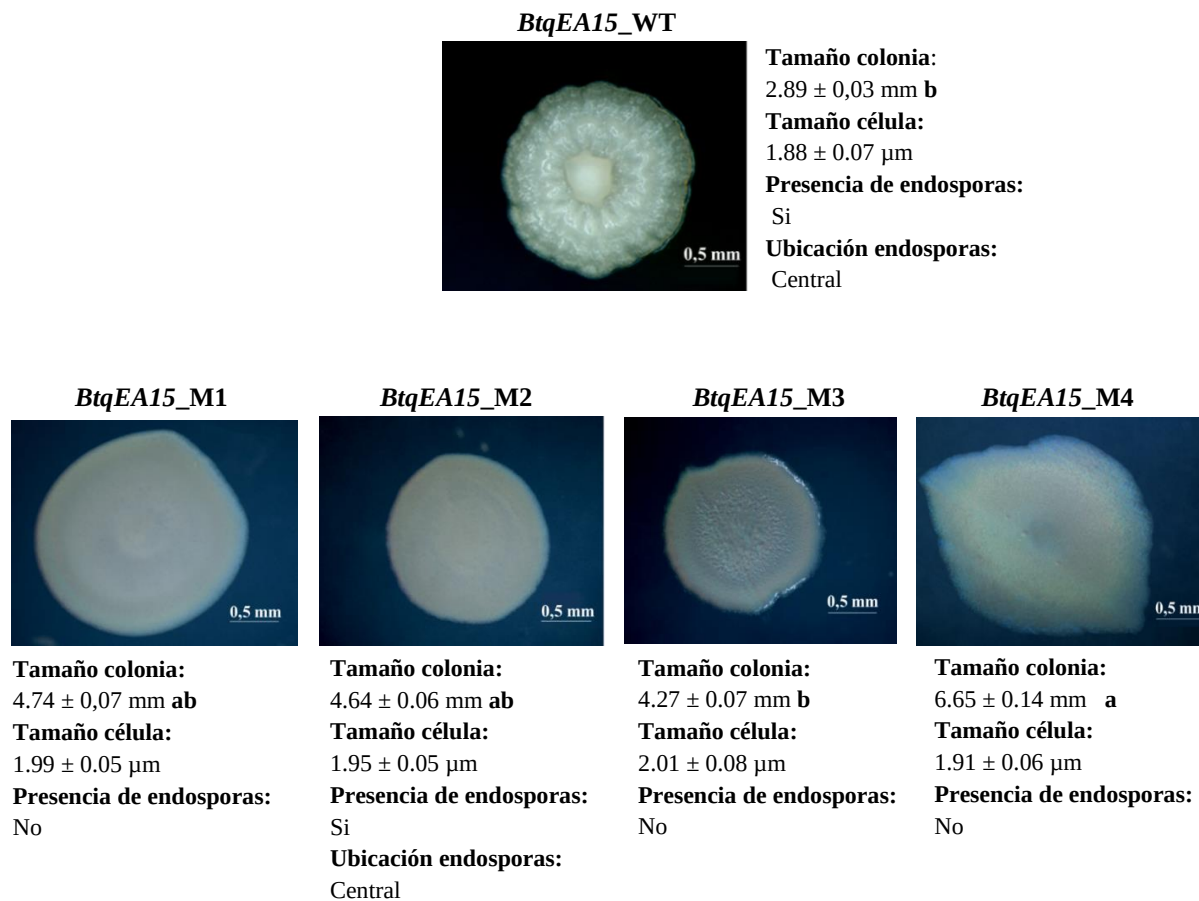


Figura 1. Imágenes de las colonias de las variantes y la cepa *BtqEA15_WT* en el tercer día de incubación a 30°C. Estas imágenes fueron registradas en un estereoscopio ZEISS Discovery V8 con objetivos Plan S 1.0x FWD 81 mm con cámara ZEISS AxioCam ICc 1 de 60N-C y 0.63X. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las cepas evaluadas según la prueba de Tukey (el valor-p=0.00154 para el tamaño de colonias).

3.2. Capacidad de esporulación de las cepas evaluadas

En la evaluación microscópica de las cepas bacterianas se observó que no todas las cepas evaluadas tenían presencia de endosporas al hacer la tinción de esporas. Por este motivo, se llevó a cabo el ensayo de porcentaje de esporulación con el fin de evaluar la capacidad de formación de endosporas de las bacterias. En una primera fase del ensayo, donde se verificaba si las bacterias crecían en medio TSA 50% (Merck) después de ser sometidas a un choque térmico, se observó que las únicas cepas que crecieron fueron la *BtqEA15_M2* y la cepa *BtqEA15_WT*, lo que sugirió que sólo estos dos morfotipos tenían la capacidad de producir endosporas (Figura 2).

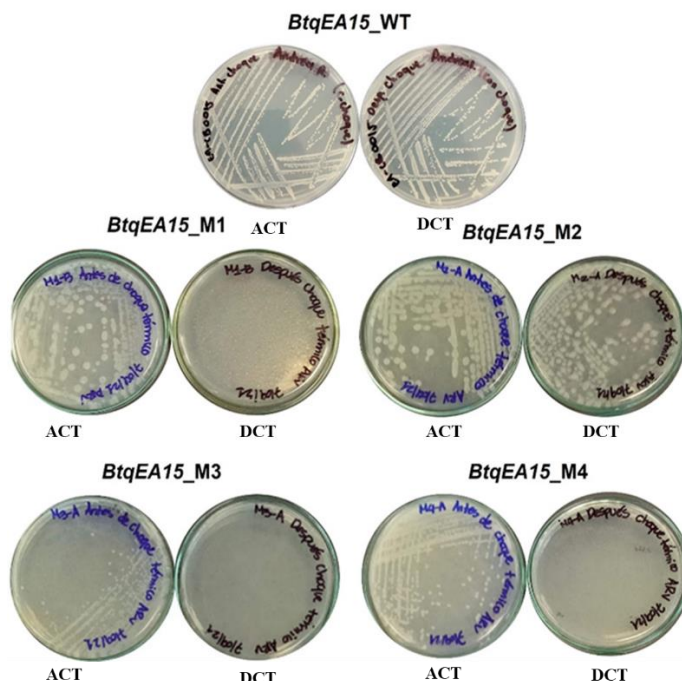


Figura 2. Activación de células antes y después del choque térmico. Las cajas Petri que se ubican al lado izquierdo denominadas ACT muestran el resultado de cada cepa antes del choque térmico, y las que están al lado derecho denominadas DCT muestran el resultado de cada cepa después del choque térmico.

Basado en ese resultado, para la segunda parte del ensayo se emplearon sólo esas dos cepas (*BtqEA15_M2*, *BtqEA15_WT*) para determinar su eficiencia de esporulación mediante el conteo de colonias que formaron antes y después de choque térmico, en el mismo medio de cultivo mencionado anteriormente. El resultado obtenido de ello fue que la variante *BtqEA15_M2* redujo su porcentaje de esporulación con respecto a la cepa *BtqEA15_WT*, logrando cada una un porcentaje de 2.18% y 37.61% respectivamente, sugiriendo que tal vez, otra característica fenotípica de las cepas donde es importante el proceso de esporulación, como la formación de biopelícula, también pudieran verse afectadas entre las cepas variantes y la *BtqEA15_WT*.

3.3. Capacidad de la formación de biopelícula de las cepas evaluadas

Debido a que el porcentaje de esporulación evidenció que sólo la cepa variante *BtqEA15_M2* tenía la capacidad de formar endosporas, se hizo la evaluación de la formación de biopelícula para determinar si estas cepas variantes también presentaban una reducción en esta característica fenotípica. Cualitativamente, los resultados mostraron que las cepas variantes *BtqEA15_M1* y

BtqEA15_M2 tuvieron poca formación de biopelícula, una muy débil, lisa y desagregada. En el caso de las variantes *BtqEA15_M3* y *BtqEA15_M4* no formaron biopelícula, mostrando similitud al control negativo (medio LBGM sin bacteria). Contrario a esto, la biopelícula formada por *BtqEA15_WT* y al control positivo *B. subtilis* NCIB 3610, fue rugosa, fuerte y gruesa (Figura 3). Estos resultados podrían sugerir que la motilidad, otra característica importante en el género *Bacillus*, podría verse afectada en las cepas variantes.

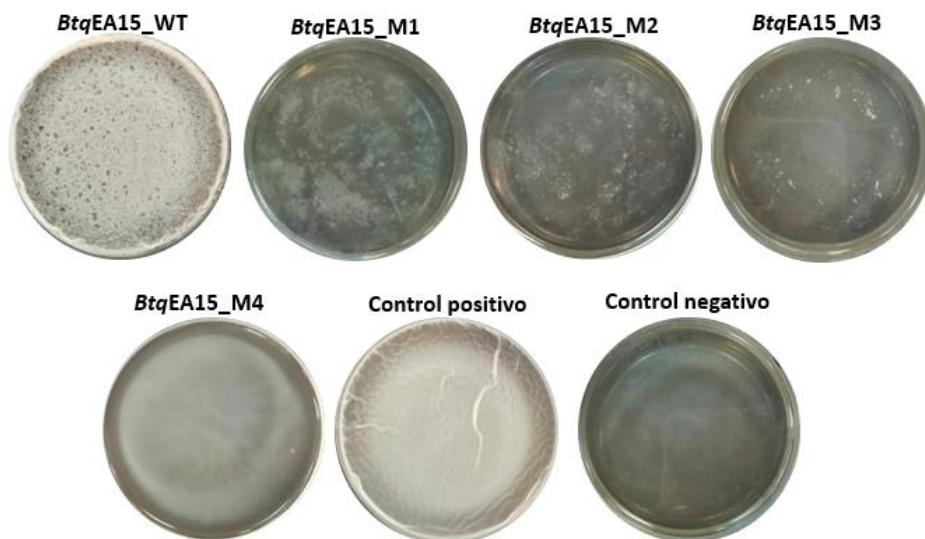


Figura 3. Imágenes de la formación de biopelícula en medio LBGM de las cepas variantes y la cepa *BtqEA15_WT* a las 24 horas de incubación a 37°C.

3.4. Evaluación de la motilidad Swarming y Swimming de la cepa *BtqEA15_WT* y sus variantes

Con el fin de evaluar posibles diferencias entre las variantes morfológicas y la cepa *BtqEA15_WT* en la característica multicelular de motilidad, se realizó un ensayo de swimming y swarming. Como se observa en la Tabla 1, para la motilidad swimming, que se define como un movimiento flagelar individual en medio líquido, lo cual se aseguró con la cantidad de 0.3% de agar agregada en el medio (Kearns, 2010), todas las cepas bacterianas presentaron un crecimiento en su motilidad desde la hora 0, siendo mucho mayor desde la hora 5. La variante *BtqEA15_M3* presentó diámetros de motilidad superior al resto de las variantes y a la cepa *BtqEA15_WT* durante todo el ensayo. El valor final del diámetro de motilidad alcanzado por *BtqEA15_M3* fue 32.13 ± 0.11 mm, mientras que las cepas *BtqEA15_WT*, *BtqEA15_M1*, *BtqEA15_M2* y *BtqEA15_M4* fueron aumentando su diámetro durante el transcurso del ensayo, logrando un tamaño final de 17.33 ± 0.09 mm, 23 ± 0.04 mm, 25.20 ± 0.05 mm y 17.07 ± 0.11 mm, respectivamente. Los resultados de swimming de todas las cepas bacterianas evaluadas, en cada

tiempo de medida, presentaron diferencias estadísticamente significativas, lo que sugiere que las variantes morfológicas han presentado alguna modificación en su característica de motilidad respecto a la cepa *BtqEA15_WT*.

Para swarming, motilidad destacada por ser grupal, flagelar y darse en medios sólidos (0.7% de agar), todas las cepas tuvieron crecimiento continuo, a excepción de la cepa *BtqEA15_M4* que no presentó ningún aumento en el diámetro de motilidad, permaneciendo en un valor constante de 5 mm durante todo el ensayo. En el caso de la cepa *BtqEA15_WT*, obtuvo un tamaño de diámetro final de 24.6 ± 0.04 mm, para la variante *BtqEA15_M2* su diámetro fue 1.3 veces mayor que la cepa *BtqEA15_WT* con 31.27 ± 0.03 mm y la variante *BtqEA15_M1* por su parte, logró un diámetro 1.2 veces mayor a la *BtqEA15_WT* con 29.53 ± 0.20 mm. Los resultados sugieren que todas las cepas presentan una motilidad swarming, a excepción de la cepa *BtqEA15_M4* cuyo tamaño fue casi igual a la inicial. Igualmente, las variantes morfológicas presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a la cepa *BtqEA15_WT*, en algunos tiempos de medida.

Finalmente, además de los diámetros alcanzados por las cepas bacterianas en el tiempo, también fue posible observar 28 horas después del montaje, diferencias en los patrones de forma de la motilidad tipo swarming entre las cepas. Mientras que para swimming, el patrón de forma de motilidad fue el mismo para todas las cepas pasadas las 28 horas. Para el caso de la cepa *BtqEA15_WT*, en su motilidad swarming presentó un patrón dendrítico, caracterizado por abarcar regiones largas y delgadas que se generan desde un punto central (Jose & Singh, 2020; Kearns, 2010). Las variantes *BtqEA15_M1* y *BtqEA15_M2*, formaron un tapete sin rasgos distintivos extendiéndose de manera continua y uniforme como una monocapa (Be'er & Ariel, 2019), mientras que la variante *BtqEA15_M3*, parece no tener un patrón específico. Finalmente, la variante *BtqEA15_M4* crece como una colonia limitada en el centro de la caja, este tipo de patrón lo exhiben aquellas bacterias que no generan la motilidad tipo swarming (Jose & Singh, 2020; Kearns, 2010). Estos patrones de motilidad tipo swarming, se pueden observar en la Figura 4.

Tabla 1. Evaluación de la motilidad tipo swimming y swarming ejercida por las variantes y la cepa *BtqEA15_WT*, haciendo mediciones del diámetro de motilidad en mm alcanzado en el tiempo.

Cepas ^a	Swimming (mm) ^b				Swarming (mm) ^c			
	2h	5h	7h	9h	3h	6h	8h	10h
<i>BtqEA15_WT</i>	5.4 ± 0.1 b	10.9 ± 0.0 ab	14.7 ± 0.1 ab	17.3 ± 0.1 b	8.9 ± 0.1 a	14.3 ± 0.1 a	19.8 ± 0.0 a	24.6 ± 0.0 ab
<i>BtqEA15_M1</i>	6.7 ± 0.1 b	9.9 ± 0.1 b	15.4 ± 0.1 ab	23.0 ± 0.0 ab	7.5 ± 0.1 ab	15.6 ± 0.1 a	21.7 ± 0.1 a	29.5 ± 0.2 a
<i>BtqEA15_M2</i>	6.8 ± 0.1 b	13.4 ± 0.0 ab	20.9 ± 0.1 a	25.2 ± 0.1 ab	7.4 ± 0.1 ab	16.5 ± 0.0 a	24.4 ± 0.0 a	31.3 ± 0.0 a
<i>BtqEA15_M3</i>	12.3 ± 0.1 a	14.7 ± 0.1 a	20.1 ± 0.1 ab	32.1 ± 0.1 a	9.1 ± 0.1 a	18.3 ± 0.1 a	28.0 ± 0.1 a	34.6 ± 0.10 a
<i>BtqEA15_M4</i>	4.9 ± 0.1 b	4.7 ± 0.1 c	12.9 ± 0.1 b	17.1 ± 0.1 b	4.8 ± 0.0 b	4.9 ± 0.0 b	5.0 ± 0.0 b	5 ± 0.00 b

^a Cepas en estudio *BtqEA15_WT* y sus cuatro variantes *BtqEA15_M1*, *BtqEA15_M2*, *BtqEA15_M3*, *BtqEA15_M4*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las variantes y la cepa *BtqEA15_WT* según la prueba de Tukey.

^b Swimming 2h: p-value= 2.37e – 0.5; 5h: p-value=0.000135; 7h: p-value= 0.0247; 9h: p-value=0.00234.

^c Swarming 3h: p-value=0.0283; 6h: p-value= 9.43e – 0.5; 8h: p-value=0.000129; 10h: p-value=0.00478.

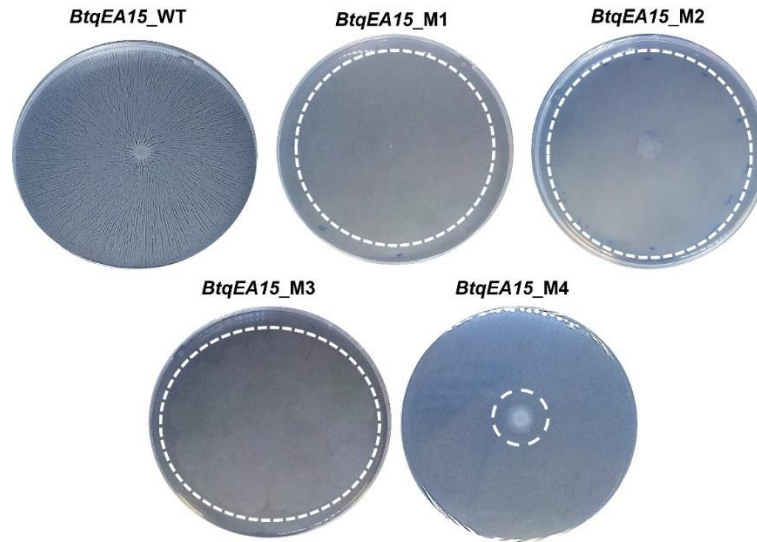


Figura 4. Patrones de la motilidad tipo swarming de las variantes y la cepa *BtqEA15_WT* en medio LB semisólido, a las 28 h de incubación a 30°C. Cepa *BtqEA15_WT* dendrítico, Cepa *BtqEA15_M1* monocapa, Cepa *BtqEA15_M2* monocapa, Cepa *BtqEA15_M3* sin patrón, Cepa *BtqEA15_M4*, no posee swarming.

3.5. Evaluación de la actividad antifúngica de las cepas bacterianas

Según evaluaciones realizadas previamente por Montoya-Giraldo, se observó que las variantes *BtqEA15_M1* y *BtqEA15_M2* tuvieron una reducción en su capacidad antifúngica. Por esta razón, y en vista que las evaluaciones de las características multicelulares realizadas en este proyecto han sugerido que las cepas variantes han presentado diferencias respecto a la cepa *BtqEA15_WT*, se llevó a cabo el ensayo de antagonismo para determinar si la actividad antifúngica de las cepas contra los hongos *C. acutatum* (Figura 5) y *F. oxysporum* (Figura 6) también se ha visto afectada. En general, las cepas variantes y la cepa *BtqEA15_WT* demostraron ser más eficientes para inhibir el crecimiento del hongo *C. acutatum* que *F. oxysporum*. La *BtqEA15_WT* fue la cepa que logró la mayor actividad antifúngica en ambos ensayos, siendo capaz de inhibir el crecimiento de *C. acutatum* casi en un 70% y a *F. oxysporum* en un 26%. Mientras que la cepa *BtqEA15_M3*, fue la que presentó menor capacidad de inhibición contra el crecimiento de los hongos evaluados, 18% y 9% contra *C. acutatum* y *F. oxysporum*, respectivamente. Todas las cepas variantes presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a la cepa *BtqEA15_WT*, lo que podría sugerir que en estas cepas los componentes responsables de la actividad antifúngica han reducido su eficiencia.

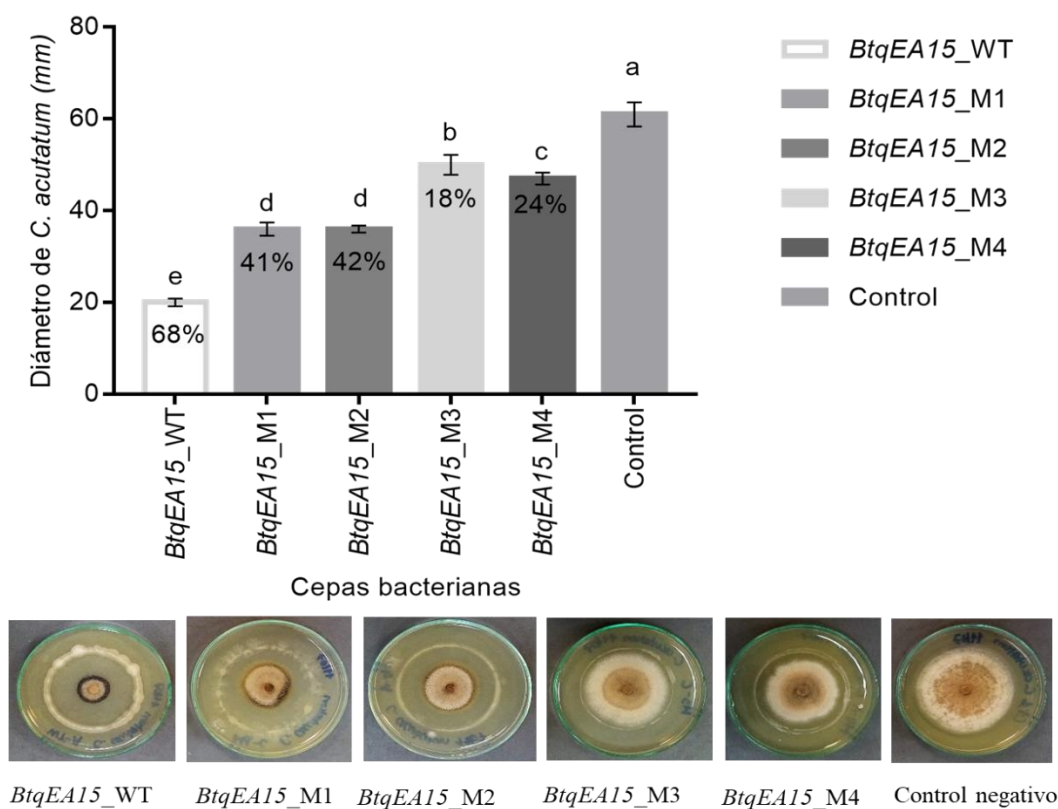


Figura 5. Actividad inhibitoria de las cepas bacterianas contra el crecimiento del hongo *C. acutatum*. Las fotografías de izquierda a derecha son *BtqEA15_WT*, *BtqEA15_M1*, *BtqEA15_M2*, *BtqEA15_M3*, *BtqEA15_M4* y el control. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas, valor-p: $1.49e - 11$. Los porcentajes de reducción del crecimiento del hongo *C. acutatum* con cada uno de los tratamientos están indicados en cada una de las barras.

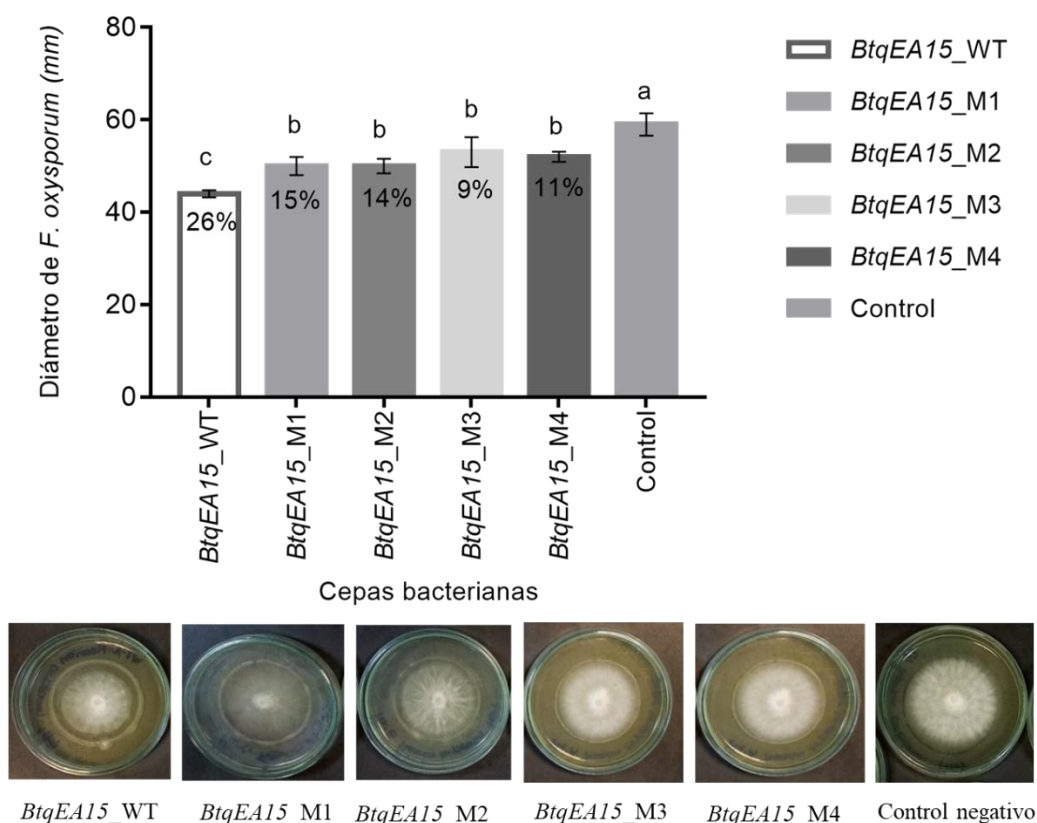


Figura 6. Actividad inhibitoria de las cepas bacterianas contra el crecimiento del hongo *F. oxysporum*. Las fotografías de izquierda a derecha son *BtqEA15_WT*, *BtqEA15_M1*, *BtqEA15_M2*, *BtqEA15_M3*, *BtqEA15_M4* y el control. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas, valor-p: $3.53e - 0.6$. Los porcentajes de reducción del crecimiento del hongo *F. oxysporum* con cada uno de los tratamientos están indicados en cada una de las barras.

4. Discusión

En este estudio se caracterizaron las variantes que emergen de la cepa *BtqEA15_WT*, una bacteria Gram positiva empleada como ingrediente activo de un biocontrolador contra la Sigatoka Negra, con el fin de determinar si dichas variantes presentaban diferencias fenotípicas entre ellas y respecto a la *BtqEA15_WT*. Inicialmente, encontramos que todas las variantes, nombradas como *BtqEA15_M1*, *BtqEA15_M2*, *BtqEA15_M3* y *BtqEA15_M4*, presentaron una morfología similar entre ellas, pero contraria a la descripción de colonia formada por la cepa *BtqEA15_WT*. A nivel de célula, todas las cepas presentaron una forma de bacilo y un tamaño similar, siendo todas Gram positivas, pero la única cepa variante que presentó esporas en el centro de la célula, al igual que la cepa ancestral, fue la *BtqEA15_M2*. Finalmente, observamos que, a nivel bioquímico las cepas variantes tuvieron una reducción en su capacidad de formación de biopelícula, en el porcentaje de esporulación, en la motilidad

y en la actividad antagónica, respecto a la cepa *BtqEA15_WT*. Estos resultados nos llevaron a identificar que existe una estrecha relación entre los rasgos bioquímicos que se dan en una bacteria con la morfología de la colonia que ella forma (Palkova, 2004), lo cual también pudo observarse en estudios similares reportados en la literatura, por ejemplo, Ambrico *et al.* (2019), investigó la cepa *Bacillus subtilis* ET-1, un microorganismo aislada del suelo y que forma colonias densas, rugosas con bordes ondulados y de la cual emergen dos morfotipos diferentes a dicha descripción. Estos dos morfotipos, clasificados como lisos (suaves, blanquecinas), y mucoide (viscosas, translúcidas, en forma de ameba), además de presentar una morfología diferente a su cepa ancestral, también mostraron una reducción en la producción del lipopéptido Iturina A y en el porcentaje de esporulación (Ambrico *et al.*, 2019). Así mismo, en la investigación hecha por Barreto *et al.* (2020), se identificó que después de 8 pases de la cepa *B. subtilis* BSP1 durante un ensayo de evolución artificial, se presentaron deficiencias en algunos de sus rasgos multicelulares como la motilidad, la formación de biopelícula, la esporulación y además presentó un cambio morfológico contundente (Barreto *et al.*, 2020). Ahmad *et al.*, (2019), por su parte, aislaron en un centro de salud dos morfotipos diferentes del patógeno Gram negativo *Acinetobacter baumannii*, uno opaco y otro traslúcido, descubriendo que el morfotipo opaco presentaba resistencia a los antibióticos, detergentes y desinfectantes, haciendo más difícil su control en estos espacios de la salud (Ahmad *et al.*, 2019). Es sabido que las bacterias, a pesar de ser organismos unicelulares, se comportan como multicelulares, es decir, ante señales externas del ambiente sus células inician una división de labores específicas y especializadas que conllevan a determinados procesos químicos, con el fin de alcanzar una adaptabilidad adecuada ante los ambientes cambiantes a los que está expuesta para competir con otros microorganismos presentes o con sus propias variantes genéticas y así sobrevivir (Kalamara *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2016; Palkova, 2004; West & Cooper, 2016; Zhang *et al.*, 2016). Esta división de labores es la razón por la cual se da la diferencia entre los rasgos bioquímicos, y por ende morfológicos, de las cepas bacterianas mencionadas anteriormente.

La biopelícula ha sido una de las estructuras multicelulares más estudiadas en diferentes especies bacterianas, especialmente en *Bacillus subtilis*, para comprender con mayor detalle cómo se da la división de labores de las células (Cairns *et al.*, 2014; Dergham *et al.*, 2021; Gingichashvili *et al.*, 2017; Mielich-Süss & Lopez, 2015; Tasaki *et al.*, 2017; van Vliet & Ackermann, 2015). Esta estructura organizada es formada en respuesta a algún estrés del ambiente detectado por la bacteria (Muhammad *et al.*, 2020), y se define como una población de células bacterianas adheridas a una superficie líquida o sólida que se mantienen unidas entre sí gracias a la matriz extracelular producida por ellas mismas (Vlamakis *et al.*, 2013). La formación de esta estructura multicelular comprende 5 momentos claves, el primero de ellos, reversible, es cuando las células pasan de motiles a sésiles y comienzan a adherirse a una superficie; el segundo momento se da cuando la adhesión de las células a la superficie ya no es reversible; en tercer lugar, las células productoras de matriz extracelular comienzan a

producir este componente para mantener las células unidas y por ende formar una estructura estable; seguido a esto, se da la maduración de la biopelícula momento en el que se comienzan a diferenciar las células que esporulan, las cuales se ubican en la parte aérea de la estructura para hacerla fuerte y darle protección a la comunidad celular; y por último, se desintegra la arquitectura cuando ya no es requerida por la bacteria (Muhammad *et al.*, 2020; Toyofuku *et al.*, 2016). Teniendo clara la correcta formación de esta estructura y observando la biopelícula formada por las cepas *BtqEA15_M1*, *BtqEA15_M2*, *BtqEA15_M3* y *BtqEA15_M4* evaluadas en este proyecto, podríamos sugerir que estas cepas han perdido, o reducido en una gran proporción, su capacidad de producir matriz extracelular, pues a pesar de verse algunas formaciones leves de biopelícula en algunas de las cepas, éstas se muestran disgregadas y muy débiles, indicando que las células no se encuentran unidas entre sí. Sin embargo, para verificar esta hipótesis, sería necesario llevar a cabo un ensayo en el laboratorio donde se cuantifique la producción de exopolisacáridos de cada cepa bacteriana, el cual es el componente principal de la matriz extracelular (Arnaouteli *et al.*, 2021). Adicionalmente, estos resultados podrían sugerir que, en la primera fase de la formación de biopelícula, donde se da la adhesión reversible, las fuerzas de repulsión de la superficie respecto a las células de las cepas variantes sea mayor que las fuerzas de adhesión, por lo cual las células no logren diferenciarse en células sésiles, y, por el contrario, sean en su gran mayoría células motiles (Toyofuku *et al.*, 2016). Finalmente, basado en el resultado de esporulación podríamos concluir que debido a que estas variantes han perdido su capacidad de esporulación, no podrían alcanzar a formar una biopelícula madura, como sí lo hace la cepa *BtqEA15_WT*.

En cuanto a la motilidad, tanto la cepa *BtqEA15_WT* como sus variantes mostraron tener un desplazamiento tipo swarming y swimming. Por un lado, todas las cepas bacterianas evaluadas tuvieron motilidad swimming, lo que nos sugiere que todas cuentan con flagelos y con un desplazamiento individual de las células, requerimientos indispensables para este tipo de motilidad (Ha *et al.*, 2014; Kearns, 2010). Por otra parte, todas las cepas a excepción de *BtqEA15_M4* presentaron motilidad swarming, cuyo desplazamiento y formación de patrones requiere de los flagelos en las células, aumento en la biosíntesis de flagelos, interacción célula-célula, concentración de tensoactivos, la potencia flagelar y condiciones del medio específicas (Be'er & Ariel, 2019; Kearns, 2010). En el caso de las cepas bacterianas *BtqEA15_M1* y *BtqEA15_M2*, presentaron patrones swarming que se visualiza como una monocapa o tapete uniforme en la superficie del agar (Be'er & Ariel, 2019). La variante *BtqEA15_M3*, por su parte, tuvo un tipo de swarming que parece no tener un patrón específico, caso similar observado en las cepas *Escherichia coli* y *Rhizobium etli* (Jose & Singh, 2020). Las dendritas o zarcillos, fue el patrón que exhibió la cepa *BtqEA15_WT*, característico por requerir la producción de muchos tensoactivos y formar líneas delgadas y alargadas que inician desde el punto central y se extienden en toda la superficie, como es el caso de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* (Kearns, 2010). Por último, la variante *BtqEA15_M4* no exhibió swarming por lo que tuvo el tamaño de la gota inicial (Kearns,

2010), lo que podría sugerir que las células de esta cepa bacteriana no se estén desplazando en grupo o que la cantidad de flagelas por célula, que debe ser mucho mayor a las requeridas en swimming, no sean las suficientes para generar la fuerza flagelar necesaria para este tipo de desplazamiento, condiciones que se deben cumplir para que las células puedan superar la tensión superficial del medio y logren moverse (Losick, 2020).

Otra forma en que las células pueden superar la tensión superficial del medio y desplazarse sobre él con movimiento swarming, es con la producción de tensoactivos, como la surfactina, un biosurfactante producido por *B. subtilis*, que como ya habíamos mencionado ha sido el modelo de estudio bacteriano para la evaluación de la multicelularidad (Rahman *et al.*, 2021). De igual manera, se ha concluido que la surfactina también es un componente importante en las estructuras de colonia y biopelícula construidas por las bacterias (Angelini *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2020; Pedraza *et al.*, 2020), y, además, en conjunto con las familias de los lipopéptidos de las fengicinas e iturinas, presenta propiedades indispensables en funciones de biocontrol (Arroyave-Toro *et al.*, 2017; T. Z. Cuellar-Gaviria *et al.*, 2021; Villegas-Escobar *et al.*, 2013). En estudios recientes, se identificó que la cepa *BtqEA15_WT* tiene la capacidad de producir estas tres familias de lipopéptidos que son indispensables para la actividad antifúngica que ha presentado esta cepa bacteriana (Arroyave-Toro *et al.*, 2017; T. Cuellar-Gaviria, 2021; Villegas-Escobar *et al.*, 2013), contrario a la cepa *BtqEA15_M1* donde se identificó que la producción de surfactina era muy reducida y la producción de fengicinas e iturinas era nula (T. Cuellar-Gaviria, 2021; Montoya Giraldo, 2020). Por este motivo, y observando los resultados obtenidos en el ensayo de antagonismo, sugerimos que tanto las cepas *BtqEA15_M2*, *BtqEA15_M3* y *BtqEA15_M4*, presentan una deficiencia en la producción de las familias de lipopéptidos, pues en las evaluaciones realizadas contra los hongos *C. acutatum* y *F. oxysporum*, mostraron una reducción en la actividad antagónica, similar a la observada con la cepa *BtqEA15_M1*, pero contraria a la lograda por *BtqEA15_WT*.

Finalmente, la división de labores de las células, como las evaluadas en este trabajo, es modulada por una red de señalización de genes donde predominan factores de transcripción principales que son específicos para cada especie bacteriana (Cardoso *et al.*, 2019; Verdugo-Fuentes *et al.*, 2020). Estos factores de transcripción, a su vez, son regulados por Quorum sensing, un mecanismo de comunicación bacteriana que a través de la unión de moléculas de señalización a receptores proteicos determinados lleva a cabo la regulación de algunos procesos celulares especializados (Gastélum *et al.*, 2020; Verdugo-Fuentes *et al.*, 2020). Recientemente, se ha investigado que el sistema Rap-Phr es el que regula los factores de transcripción en el género *Bacillus* spp. (Gastélum *et al.*, 2020; Liang *et al.*, 2020; Verdugo-Fuentes *et al.*, 2020), siendo las Rap los receptores intracelulares que inhiben la actividad de los factores de transcripción y los Phr los péptidos de señalización afines a los Rap, los cuales al llegar a una concentración determinada inhiben la función de su Rap correspondiente (Gallegos-Monterrosa *et al.*, 2021). Específicamente en *B. subtilis*, la especie modelo de

multicelularidad, la red de señalización cuenta con tres factores de transcripción principales que son Spo0A, ComA y DegU (Boguslawski *et al.*, 2015; Kalamara *et al.*, 2018), los cuales deben estar fosforilados para modular la señalización de genes específicos. El factor de transcripción Spo0A~P, regula la transcripción de los grupos de genes de la esporulación, la producción de matriz extracelular y la motilidad, a medida que su concentración celular va incrementando (Cairns *et al.*, 2014; Cardoso *et al.*, 2019; Kalamara *et al.*, 2018). Sin embargo, la transcripción de estos grupos de genes es intervenida por los receptores proteicos Rap A, B, E, I, J, H y 60, los cuales desfosforilan la enzima fosfotransferasa Spo0F, que es la encargada de transferir el fosfato a Spo0B y por consiguiente a Spo0A (Barreto *et al.*, 2020; Gallegos-Monterrosa *et al.*, 2021; Liang *et al.*, 2020). El conjunto de receptores Rap, la afinidad de éstos con Spo0F y los péptidos de señalización regulan la concentración de Spo0A~P y, por ende, los genes que se activan o reprimen (Verdugo-Fuentes *et al.*, 2020). El factor de transcripción ComA~P, modula la expresión de genes de competencia, producción de surfactina e intermediario para la síntesis de Iturina y Plipastatina, y la fosforilación de DegU, el factor de transcripción que regula los genes de biosíntesis de flagelos y autólisis (Barreto *et al.*, 2020; Cairns *et al.*, 2014). La fosforilación de ComA, es inhibida por los receptores Rap C, D, F, H, K y 60 (Verdugo-Fuentes *et al.*, 2020). Los Rap H y 60, intervienen en la regulación de la fosforilación de Spo0A y de ComA, creando así una conexión entre los grupos de genes modulados por ambos factores de transcripción (Boguslawski *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2020). Por esta razón, hipotetizamos que la reducción en la formación de biopelícula, esporulación, antagonismo y motilidad en las cepas variantes estudiadas en este proyecto, presentan alguna mutación o cambio en la expresión de los genes de esta cascada de señalización genética.

5. Conclusiones

A partir de los ensayos y evaluaciones realizadas en este proyecto de investigación, se identificó que las colonias de las cuatro variantes de la cepa *Bacillus tequilensis* EA-CB0015 presentaron características morfológicas comunes entre ellas, pero que difieren con las características que presentaron las colonias formadas por *BtqEA15_WT*. Se podría hipotetizar que el cambio en la morfología de la colonia esté relacionado con la reducción en las características observadas en las cepas variantes, que son la esporulación, la biopelícula, el antagonismo y los contrastes en la motilidad.

Estas diferencias observadas en las cepas variantes respecto a la silvestre, podría deberse a que las cepas variantes presentaron mutaciones en genes o que se presente alguna modificación en la expresión de genes que intervienen en las funciones multicelulares evaluadas en este trabajo. Finalmente, se podría sugerir que estos cambios fenotípicos se den por un proceso de domesticación que esté experimentando la cepa *BtqEA15_WT*, bajo las condiciones permanentes del laboratorio.

Agradecimientos

Los agradecimientos van dirigidos a la Universidad EAFIT por el acompañamiento en mi desarrollo como profesional, a mi asesora Yessica Alejandra Montoya Giraldo, por toda la entrega, paciencia, dedicación, apoyo y comprensión durante este proceso de formación, a la profesora Valeska por permitirme realizar mi proyecto de grado en este tema en específico, a los profesores del pregrado de biología, a los técnicos de laboratorio por su gran acompañamiento y labor, a mis amigos y compañeros de laboratorio que hicieron parte de este recorrido y a mi familia por su apoyo incondicional.

Referencias

- Ahmad, I., Karah, N., Nadeem, A., Wai, S. N., & Uhlin, B. E. (2019). Analysis of colony phase variation switch in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *PLoS ONE*, 14(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210082>
- Ambrico, A., Trupo, M., & Magarelli, R. A. (2019). Influence of Phenotypic Dissociation in *Bacillus subtilis* Strain ET-1 on Iturin A Production. *Current Microbiology*, 76(12), 1487–1494. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01764-y>
- Angelini, T. E., Roper, M., Kolter, R., Weitz, D. A., & Brenner, M. P. (2009). *Bacillus subtilis* spreads by surfing on waves of surfactant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(43), 18109–18113. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905890106>
- Arnauteli, S., Bamford, N. C., Stanley-Wall, N. R., & Kovács, Á. T. (2021). *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 19, Issue 9, pp. 600–614). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00540-9>
- Arroyave-Toro, J. J., Mosquera, S., & Villegas-Escobar, V. (2017). Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens. *Biological Control*, 114, 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.014>
- Barreto, H. C., Cordeiro, T. N., Henriques, A. O., & Gordo, I. (2020). Rampant loss of social traits during domestication of a *Bacillus subtilis* natural isolate. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76017-1>
- Batson, H. C. (1934). *Dissociation and Life Cycle of Bacillus Subtilis*. <https://openprairie.sdstate.edu/etd>
- Be'er, A., & Ariel, G. (2019). A statistical physics view of swarming bacteria. In *Movement Ecology* (Vol. 7, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40462-019-0153-9>

- Berditsch, M., Afonin, S., & Ulrich, A. S. (2007). The ability of *Aneunnibacillus migulanus* (*Bacillus brevis*) to produce the antibiotic gramicidin S is correlated with phenotype variation. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20), 6620–6628. <https://doi.org/10.1128/AEM.00881-07>
- Boguslawski, K. M., Hill, P. A., & Griffith, K. L. (2015). Novel mechanisms of controlling the activities of the transcription factors Spo0A and ComA by the plasmid-encoded quorum sensing regulators Rap60-Phr60 in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 96(2), 325–348. <https://doi.org/10.1111/mmi.12939>
- Cairns, L. S., Hobley, L., & Stanley-Wall, N. R. (2014). Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: New insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. In *Molecular Microbiology* (Vol. 93, Issue 4, pp. 587–598). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/mmi.12697>
- Cardoso, P. de F., Perchat, S., Vilas-Boas, L. A., Lereclus, D., & Vilas-Bôas, G. T. (2019). Diversity of the Rap–Phr quorum-sensing systems in the *Bacillus cereus* group. *Current Genetics*, 65(6), 1367–1381. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-00993-9>
- Cayrou, C., Barratt, N. A., Ketley, J. M., & Bayliss, C. D. (2021). Phase Variation During Host Colonization and Invasion by *Campylobacter jejuni* and Other *Campylobacter* Species. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.705139>
- Ceballos, I., Mosquera, S., Angulo, M., Mira, J. J., Argel, L. E., Uribe-Velez, D., Romero-Tabarez, M., Orduz-Peralta, S., & Villegas, V. (2012). Cultivable Bacteria Populations Associated with Leaves of Banana and Plantain Plants and Their Antagonistic Activity Against *Mycosphaerella fijiensis*. *Microbiology Ecology*, 64, 642–653. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0052-8>
- Chen, B., Wen, J., Zhao, X., Ding, J., & Qi, G. (2020). Surfactin: A Quorum-Sensing Signal Molecule to Relieve CCR in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00631>
- Cuellar-Gaviria, T. (2021). *The Unrestrained Loss of Social Traits of Bacillus tequilensis EA-CB0015 Compromises its Success as a Biological Control Agent*.
- Cuellar-Gaviria, T. Z., González-Jaramillo, L. M., & Villegas-Escobar, V. (2021). Role of *Bacillus tequilensis* EA-CB0015 cells and lipopeptides in the biological control of black Sigatoka disease. *Biological Control*, 155. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104523>
- Dergham, Y., Sanchez-Vizueté, P., Coq, D. le, Deschamps, J., Bridier, A., Hamze, K., & Briandet, R. (2021). Comparison of the genetic features involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation using multi-culturing approaches. *Microorganisms*, 9(3), 1–17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030633>

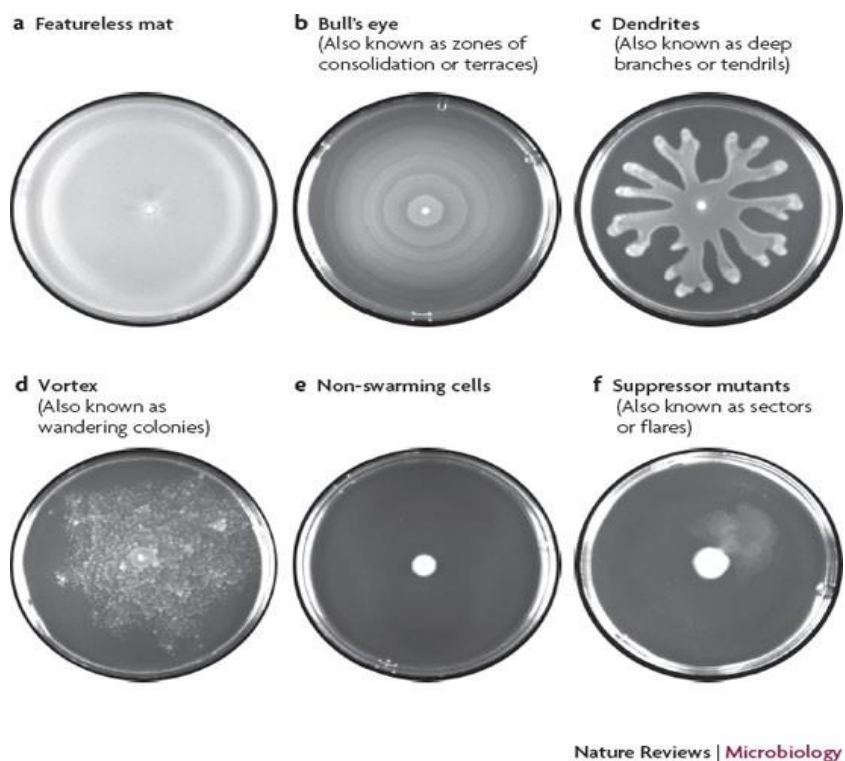
- Gallegos-Monterrosa, R., Christensen, M. N., Barchewitz, T., Koppenhöfer, S., Priyadarshini, B., Bálint, B., Maróti, G., Kempen, P. J., Dragoš, A., & Kovács, Á. T. (2021). Impact of Rap-Phr system abundance on adaptation of *Bacillus subtilis*. *Communications Biology*, 4(468). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01983-9>
- Gastélum, G., de La Torre, M., & Rocha, J. (2020). Rap protein paralogs of *Bacillus thuringiensis*: A multifunctional and redundant regulatory repertoire for the control of collective functions. *Journal of Bacteriology*, 202(6). <https://doi.org/10.1128/JB.00747-19>
- Ghelardi, E., Salvetti, S., Ceragioli, M., Gueye, S. A., Celandroni, F., & Senesi, S. (2012). Contribution of Surfactin and SwrA to Flagellin Expression, Swimming, and Surface Motility in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6540–6544. <https://doi.org/10.1128/AEM.01341-12>
- Gingichashvili, S., Duanis-Assaf, D., Shemesh, M., Featherstone, J. D. B., Feuerstein, O., & Steinberg, D. (2017). *Bacillus subtilis* Biofilm development - a computerized study of morphology and kinetics. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02072>
- Goldberg, A., Fridman, O., Ronin, I., & Balaban, N. Q. (2014). Systematic identification and quantification of phase variation in commensal and pathogenic *Escherichia coli*. *Genome Medicine*, 6(11). <https://doi.org/10.1186/s13073-014-0112-4>
- Gutierrez-Monsalve, J. A., Mosquera, S., González-Jaramillo, L. M., Mira, J. J., & Villegas-Escobar, V. (2015). Effective control of black Sigatoka disease using a microbial fungicide based on *Bacillus subtilis* EA-CB0015 culture. *Biological Control*, 87, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.012>
- Ha, D. G., Kuchma, S. L., & O'Toole, G. A. (2014). Plate-Based assay for swimming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods in Molecular Biology*, 1149, 59–65. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_7
- Jiang, L., Jia, G., Wang, Y., & Li, Z. (2020). Optimization of Sporulation and Germination Conditions of Functional Bacteria for Concrete Crack-Healing and Evaluation of their Repair Capacity. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 12(9), 10938–10948. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b21465>
- Jose, R., & Singh, V. (2020). Swarming in Bacteria: A Tale of Plasticity in Motility Behavior. *Journal of the Indian Institute of Science*, 100, 515–524. <https://doi.org/10.1007/s41745-020-00177-2>
- Kalamara, M., Spacapan, M., Mandic-Mulec, I., & Stanley-Wall, N. R. (2018). Social behaviours by *Bacillus subtilis*: quorum sensing, kin discrimination and beyond. In *Molecular Microbiology* (Vol. 110, Issue 6, pp. 863–878). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/mmi.14127>

- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 634–644. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>
- Kearns, D. B., & Losick, R. (2003). Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 49(3), 581–590. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03584.x>
- Kim, W., Levy, S. B., & Foster, K. R. (2016). Rapid radiation in bacteria leads to a division of labour. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms10508>
- Lee, Y., Kim, Y. S., Balaraju, K., Seo, Y. S., Park, J., Ryu, C. M., Park, S. H., Kim, J. F., Kang, S., & Jeon, Y. (2020). Molecular changes associated with spontaneous phenotypic variation of *Paenibacillus polymyxa*, a commonly used biocontrol agent, and temperature-dependent control of variation. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73716-7>
- Li, D., Rothballer, M., Engel, M., Hoser, J., Schmidt, T., Kuttler, C., Schmid, M., Schlöter, M., & Hartmann, A. (2012). Phenotypic variation in *Acidovorax radialis* N35 influences plant growth promotion. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(3), 751–762. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01259.x>
- Liang, Z., Qiao, J. Q., Li, P. P., Zhang, L. L., Qiao, Z. X., Lin, L., Yu, C. J., Yang, Y., Zubair, M., Gu, Q., Wu, H. J., Borriss, R., & Gao, X. W. (2020). A novel Rap-Phr system in *Bacillus velezensis* NAU-B3 regulates surfactin production and sporulation via interaction with ComA. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(23), 10059–10074. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10942-z>
- Losick, R. M. (2020). *Bacillus subtilis*: a bacterium for all seasons. *Current Biology*, 30(19), R1146–R1150. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-27656/v1>
- Malone, J. G. (2015). Role of small colony variants in persistence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis lungs. In *Infection and Drug Resistance* (Vol. 8, pp. 237–247). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IDR.S68214>
- Mielich-Süss, B., & Lopez, D. (2015). Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation. *Environmental Microbiology*, 17(3), 555–565. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12527>
- Montoya Giraldo, Y. A. (2020). *Phenotypical characterization of spontaneous morphological variants of Bacillus sp. strains*. https://docs.google.com/viewerng/viewer?url=https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/17105/YessicaAlejandra_MontoyaGiraldo_2020.pdf?sequence%3D5&isAllowed=y
- Mosquera, S., González-Jaramillo, L. M., Orduz, S., & Villegas-Escobar, V. (2014). Multiple response optimization of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 culture and identification of antifungal metabolites. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.09.004>

- Muhammad, M. H., Idris, A. L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., Qiu, J., Guan, X., & Huang, T. (2020). Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00928>
- Palkova, Z. (2004). Multicellular microorganisms: Laboratory versus nature. In *EMBO Reports* (Vol. 5, Issue 5, pp. 470–476). <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400145>
- Pedraza, L. A., López, C. E., & Uribe-Vélez, D. (2020). Mechanisms of action of *Bacillus* spp. (bacillaceae) against phytopathogenic microorganisms during their interaction with plants. In *Acta Biologica Colombiana* (Vol. 25, Issue 1, pp. 112–125). Universidad Nacional de Colombia. <https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.75045>
- Phillips, Z. N., Husna, A. U., Jennings, M. P., Seib, K. L., & Attack, J. M. (2019). Phasevarions of bacterial pathogens-phase-variable epigenetic regulators evolving from restriction-modification systems. In *Microbiology (United Kingdom)* (Vol. 165, Issue 9, pp. 917–928). Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000805>
- Rahman, F. bin, Sarkar, B., Moni, R., & Rahman, M. S. (2021). Molecular Genetics of Surfactin and Its Effects on Different Sub-populations of *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Reports*, e00686. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00686>
- Shemesh, M., & Chaia, Y. (2013). A combination of glycerol and manganese promotes biofilm formation in *Bacillus subtilis* via histidine kinase KinD signaling. *Journal of Bacteriology*, 195(12), 2747–2754. <https://doi.org/10.1128/JB.00028-13>
- Tasaki, S., Nakayama, M., & Shoji, W. (2017). Morphologies of *Bacillus subtilis* communities responding to environmental variation. In *Development Growth and Differentiation* (Vol. 59, Issue 5, pp. 369–378). Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1111/dgd.12383>
- Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., & Nomura, N. (2016). Environmental factors that shape biofilm formation. In *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* (Vol. 80, Issue 1, pp. 7–12). Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1058701>
- van Teeseling, M. C. F., de Pedro, M. A., & Cava, F. (2017). Determinants of bacterial morphology: From fundamentals to possibilities for antimicrobial targeting. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue JUL). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01264>
- van Vliet, S., & Ackermann, M. (2015). Bacterial ventures into multicellularity: Collectivism through individuality. *PLoS Biology*, 13(6), 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002162>
- Verdugo-Fuentes, A., Gastélum, G., Rocha, J., & de la Torre, M. (2020). Multiple and overlapping functions of quorum sensing proteins for cell specialization in *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology*, 202(10). <https://doi.org/10.1128/JB.00721-19>

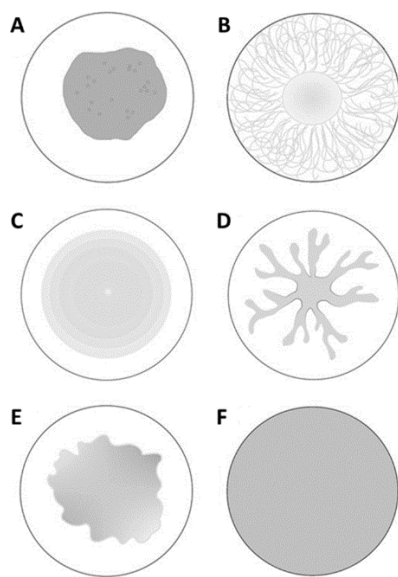
- Villegas-Escobar, V., Ceballos, I., Mira, J. J., Argel, L. E., Orduz Peralta, S., & Romero-Tabarez, M. (2013). Fengycin C produced by *Bacillus subtilis* EA-CB0015. *Journal of Natural Products*, 76(4), 503–509. <https://doi.org/10.1021/np300574v>
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beauregard, P., Losick, R., & Kolter, R. (2013). Sticking together: Building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 11, Issue 3, pp. 157–168). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2960>
- West, S. A., & Cooper, G. A. (2016). Division of labour in microorganisms: An evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology*, 14(11), 716–723. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.111>
- Wisniewski-Dyé, F., & Vial, L. (2008). Phase and antigenic variation mediated by genome modifications. In *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* (Vol. 94, Issue 4, pp. 493–515). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9267-6>
- Zapata Henao, S. (2019). *Desarrollo de estrategias de control del fitopatógeno Fusarium oxysporum f. sp. cubense (Foc) a partir de la diversidad microbiana*.
- Zhang, Z., Claessen, D., & Rozen, D. E. (2016). Understanding microbial divisions of labor. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue DEC). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02070>

Anexos



(Kearns, 2010)

Figura 1. Ejemplos de patrones de enjambre vistos en la naturaleza. Patrones enjambre, **a** Sin rasgos, monocapa: *Bacillus subtilis* 3610, **b** Ojo de buey: *Proteus mirabilis*, **c** Dendrítico: *Pseudomonas aeruginosa* PA14, **d** Vortex: *Paenibacillus vortex* V, **e** Mutante que no forma enjambre, **f** Supresor posterior en *Bacillus subtilis* 3610. Estos patrones observados por (Kearns, 2010) contribuyeron a la descripción de los patrones de motilidad tipo swarming presentados por las variantes y la cepa *BtqEA15_WT* en este proyecto.



(Jose & Singh, 2020)

Figura 2. Ejemplos de patrones de enjambre vistos en la naturaleza. Patrones enjambre de **a** *Escherichia coli*, **b** *Dendritiformis Paenibacillus*, **c** *Proteus mirabilis*, **d** *Pseudomonas aeruginosa*, **e** *Rhizobium etli*, **f** *Bacillus subtilis* (Jose & Singh, 2020) Estos patrones observados ayudaron a la descripción de los patrones de motilidad tipo swarming presentados por las variantes y la cepa *BtqEA15_WT*.