



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD IZTAPALAPA**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TESIS**

**“ESTUDIO FISIOLÓGICO Y GENÓMICO DE DOS CEPAS DEL  
GÉNERO *BACILLUS*, AISLADAS DE LA MICROBIOTA HUMANA”**

Para obtener el grado de  
**DOCTOR(A) EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

**M. en Biotecnología José Luis Reyes Cortes**

**Matricula: 2171801042**

Director(a):

**Dra. Edith Ponce Alquicira**

Asesores

**Dr. Alejandro Azaola Espinosa**

**Dr. Luis Fernando Lozano Aguirre Beltrán**

Ciudad de México a 2 de septiembre, 2022

**“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”**

Ciudad de México a 2 de septiembre, 2022.

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**“ESTUDIO FISIOLÓGICO Y GENÓMICO DE DOS CEPAS DEL GÉNERO BACILLUS,  
AISLADAS DE LA MICROBIOTA HUMANA”**

que presentó

**Maestro en Biotecnología José Luis Reyes Cortes**

**Comité Tutorial:**

Director: Dra. Edith Ponce Alquicira

Asesor: Dr. Alejandro Azaola-Espinosa

Asesor: Dr. Luis Fernando Lozano Aguirre Beltrán

**Jurado:**

Presidente: Dr. Alejandro Azaola Espinosa

\_\_\_\_\_

Secretario: Dr. Julio Cesar Almanza Pérez

\_\_\_\_\_

Vocal: Dr. Luis Fernando Lozano Aguirre Beltrán

\_\_\_\_\_

Vocal: Dr. Rogelio Valadez Blanco

\_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma Metropolitana por darme la oportunidad de pertenecer a esta gran casa de estudios, por prestar las instalaciones para desarrollar mi proyecto de investigación.

A la Dra. Edith Ponce Alquicira, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, los conocimientos transmitidos, por guiarme en la preparación de esta etapa profesional, sobre todo por su apoyo incondicional. Gracias por dejarme re-incorporar al grupo, gracias por darme otra oportunidad, llegue como el hijo prodigo y usted me extendió su mano. Le deseo lo mejor, bendiciones y mucha felicidad.

Al Dr. Alejandro Azaola Espinosa, por proporcionarme las cepas de este estudio, por su atención y apoyo en la orientación de mi proyecto y por el apoyo en la escritura del artículo.

Al Dr. Luis Fernando Lozano Aguirre Beltrán, por darme la oportunidad de realizar el análisis de los datos generados en este proyecto (Centro de Ciencias Genómicas, UNAM), por su atención y apoyo en la interpretación de resultados.

Al Dr. Rogelio Valadez Blanco, gracias por su buena disposición, tiempo y sus comentarios.

A todo el grupo de trabajo del laboratorio W-207 (Jessica, Yessica, Adriana, Monserrat, Carmen y Arquímedes), compañeros, amigos, colegas, gracias por todo el conocimiento transmitido.

A mi mamá, quien sin pensarlo y con muchas adversidades logro apoyarme para ser quien hoy en día soy, a ella le debo todo.

A mi hermana Karol, mi niña que llego para darle alegría a mi vida, quien a pesar de ser más pequeña me ha enseñado mucho acerca de la vida, llegaste para cambiar mi vida, para madurar y entender lo que es el amor incondicional de otro ser humano, veo lo importante que eres para mí y lo importante que soy para ti, hare lo mejor para verte crecer como una persona con valores, principios y sobre todo un ser humano noble y feliz. Gracias por todo hermanita!

## ABSTRACT

The microbial community or microbiota of the gastrointestinal tract (GIT) comprises more than 400 different species of bacteria, including 100 billion bacteria that maintain a symbiotic relationship with bidirectional benefits for humans, participating in functions of nutrition and metabolism, protection against the invasion of pathogenic microorganisms, in addition to the modulation of the immune system, among others. Recently, the presence of strains of the *Bacillus* genus isolated from the GIT has drawn attention, since their presence and possible interrelationship as part of the intestinal microbiota (IM) has been demonstrated. In this work, the sequencing and functional annotation of the genome of two strains of the genus *Bacillus* was carried out. The *B. pumilus* strain (BP-UAMX) isolated from the IM of obese individuals, which presented genomes with a size of 3.8 Mb, a GC content of 42%, 3,192 CDS, 24 rRNA and 81 tRNA. In addition, a *B. cereus* strain (BC-UAMX) isolated from the IM of lean individuals presented a 6.1Mb genome, a GC content of 34.95%, identifying 6,094 CDS, 42 rRNA and 106 tRNA.

Likewise, the pan-genome was obtained for both strains, being probably closed for BP-UAMX and open for BC-UAMX. In both microorganisms, the highest percentage of genes is associated with general functions, the metabolism of amino acids and carbohydrates. Although, the presence of genes related to resistance to beta-lactam antibiotics and vancomycin was found. On the other hand, the growth of the strains under different carbon sources was evaluated, finding a greater growth of BP-UAMX in simple carbon sources such as glucose and growth in the presence of tributyrin. In contrast, BC-UAMX showed higher growth, particularly in complex sources such as starch and carboxymethylcellulose, but did not grow in the presence of tributyrin.

Both BP-UAMX and BC-UAMX strains, isolated from the gastrointestinal tract of overweight and lean people, respectively, showed an adaptability to simulated GIT conditions, indicating that this strain of both strains could survive in the intestine. These findings reinforce the hypothesis that members of the Bacilli could be members of the colonizing microbiota of the GIT. Growth kinetics, protein profiling,

gene clustering, and metabolic pathway prediction data revealed that both study strains could metabolize alternative carbon sources, such as starch, CMC, and lipids, which could be of great importance in the study of the GIT microbiota, which may be related to the effects of high-fat diets in the case of BP-UAMX, since the production of monosaccharides and short-chain fatty acids (SCFA) derived from metabolism of the TGI microbiota can provide additional energy to the host. In addition, the host has benefits such as appetite control and body mass, provided by butyric acid. For its part, the best adaptation to growth in complex carbon sources by BC-UAMX, may be due to the diet rich in fiber, for which they presented metabolic pathways related to the metabolism of said sources.

This study represented a first approach to understanding the physiology of the BP-UAMX and BC-UAMX strains. Although the purpose of this study was to evaluate the resistance of both strains to simulated gastric conditions, genomic sequencing and bioinformatic analysis revealed alternative metabolic pathways where further study is required.

## RESUMEN

La comunidad microbiana o microbiota del tracto gastrointestinal (TGI) comprende más de 400 especies distintas de bacterias, dentro de ellas 100 billones de bacterias que mantienen una relación simbiótica con beneficios bidireccionales para el ser humano, participando en funciones de nutrición y metabolismo, protección a la invasión de microorganismos patógenos, además de la modulación del sistema inmunológico, entre otros. Recientemente ha llamado la atención la presencia de cepas del género *Bacillus* aisladas del TGI, debido a que se ha demostrado su presencia y posible interrelación como parte de la microbiota intestinal (MI). En este trabajo se realizó la secuenciación y anotación funcional del genoma de dos cepas del género *Bacillus*. La cepa de *B. pumilus* (BP-UAMX) aislada a partir de la MI de individuos obesos, que presentó genomas con un tamaño de 3.8 Mb, un contenido GC 42%, 3,192 CDS, 24 ARNr y 81 ARNt. Además, de una cepa de *B. cereus* (BC-UAMX) aislada a partir de la MI de individuos delgados que presentó un genoma de 6.1Mb, un contenido de GC de 34.95 %, identificándose 6,094 CDS, 42 ARNr y 106 ARNt.

Asimismo, se obtuvo el pangenoma para ambas cepas, siendo probablemente cerrado para BP-UAMX y abierto para BC-UAMX. En ambos microorganismos el mayor porcentaje de genes está asociado a funciones generales, al metabolismo de aminoácidos y de carbohidratos. Aunque, se encontró la presencia de genes relacionados a la resistencia a antibióticos betalactámicos y vancomicina. Por otra parte, se evaluó el crecimiento de las cepas bajo diferentes fuentes de carbono, encontrando un mayor crecimiento de BP-UAMX en fuentes de carbono simples como la glucosa y desarrollo en presencia de tributirina. En contraste BC-UAMX presentó un mayor crecimiento particularmente en fuentes complejas como almidón y carboximetilcelulosa pero no creció en presencia de tributirina.

Ambas cepas BP-UAMX y BC-UAMX, aisladas del tracto gastrointestinal de personas con sobrepeso y delgados respectivamente mostraron una adaptabilidad a condiciones TGI simuladas, lo que indica que esta cepa de ambas cepas podría

sobrevivir en el intestino. Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que miembros de los Bacilos podrían ser miembros de la microbiota colonizadora del TGI. Los datos de la cinética de crecimiento, el perfil de proteínas, la agrupación de genes y la predicción de la ruta metabólica revelaron que ambas cepas de estudio podrían metabolizar fuentes de carbono alternativas, como el almidón, la CMC y los lípidos, que podrían ser de gran importancia en el estudio de la microbiota TGI lo que puede estar relacionado con los efectos de las dietas ricas en grasas en el caso de BP-UAMX, ya que la producción de monosacáridos y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) derivados del metabolismo de la microbiota TGI puede proporcionar energía adicional al huésped. Además, el huésped tiene beneficios como el control del apetito y de la masa corporal, que proporciona el ácido butírico. Por su parte la mejor adaptación al crecimiento en fuentes de carbono complejas por parte de BC-UAMX, se puede deber a la dieta rica en fibra, por lo cual presentaron rutas metabólicas relacionadas al metabolismo de dichas fuentes.

Este estudio representó un primer acercamiento a la comprensión de la fisiología de las cepas BP- UAMX y BC-UAMX. Aunque el propósito de este estudio fue evaluar la resistencia de ambas cepas a condiciones gástricas simuladas, la secuenciación genómica y el análisis bioinformático revelaron vías metabólicas alternativas en las que se requieren más estudios.

# INDICE

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>6</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>8</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 El tracto gastrointestinal humano (TGI) .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1.1 Microbiota intestinal y su función en el huésped .....</b>	<b>15</b>
1.1.2 Funciones metabólicas .....	16
1.1.3 Funciones tróficas .....	17
1.1.4 Funciones de defensa .....	18
<b>1.2. Género <i>Bacillus</i> en TIG .....</b>	<b>19</b>
<b>1.3 Uso de ciencias ómicas y su posible uso como respuesta a la función de <i>Bacillus</i> en TGI</b>	<b>22</b>
<b>1.3.1 Secuenciación de genomas .....</b>	<b>23</b>
<b>1.3.2 Características generales de las tecnologías NGS .....</b>	<b>24</b>
<b>1.3.3 Tecnología PacBio .....</b>	<b>25</b>
<b>1.3.4 Genómica comparativa .....</b>	<b>26</b>
1.3.4.1 Pangenoma .....	26
1.3.4.2 Genes centrales y prescindibles .....	27
1.3.5 Proteómica .....	28
1.3.5.1 Analizador de masas Orbitrap .....	31
<b>2. Justificación e Hipótesis .....</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Justificación .....</b>	<b>33</b>
<b>2.2 Hipótesis .....</b>	<b>35</b>
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Objetivo general .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>35</b>
<b>4. METODOLOGÍA .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 Propagación de cepas de estudio .....</b>	<b>38</b>
<b>4.2 Evaluación de resistencia en condiciones simuladas in vitro similares a las</b>	<b>38</b>
<b>gastrointestinales .....</b>	<b>38</b>
4.2.1 Estimación de parámetros cinéticos .....	38
4.2.2 Cinética de crecimiento en diferentes fuentes de carbono .....	40
<b>4.3 Obtención de proteínas totales solubles. ....</b>	<b>40</b>
4.3.1 Identificación de proteínas por espectrometría de masas .....	41

<i>Digestión en gel</i> .....	41
4.3.2 Análisis nano LC-MS / MS.....	41
4.3.3 Análisis e interpretación de datos proteómicos .....	43
<b>4.4 Secuenciación, ensamble y anotación total del genoma .....</b>	<b>43</b>
<b>4.5 Agrupación de genes por función (COG) y predicción de rutas metabólicas. ....</b>	<b>44</b>
<b>4.6 Obtención del pangenoma .....</b>	<b>44</b>
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>45</b>
5.1 Resistencia a sales biliares y pH ácido.....	45
5.2 Cinéticas de crecimiento con diferentes fuentes de carbono .....	49
5.3 Perfiles de proteínas .....	54
5.3.1 Identificación de proteínas.....	55
5.4 Secuenciación de genoma .....	60
5.4.1 Ensamble de genomas.....	61
5.5 Número de acceso GenBank para las cepas de estudio .....	63
5.5.1 Identificación filogenómica de las cepas.....	64
5.6 Pangenoma .....	67
5.7 Agrupación de genes por función (COG) .....	68
5.8 Predicción de rutas metabólicas.....	70
5.9 Identificación de genes de resistencia a antibióticos .....	73
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>74</b>
<b>7. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>75</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>76</b>

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 El tracto gastrointestinal humano (TGI)**

El tracto gastrointestinal humano comprende una serie de órganos que se encuentran unidos y son responsables de digerir y absorber nutrientes, así como de eliminar los restos no digeribles de los alimentos, además de producir hormonas y vitaminas, además de eliminar sustancias tóxicas. El TGI incluye la boca, faringe, esófago, estómago, intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon), intestino grueso (ciego y colon ascendente, colon transverso, colon descendente y colon sigmoide), el recto y el ano; otros órganos como el páncreas, el hígado y la vesícula biliar están ligados a la función de TGI. Se ha reconocido que existe una fuerte influencia entre la función del TGI a través del llamado “eje cerebro-intestinal”, que involucra no solo la absorción de nutrientes, sino también la regulación del sistema inmunitario y en general el bienestar físico y psicológico del organismo (Ruiz, 2019).

El interior del TGI, con una superficie de 200 a 300 m<sup>2</sup> está cubierto por una superficie mucosa conformada por inmunoglobulinas, citocinas, receptores, moléculas de contacto, linfocitos, células estructurales y epiteliales, entre otros elementos. La mucosa intestinal actúa como barrera o interfase entre el ambiente interno y externo, además permite la digestión y absorción de nutrientes, libera hormonas al tejido conectivo en respuesta a cambios en el ambiente exterior y obstaculiza el ingreso de agentes infecciosos, brindando así protección inmunológica (Zaldívar Ochoa, 2002). La mucosa también está colonizada con un gran número de microorganismos que constituyen la MI con más de 10 billones de bacterias de 1,500 distintas especies, aunque aún se desconoce la identidad de una parte importante de ellas. La MI participa en funciones metabólicas como la fermentación y absorción de carbohidratos no-digeridos, y la absorción de electrolitos y minerales; además participa en la modulación de la motilidad intestinal y ofrece protección contra la invasión de microorganismos patógenos; al mismo tiempo que modula el sistema inmunológico, entre otros (Ilinskaya et al., 2017). Por

lo que la MI es uno de los ecosistemas más complejos y su composición tiene un efecto significativo en términos de salud y enfermedad para el huésped. La MI está constituida principalmente por bacterias aunque también se encuentran virus, hongos y células eucariotas (Muñoz-Garach et al., 2016). Entendiéndose por microbiota al conjunto de microorganismos que cohabitan en diferentes regiones anatómicas de individuos sanos, su composición es diversa y especializada, dependiente de la región o tracto donde se localice, éstos microorganismos conviven en contacto directo con el ser humano y mantienen una relación simbiótica con beneficios bidireccionales (La Rosa Hernández et al., 2014). Por lo que se ha señalado que la forma en la que funciona el cuerpo humano depende de nuestros propios genes y de los genes de los microorganismos que residen en nuestro cuerpo y que en conjunto conforman el microbioma (Zaldivar Ochoa, 2002).

La colonización de diferentes zonas anatómicas depende de condiciones fisicoquímicas locales como pH, temperatura, humedad y niveles de oxígeno. La «flora normal» ha sido el término más usado en la literatura médica durante décadas para referirse a las comunidades microbianas que habitan en el cuerpo de una persona sana. Otros términos utilizados han sido el de «microflora autóctona» y más recientemente «microbiota normal» (Herrero de Lucas et al, 2018). Por su enorme capacidad metabólica, se ha considerado la microbiota como un “órgano” imprescindible para la vida que regula la salud y la enfermedad (Del Campo-Moreno et al., 2018).

Como ejemplo, en la piel, la microbiota residente se divide en 2 grandes grupos bacterianos, uno en mayor porcentaje, conformado por bacterias *Corineformes* y por *Staphylococcus*; así como un grupo de menor porcentaje: los micrococos y *Acinetobacter*; además de la biota fúngica de la familia de *Malassezia* y biota parasitaria como el ácaro *Demodex folliculorum* (Santamaría-González y Alvarado-Delgadillo, 2022).

Por otra parte, los lactobacilos predominan en la microbiota de la vagina de las mujeres fértiles e impiden la colonización de la mucosa por microorganismos indeseados, generadores de patología urogenital. Las propiedades del microbiota

vaginal que le permiten colonizar la mucosa e impedir el establecimiento o la proliferación excesiva de microorganismos potencialmente patógenos son de dos tipos:

a) la adherencia específica a las células epiteliales y a dichos patógenos.

b) la producción de compuestos antimicrobianos (Martin et al., 2008).

La microbiota intestinal puede variar de un individuo a otro, incluso en el mismo individuo por diferentes circunstancias. Hasta el día de hoy se sabe que influye: el medio ambiente, la carga genética y el tipo de dieta, además del estrés, infecciones, la administración de antibióticos y obviamente la edad. En particular el envejecimiento mismo origina una inmuno-senescencia, con agotamiento de células T y cambios en la microbiota intestinal (Michel et al., 2017).

Los estudios comparativos de microbiota intestinal entre niños alimentados con lactancia materna y con fórmulas artificiales, establecen que la leche humana es un potente inductor de maduración inmunológica, ya que provee probióticos de origen materno, capaces de modular la colonización bacteriana neonatal con efecto protector sobre las enfermedades gastrointestinales infecciosas, e incluso los niños que nacen por canal de parto difieren en la composición de su microbiota con los que nacen por cesárea (La Rosa Hernández et al., 2014).

Recientemente se ha descrito la existencia del eje cerebro-intestino, que conecta el sistema nervioso central con la microbiota intestinal a través del nervio vago, el sistema parasimpático, los metabolitos bacterianos que pueden tener influencia sobre neurotransmisores, y el sistema endocrino asociado al tracto digestivo. Así pues, además de las enfermedades que clásicamente se han relacionado con alteraciones en la MI, como la obesidad, la diabetes tipo 2, las enfermedades inflamatorias del intestino y las alergias; igualmente, se han relacionado otras enfermedades del sistema nervioso central, como el autismo, la ansiedad, la depresión y la dependencia alcohólica (Del Campo et al., 2018). La MI se considera un nuevo factor implicado en la obesidad y las enfermedades asociadas, por su influencia en las funciones metabólicas e inmunológicas del hospedador. La función

metabólica de la microbiota intestinal es esencial para la actividad bioquímica global del organismo, ya que interviene en la obtención de energía de la dieta, la generación de compuestos absorbibles y la producción de vitaminas (Reid et al., 2003).

### **1.1.1 Microbiota intestinal y su función en el huésped**

La MI se compone principalmente de bacterias, pero también incluye arqueas, eucariotas, virus y bacteriófagos. El 90 % de la carga microbiota corresponde a Bacteroidetes y Firmicutes y el 10% restante incluye Proteobacterias, Actinobacterias, Fusobacterias y Arqueas. Las interacciones entre el huésped, procariontes, eucariotas y virus tienen lugar en varios niveles. Si bien existen marcadas diferencias en la composición y función microbianas a lo largo de todo el tracto intestinal, la mayoría de las investigaciones se han centrado en la microbiota fecal, ya que el muestreo fecal es un método más conveniente y no invasivo. (Arumugam et al., 2011; Shetty et al., 2017; Mills et al., 2019b). Factores como la edad, la dieta, la ingesta de fármacos y el tiempo de tránsito colónico entre muchos otros son responsables de la fluctuación de la microbiota entre individuos. La gran diversidad de la MI se relaciona con una alta capacidad metabólica, que incluso es similar a la del hígado, razón por la que también se apoya el que la MI se considere como un órgano virtual, pero a diferencia de cualquier otro órgano del cuerpo humano, el microbioma intestinal representa una fuente de variación significativa entre individuos, lo que hace que el análisis sea aún más complicado (Rajilić-Stojanović et al., 2014; Haro et al., 2016; Mills et al., 2019a; Mills et al., 2019b; Guarner, 2020).

La MI interactúa directa- o indirectamente con el huésped a través de varias estrategias como la producción de compuestos bioactivos. La microbiota es capaz de participar en la regulación de numerosos mecanismos de homeóstasis, inmunidad y energéticos, al tiempo que protege al huésped contra patógenos a través de la resistencia a la colonización.

Varios autores han señalado el contenido genético de la microbiota intestinal humana, comúnmente conocido como microbioma intestinal, excede el contenido genómico humano en un factor  $\geq 100$ , lo que constituye un gran potencial genético que puede contribuir en la fisiología del huésped (Lawrence et al., 2014; Rajilić-Stojanović et al., 2014; Mills et al., 2019a; Mills et al., 2019b).

Los seres humanos, al igual que otros organismos superiores, viven en simbiosis con su microbiota coevolucionada. La mayoría de los microorganismos humanos residen en el tracto gastrointestinal, donde, además de contribuir a la digestión, también realizan otras funciones que son esenciales para el huésped (Bäckhed et al., 2005; Rajilić-Stojanović et al., 2014). Por lo que se considera que la microbiota intestinal tiene varias funciones que se pueden agrupar en metabólicas, tróficas y de defensa.

### **1.1.2 Funciones metabólicas**

Las funciones metabólicas consisten principalmente en la fermentación de compuestos no digeribles que son metabolizados por la microbiota, generando energía y otros nutrientes que son aprovechados por el huésped. En particular, la fermentación bacteriana anaerobia de los carbohidratos de la fibra dietética conduce a la formación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que son el combustible respiratorio preferido de los colonocitos y tienen un efecto antiinflamatorio, al inhibir ciertas citoquinas proinflamatorias que pueden inducir la apoptosis de células malignas en el cáncer de colon (Sebastián-Domingo et al., 2018).

Los AGCC producidos por la fermentación de los carbohidratos son acetato, propionato y butirato, que son absorbidos por el colon. La mayor parte del propionato es metabolizado en el hígado, donde actúa reduciendo los niveles séricos de colesterol y glucosa. El butirato proporciona la mayor fuente de energía para las células del epitelio colónico. Los AGCC promueven la integridad de las uniones celulares en el colon, aumentan la velocidad de proliferación de las células epiteliales, aceleran la reparación epitelial en respuesta a la lesión y facilitan la

diferenciación de las células epiteliales con los consiguientes efectos contra el cáncer de colon (Ramakrishna et al., 1990).

Actualmente se considera a la microbiota intestinal como un factor implicado en el estado de salud general y en el peso corporal. Puede participar en el metabolismo energético a través de la energía obtenida de la dieta, en la regulación del almacenamiento de la grasa corporal, en la regulación de la lipogénesis, o en la regulación de la oxidación de los ácidos grasos. Un aumento de los Firmicutes y disminución de los Bacteroidetes, juega un papel importante en la génesis y mantenimiento de la obesidad en el humano, probablemente interactuando con factores genéticos. Además de otros muchos mecanismos, uno de los más importantes es la posible contribución al desarrollo de obesidad asociado a una mayor obtención de energía del colon a través de la fermentación de los carbohidratos no absorbibles. En contraste, parece ser que los cambios en la MI también pueden jugar un papel decisivo en la anorexia nerviosa, con la grave pérdida de peso que se produce, incluso en los trastornos mentales como ansiedad y depresión (Kleiman et al., 2015 y Álvarez et al., 2018).

La microbiota intestinal sintetiza vitamina K y varios componentes de la vitamina B, incluida la vitamina B12, aunque es improbable que esta última esté disponible directamente para el hospedero humano, debido a la fisiología de la absorción de esta, que requiere la unión al factor R en el estómago, la transferencia al factor intrínseco en el intestino delgado y la absorción del complejo en el íleon terminal (Sebastián et al., 2018).

### **1.1.3 Funciones tróficas**

El efecto protector de la microbiota ante agentes patógenos se divide en dos: resistencia a la colonización y estimulación del sistema inmune. En pacientes sanos, la microflora residente evita la colonización y/o sobre crecimiento de patógenos, lo cual sigue siendo motivo de estudio (Cebra et al., 2005). Se han descrito múltiples mecanismos que protegen al huésped de infecciones oportunistas, como la competencia por sitios de adhesión, la de nutrientes y la producción de condiciones

ambientales hostiles para el crecimiento de patógenos que involucran cambios en el pH (Mulder et al., 2009), la producción de compuestos antimicrobianos (desde metabolitos tóxicos hasta sustancias bactericidas) y la generación de señales que intervienen en la expresión génica (Ouwehand et al., 2006).

La respuesta protectora del epitelio intestinal se puede dividir en una barrera secretora, diseñada para evitar que bacterias patógenas entren en contacto con la superficie de los enterocitos y una barrera física por medio de una capa de moco epitelial (Neish et al., 2002), la cual está construida por glicoproteínas mucinosas que contribuyen a la formación de una película gelatinosa sobre la superficie epitelial del intestino. Sin embargo, no solo ejerce esta actividad protectora, sino que causa secreción de IgA y de péptidos y proteínas antimicrobianas transportadas a través de la lámina propia por las células epiteliales hacia la monocapa de mucina (Mahida et al., 2004).

A pesar del rápido recambio epitelial que ocurre cada tres a cinco días (Kalliomäki et al., 2005) las células epiteliales del intestino son capaces de funcionar como una barrera importante contra productos microbianos como los lipopolisacáridos y las endotoxinas presentes en el intestino. Al mismo tiempo, permiten el paso de nutrientes, electrolitos y agua de la luz intestinal hacia el torrente sanguíneo. Esta permeabilidad selectiva a través de la capa de enterocitos está dada por uniones estrechas en el extremo apical y lateral de las membranas celulares, las cuales son estructuras dinámicas cuya función puede ser regulada por estímulos externos (Mahida et al., 2004).

#### **1.1.4 Funciones de defensa**

El tracto gastrointestinal constituye una de las principales zonas de contacto con agentes ambientales potencialmente nocivos (bacterias, virus, toxinas y alérgenos) y desempeña una función primordial en la defensa del organismo frente a éstos. Se señala que el 80% de la producción de anticuerpos en un humano adulto tiene lugar

en la mucosa intestinal, en donde la microbiota participa en la inducción y regulación de la inmunidad adaptativa (Guarner, 2020).

Su función protectora depende de los componentes estructurales y funcionales de la mucosa intestinal, del sistema inmune asociado y de sus interacciones con la microbiota intestinal residente y en tránsito. Las células del epitelio intestinal, el moco que cubre la mucosa, el flujo sanguíneo que la irriga y las secreciones (fosfolípidos, bilis, péptidos antimicrobianos, etc.) constituyen de forma conjunta una barrera física y química que contribuye a la defensa del huésped (Bourlioux et al., 2003).

El moco está integrado por mucinas (glucoproteínas), que son potenciales sitios de adhesión para las bacterias. La síntesis y la composición de las mucinas están reguladas genéticamente en cada individuo; además, las bacterias intestinales pueden contribuir a la regulación del repertorio de mucinas mediante la modificación de la expresión génica de glucosiltransferasas del huésped y por acción de sus propias enzimas glucolíticas (Hooper et al., 2001).

Los patógenos normalmente alteran la permeabilidad intestinal, mientras que las bacterias comensales beneficiosas y los probióticos pueden contribuir al restablecimiento de ésta y de las uniones intercelulares, y favorecer la proliferación celular (Saxelin et al., 2005). La síntesis de péptidos antimicrobianos (defensinas) y proteasas implicadas en su activación en las células Paneth constituye un mecanismo adicional de defensa del huésped frente a agentes patógenos. Tanto la producción de las defensinas como de las enzimas que las activan puede ser modulada por la microbiota comensal y por bacterias probióticas. Por el contrario, algunos patógenos están desarrollando mecanismos de resistencia a esta barrera mediante la reducción de la expresión de dichos péptidos (Salzman et al., 2003).

## **1.2. Género *Bacillus* en TIG**

Las especies del género *Bacillus* son bacterias Gram positivas, anaerobias facultativas, con morfología bacilar, movilidad flagelar y tamaño variable;

pertenece al Reino Bacteria; Filo Firmicutes; Clase Bacilli; Orden Bacillales y Familia Bacillaceae. En este género se incluyen más de 336 especies que conforman cuatro grupos; el grupo de *B. cereus* asociado a patogenicidad, los bacilos ambientales presentes en varios hábitats, el grupo de *B. clausii-halodurans* y el grupo de *Bacillus* sp. Estas especies se caracterizan por la formación de endosporas que les confiere resistencia y habilidad para desarrollarse en diversos hábitats y presentar resistencia a diversos tipos de estrés.

Si bien el suelo se considera como el principal reservorio de este género, también se les ha aislado en tejidos vegetales y animales en descomposición, en el agua y aire, además se han detectado numerosos miembros de los géneros *Bacillus* en las muestras del tracto gastrointestinal humano. Los primeros representantes de este grupo de bacterias fueron aislados por Marjorie Batchelor (1919), quien informó que *Bacillus cereus* era el miembro más frecuente de la bacteria esporogénica aeróbica en las heces infantiles; pero la gran mayoría de las especies de este género y los géneros relacionados se informaron solo recientemente. Uno de estos estudios fue diseñado para el cultivo dirigido de *Bacillus* y especies relacionadas de muestras humanas (Hoyle et al., 20012). Se ha demostrado que *Bacillus* spp. podría recuperarse, aunque estas bacterias tienen una abundancia muy baja de  $10^2 - 10^4$  células mL<sup>-1</sup> de contenido intestinal. Poco se sabe acerca de la función de estas bacterias en el ecosistema, pero dos estudios independientes han demostrado que los miembros del orden Bacillales, tienen una mayor abundancia en las heces de los pacientes con síndrome del intestino irritable (Rajilić-Stojanović et al., 2014; Hoyle et al., 2012; Lagier et al., 2012a)

Durante mucho tiempo, los representantes del género *Bacillus*, no fueron considerados como parte de la microbiota intestinal normal. Sin embargo, estudios recientes muestran que el género *Bacillus* está presente en el sistema TIG en cantidades significativamente más altas de lo que podría explicarse por la sola ingesta de alimentos. Varias especies de *Bacillus* (*B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. clausii*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. mediterraneensis*, *B. thuringiensis*) se han aislado del TIG humano sano, encontrándose bien adaptados por lo que se ha

sugerido que son bacterias colonizadoras más que parte de la microbiota transitoria (Fakhry et al., 2008; Alou et al., 2016; Lopetuso et al., 2016). Lo anterior se ha demostrado con la germinación de las esporas de *Bacillus* en el intestino delgado humano, que puede considerarse como parte del ciclo de vida de las especies de *Bacillus* asociadas a los humanos (Hong et al., 2009). Dado que, en el TIG las esporas no solo germinan, sino que también las células vegetativas pueden esporular durante un tiempo más corto que sistemas *in vitro* (Tam et al., 2006; Ghelardi et al., 2015).

Otros aspectos relativos a la importancia del género *Bacillus* se basan en su trayectoria de uso para la elaboración de diversos alimentos fermentados; también destaca su capacidad para secretar proteínas, enzimas, compuestos antimicrobianos y vitaminas, lo que hace que este grupo un candidato para ser utilizado como bacterias probióticas en las industrias alimentaria y farmacéutica (Lee et al., 2019). Varias cepas del género *Bacillus* producen enzimas que han empleado para la producción de riboflavina, cobalamina y carotenoides como suplementos para el consumo humano (Elshaghabee et al., 2017). Además, presentan actividad contra células *cancerosas* en la glándula mamaria, el colon, e hígado (Lee et al., 2015 y Vo et al., 2019), y son capaces de producir compuestos inhibitorios contra *Helicobacter pylori*, hongos y otras bacterias Gram-positivas (Lee et al., 2019 y Nannan et al., 2021). En particular, *B. pumilus* puede producir ácido gamma-aminobutírico y enzimas que hidrolizan el gluten a péptidos no inmunogénicos que protegen la mucosa intestinal (De Angelis et al., 2021 y Vo et al., 2019). Por otra parte, se ha señalado que este género puede generar algunos proteicos que alivian la progresión y agravamiento de la enfermedad de Parkinson, por su macada actividad antioxidante y la regulación del balance redox. Además, *Bacillus* tiene la capacidad de producir ácidos grasos de cadena corta, como el ácido acético y propiónico y el ácido butírico, este último puede reducir el apetito con la consecuente pérdida de peso corporal en individuos obesos (DiBaise et al., 2008). Sin embargo, el desequilibrio en la población microbiana se ha relacionado con el desarrollo de obesidad, diabetes y enfermedades hepáticas, derivadas de la presencia de monosacáridos y ácidos grasos libres dentro del tracto gastrointestinal;

situación que proporciona energía adicional al huésped, aunado a un incremento de la permeabilidad intestinal por la presencia de lipopolisacáridos de las dietas altas en grasas (Urnbaugh, et al., 2006 y Blaut et al., 2015).

En general, los bacilos aeróbicos facultativos representan una proporción menor de la microbiota intestinal que las bacterias anaerobias ( Rajilić-Stojanović et al., 2014), pero pueden influir activamente en la comunidad microbiana del TGI y también en todo el organismo gracias a la gran diversidad de compuestos secretados, por lo cual existe un creciente interés en el estudio de cepas de género *Bacillus* aisladas del TGI; además éstas pueden estar asociadas al tipo de dieta y diferentes condiciones del huésped, como es en la obesidad (Mayorga et al., 2016), aunque su función es aún incierta. Por lo que el objetivo del presente estudio es obtener el genoma y estudiar el metabolismo bajo diferentes fuentes de carbono de dos cepas del género *Bacillus*, previamente aisladas de la MI de individuos obesos y delgados que brinde información sobre su posible función en el TGI.

### **1.3 Uso de ciencias ómicas y su posible uso como respuesta a la función de *Bacillus* en TGI**

El genoma comprende todo el material genético de un organismo, que incluye la secuencia completa de ADN contenida dentro de cada célula asociada a la reproducción, metabolismo y otras funciones especializadas. El ADN está compuesto por dos filamentos formando una doble hélice de nucleótidos, con un número variable de dominios superenrollados, que se agrupan en el cromosoma principal o nucleoide y que contienen genes o cadenas del ADN. La mayoría de las bacterias poseen un solo cromosoma circular, aunque también pueden presentar cromosomas múltiples extracromosómico o plásmidos en número y tamaño variable que se replican independientemente del cromosoma. Cada nucleótido contiene un grupo fosfato, azúcar (2-desoxirribo) y una base nitrogenada (adenina, citosina, timina o guanina). El orden de las bases contiene la información genética codificada para la expresión de las proteínas específicas y propias de un organismo.

Dado que contienen secuencias de inserción y transposones es posible su integración al ADN nuclear u constituyen elementos genéticos móviles. Aunque también se encuentran secuencias de ADN corresponden a pseudo-genes, secuencias no-codificantes y ORFans, lo que explica que el genoma bacteriano sea una estructura dinámica que depende de procesos de duplicación, delección y adquisición de genes, por lo que el estudio del genoma permite evaluar los procesos evolutivos y biodiversidad. Por lo que la secuenciación del genoma que contiene información del ADN nuclear y extracromosómico o plásmidico de un microorganismo como *Bacillus* puede generar información sobre la capacidad metabólica, su capacidad para sobrevivir y su posible acción patógena.

### **1.3.1 Secuenciación de genomas**

La caracterización completa de un microorganismo en el laboratorio mediante las técnicas tradicionales de secuenciación de ADN constituye un proceso muy complejo y de alto costo, además requiere de mucho tiempo. Con el incremento de las capacidades de secuenciación a partir del surgimiento de las tecnologías de secuenciación de nueva generación, se ha abierto un nuevo camino en este campo. Entre los principales aportes de estas nuevas tecnologías se ha facilitado la secuenciación del ADN genómico de un alto número de bacterias, generándose un gran volumen de datos en corto tiempo. La obtención de un genoma completo permite contar, en principio, con el catálogo completo de genes que un organismo puede expresar en cualquier momento de su ciclo de vida, siendo esta la mayor importancia en la aplicación de las tecnologías ómicas de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés, Next Generation Sequencing), que al permitir el procesamiento masivo y en paralelo de las muestras, reducen notablemente los costos y el tiempo para obtener la secuencia genómica, en comparación con la secuenciación automática de Sanger (Metzker et al., 2010).

Sin embargo, el proceso y analizar de un enorme volumen de datos biológicos acumulados, como resultado del uso de estas tecnologías, hace necesario el

empleo de herramientas bioinformáticas que permitan manipular eficientemente la gran cantidad de información, herramientas que también se han venido modificando y perfeccionando junto al propio desarrollo de las tecnologías NGS.

### **1.3.2 Características generales de las tecnologías NGS**

La mayor ventaja ofrecida por las NGS es la capacidad para producir un inmenso volumen de datos de forma económica, pudiendo llegar a millones o billones de lecturas en solamente una corrida del equipo para un único genoma, en comparación con la secuenciación automática de Sanger, que puede llegar solo hasta cientos de lecturas, pero con una longitud de hasta 1000 pb aproximadamente (Treangen et al., 2012). Por tanto, con las tecnologías NGS se incrementa considerablemente la cobertura del genoma, que no es más que la cantidad promedio de veces que un nucleótido es representado en un conjunto de secuencias crudas al azar (Sims et al., 2014). Sin embargo, los datos de NGS generalmente son secuencias más cortas; a excepción de los producidos por PacBio, que representan un reto desde el punto de vista computacional para su ensamblaje, debido a la longitud y la enorme cantidad de secuencias.

Si bien las tecnologías de secuenciación de segunda generación (SGS, second generation sequencing) como Illumina han ofrecido grandes mejoras con respecto a la secuenciación de Sanger, sus limitaciones, especialmente sus longitudes de lectura cortas, las hacen poco adecuadas para algunos problemas biológicos particulares, incluido el ensamblaje y la determinación de regiones genómicas complejas, detección de isoformas de genes y detección de metilación. La secuenciación en tiempo real de una sola molécula (SMRT, por sus siglas en inglés Single-molecule real-time sequencing) desarrollada por Pacific BioSciences (PacBio), ofrece un enfoque alternativo para superar muchas de estas limitaciones. Para ser concisos, en lo sucesivo se denomina "secuenciación PacBio", aunque la comunidad también utiliza la "secuenciación SMRT" (Rhoads et al., 2015).

### 1.3.3 Tecnología PacBio

A diferencia de SGS, la secuenciación de PacBio es un método para la secuenciación en tiempo real y no requiere una pausa entre los pasos de lectura (Schadt et al., 2010). Estas características distinguen la secuenciación PacBio de SGS, por lo que se clasifica como secuenciación de tercera generación (TGS, Third generation sequencing).

La secuenciación PacBio ofrece longitudes de lectura mucho más largas y ejecuciones más rápidas que los métodos SGS, pero se ve obstaculizada por un rendimiento más bajo, una tasa de error más alta y un costo por base más alto. SE considera que la secuenciación PacBio y SGS pueden ser complementarias, en una secuenciación híbrida donde se utilizan ambas tecnologías para superar las desventajas de cada una por separado (Rhoads et al., 2015). Si bien las aplicaciones de la secuenciación de PacBio para la investigación genómica se limitó inicialmente a los genomas microbianos relativamente pequeños, la secuenciación de PacBio ahora se puede utilizar para estudiar genomas mucho más grandes, incluido el humano, gracias a las nuevas técnicas computacionales y las mejoras en la tecnología de secuenciación. Las longitudes de lectura largas de la secuenciación de PacBio también hacen que la tecnología sea apta para la identificación y cuantificación de isoformas, incluidas las nuevas isoformas, especialmente cuando se usa junto con SGS (Rhoads et al., 2015).

Las tecnologías ómicas como la secuenciación del genoma por PacBio permiten el análisis del genético y la variación de expresión que puede proporcionar información integral de forma rápida (Leser, et al., 2008; Pop et al., 2009; Marchesi, et al., 2011; Narzisi, et al., 2011; Rodríguez-Santiago, et al., 2012; Aguilar-Bultet, et al., 2015 y Rhoads, et al., 2015). La secuenciación genómica proporciona un catálogo completo de los genes expresados por el microorganismo y la identificación de sus factores de virulencia. Además, la secuenciación del genoma permite un análisis filogenético comparativo, donde las proteínas codificadas son clasificados según la base de datos Clusters of Orthologous Groups (COGs), en con el fin de evaluar su

funcionalidad y evolución (Rodríguez-Santiago, et al., 2012; Aguilar-Bultet, et al., 2015, Rhoads, et al., 2015; Tatusov et al., 2001; Li et al., 2003).

### **1.3.4 Genómica comparativa**

El estudio de redes metabólicas a través de bases de datos en línea, como la anotación automática KEGG Servidor (KAAS), permite la reconstrucción de vías metabólicas basadas en secuencia homología, información bidireccional y heurística con un alto grado de precisión (Moriya et al., 2007 y Tokimatsu, et al., 2011).

Estas herramientas también ofrecen otros elementos que contribuyen al estudio de la funcionalidad génica en bacterias, como el análisis pangenómico. En algunas especies, se ha demostrado que se podrían descubrir nuevos genes incluso después de que el genoma estuviera completamente secuenciado. Por lo tanto, el análisis pan-genoma puede estimar el número de secuencias genómicas que se requieren para caracterizar toda la diversidad genómica (Medini, et al., 2005, Page, et al., 2015 y Vernikos, et al., 2015).

#### **1.3.4.1 Pangenoma**

Los análisis comparativos de genómica entre múltiples genomas de especies individuales han revelado una amplia diversidad intraespecífica genómica (Pallen et al., 2007). Dada la facilidad actual para generar secuencias genómicas completas, es posible saber cuántos genomas se deben secuenciar para una especie dada, para representar con precisión todo su repertorio de genes. Una forma de abordar este problema es conocer cuántos genes nuevos se identifican cada vez que se secuencian un nuevo genoma de la especie de interés. Tettelin et al. (2005) fueron pioneros en este enfoque usando múltiples genomas de *Streptococcus agalactiae*, seguido por Hogg et al. (2007) quienes estudiaron el genoma de *Haemophilus influenzae*. En ambos casos, los análisis dieron como resultado la determinación de

un genoma central que consta de genes compartidos por todas las cepas estudiadas y que probablemente codifican funciones relacionadas con la biología básica y los fenotipos de la especie. La característica más importante de los estudios fue la constatación de que un porcentaje significativo de cada secuencia del genoma era específico de cada cepa individual y, por lo tanto, cada nuevo genoma secuenciado proporcionaba una serie de nuevos genes no caracterizados previamente. Por lo tanto, el repertorio de genes de la especie era significativamente mayor que el de cualquier cepa individual de esa especie y habría que secuenciar una gran cantidad de genomas para caracterizarla. Esto llevó a los autores al concepto de pan-genoma o supragenoma bacteriano. El pan-genoma es la suma del genoma central anterior y el genoma prescindible que está compuesto por genes presentes en algunas, pero no en todas, las cepas estudiadas, así como los genes específicos de la cepa. El genoma prescindible contribuye a la diversidad de la especie y probablemente proporciona funciones que no son esenciales, pero que confieren ventajas selectivas.

#### **1.3.4.2 Genes centrales y prescindibles**

En general, el genoma central incluye todos los genes responsables de los aspectos básicos de la biología de una especie y sus principales rasgos fenotípicos. Mientras que los genes prescindibles contribuyen a la diversidad de especies y pueden codificar vías y funciones bioquímicas complementarias que no son esenciales para el crecimiento bacteriano pero que confieren ventajas selectivas, como la adaptación a diferentes nichos, la resistencia a los antibióticos o la colonización de un nuevo huésped. Dichos genes generalmente se agrupan en grandes islas genómicas que normalmente están flanqueadas por secuencias cortas de ADN repetidas y se caracterizan por un contenido GC anormal (Medini et al., 2005). La investigación y la anotación funcional de genes prescindibles revela que los genes hipotéticos, relacionados con fagos y transposones representan la gran mayoría de

los hallazgos, mientras que en un genoma típico este tipo de gen representa porcentajes mucho menores (Daubin et al., 2004). El hecho de que estos genes se asocien principalmente con un número limitado de cepas indica una selección positiva débil para estas funciones y muestra que los elementos móviles contribuyen poco a la aptitud y diferenciación general de la especie, aunque a veces pueden portar genes importantes (Brüssow et al., 2004 y Feil et al., 2004). Dado que estos genes no son necesarios para la supervivencia o el mantenimiento de la especie, también pueden eliminarse del genoma; sin embargo, en las especies patógenas, esta pérdida suele ir acompañada de una reducción paralela de la virulencia. Por ejemplo, en pasajes sucesivos de cultivos in vitro de *Haemophilus influenzae* y *E. coli*. De manera similar, recientemente se descubrió que cepas de *Streptococcus* codifican una estructura similar a pili, que no es ubicua en todas las cepas, y cuya presencia o ausencia podría estar relacionada con la adquisición o pérdida de genes (Lauer et al., 2005).

La secuenciación metagenómica ha ayudado en la identificación de información del microbioma del tracto gastrointestinal, con capacidades significativamente enriquecidas para el metabolismo de glucanos, aminoácidos y xenobióticos, metanogénesis y síntesis de vitaminas e isoprenoides en el estudio de genes en la microbiota intestinal de dos individuos sanos (Gill et al., 2006).

### **1.3.5 Proteómica**

La disponibilidad de secuencias genómicas completas ha facilitado enormemente la investigación biológica en muchos campos; sin embargo, dentro de las ciencias ómicas también se incluye a la proteómica basada en espectrometría de masas. La proteómica abarca la identificación y cuantificación de todas las proteínas de un proteoma, incluida la expresión, la localización celular, las interacciones, las modificaciones postraduccionales (PTM) y la renovación en función del tiempo, el espacio y el tipo de célula. Por lo que el análisis proteómico completo es probablemente más complejo que la secuenciación de un genoma (Aebersold et al.,

2003; Zhang et al., 2013). Aunque aún se tienen deficiencias en el procesamiento de datos y automatización en comparación con los análisis genómicos. Los métodos generales para la creación de perfiles de proteínas han evolucionado derivado de la mejora en la instrumentación de la espectrometría de masas, así como de las técnicas de separación de proteínas y péptidos, las herramientas de análisis de datos computacionales y la disponibilidad de bases de datos de secuencias completas para muchas especies.

La espectrometría de masas (MS por sus siglas en inglés) es una técnica analítica que se basa en la obtención de iones a partir de moléculas neutras en fase gaseosa, los cuales se separan y son detectados acorde con masa y carga; generando un espectro de masas en el que se representa la abundancia de los diferentes tipos de iones en relación al valor de masa y carga ( $m/z$ ). Los equipos de MS están conformados por al menos cuatro partes, un sistema de introducción de muestras, un sistema de ionización, un analizador que permite separar los iones y un detector. El proceso de ionización puede generar un ion molecular acompañado de una serie de iones derivados de procesos de fragmentación y disociación, que son específicos de cada molécula, por lo que bajo condiciones estandarizadas el espectro de masas representa una huella molecular que permite la identificación de la estructura química de la molécula analizada. Se tienen diversos sistemas de ionización dependiendo de la volatilidad de las muestras, aunque para moléculas sensibles al calor como las proteínas y péptidos se prefieren sistemas de ionización por electrospray o electro-nebulización (ESI, en el que el uso de alto voltaje produce la ionización y nebulización de las moléculas disueltas en un líquido), así como la ionización MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) en el que la vaporización e ionización de la muestra se produce mediante radiación láser. Además, pueden o no ser acoplados a sistemas de separación por cromatografía de líquidos. Los iones generados son separados de forma individual en el analizador, derivado de procesos de aceleración, deflexión y conducción o enfoque al detector en sistemas simples o en serie o tándem. Se tienen diversos tipos de analizadores como el analizador cuadupolar, el de tiempo de vuelo (TOF) y de el de

trampa iónica, entre otros, los cuales presentan diferentes niveles de resolución (Harvey, 2019; Zubarev y Makarov, 2013, Rajawat y Jhingan, 2019).

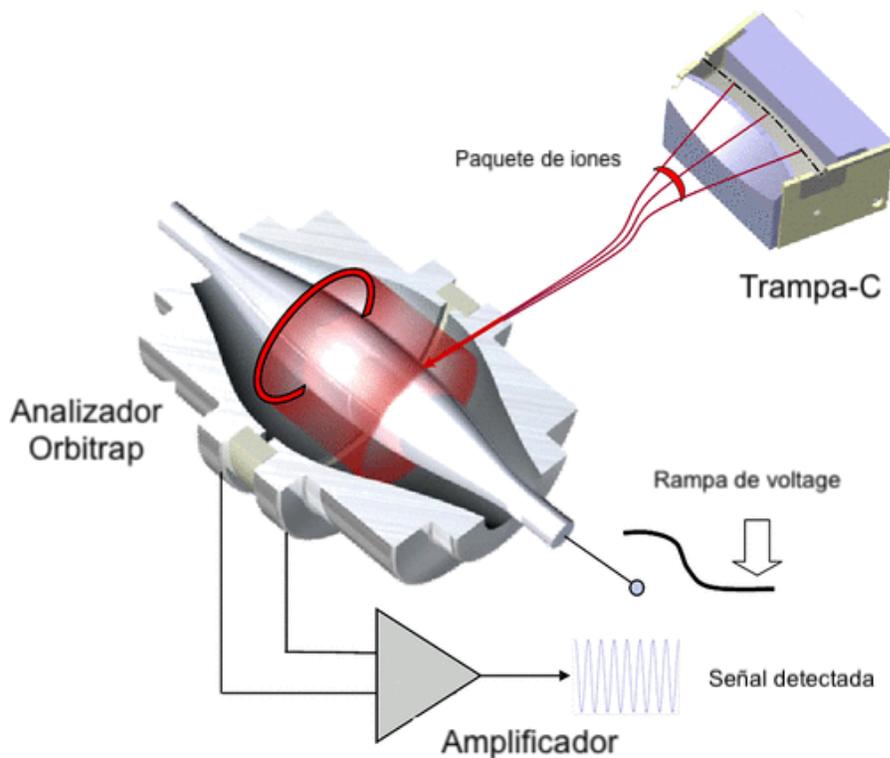
El análisis de proteínas y mezclas de proteínas se realiza mediante la técnica *Shotgun* proteomics (derivado del inglés) es una estrategia basada en la combinación de digestión de proteínas y secuenciación de péptidos en sistemas tándem MS/MS (Link et al., 1999; Gygi et al., 1999 y Washburn et al., 2001). El método permite la identificación de proteínas y, cuando se combina con el etiquetado de isótopos estables, permite la cuantificación de los cambios en los niveles de expresión de proteínas para cientos de proteínas en un solo experimento (Aebersold et al., 2003).

En comparación con otras tecnologías proteómicas basadas en MS, como la secuenciación de proteínas intactas (Reid et al., 2002 y Meng et al., 2005) o análisis de proteínas basado en gel 2D (Görg et al., 2004), el análisis proteómico *Shotgun* presenta mejor rendimiento. Ya que, la digestión de proteínas en péptidos más cortos simplifica la secuenciación MS/MS (los péptidos son más fáciles de fragmentar en el espectrómetro de masas que las proteínas intactas), mientras que la eliminación de la separación basada en gel 2D a nivel de proteína simplifica el manejo de muestras y aumenta el rendimiento general de los datos, pero se requiere de un mayor apoyo en el análisis de datos (Patterson et al., 2003; Boguski et al., 2003; Nesvizhskii et al., 2004; Johnson et al., 2005; Russell et al., 2004 y Baldwin et al., 2004).

La espectrometría de masas se ha convertido en una herramienta fundamental para el análisis de proteínas a gran escala, con quipos de mayor resolución, precisión, sensibilidad y velocidad de exploración. Además, recientemente se han desarrollado analizadores de masas híbridos (p. ej., la serie Orbitrap de trampa de iones lineales) que han mejorado significativamente el análisis proteómico Al capturar más analitos de baja abundancia (Makarov et al., 2000 y 2006).

### 1.3.5.1 Analizador de masas Orbitrap

El analizador de masas Orbitrap es un analizador de trampa iónica de alta resolución que consta de tres electrodos, dos electrodos exteriores y un electrodo central, lo que le permite actuar como analizador y detector, presenta una mayor sensibilidad, mayores límites de detección, mayor rango dinámico y mejor rendimiento. La Figura 1 muestra cortes que representan tanto la trampa estándar y la trampa compacta de alto campo (Makarov et al.,2006 y Michalski et al.,2012). Los electrodos exteriores tienen la forma de copas enfrentadas y eléctricamente aisladas por un espacio delgado asegurado por un anillo central dieléctrico. Un electrodo central similar a un huso mantiene unida la trampa y la alinea a través de espaciadores dieléctricos en los extremos. Cuando se aplica voltaje entre los electrodos externo y central, el campo eléctrico resultante es estrictamente lineal a lo largo del eje. Mientras que el componente radial del campo atrae fuertemente los iones hacia el electrodo central (Zubarev y Makarov, 2013).



**Figura 1.** Sección transversal del analizador trampa-C y Orbitrap (no se muestran la óptica iónica ni el bombeo diferencial). Los iones se almacenan en el cuadrupolo doblado solo de rf de la trampa C, luego se reduce la rf y se aplica un pulso de alto voltaje a través de la trampa, cada  $m/z$  (relación masa/carga) se expulsa en un paquete corto. Los paquetes de la trampa C ingresan al analizador durante la rampa de voltaje y se propagan en anillos oscilantes que inducen la corriente detectada por el amplificador diferencial. Imagen tomada y editada (Zubarev y Makarov, 2013).

Los iones se inyectan entre los electrodos central y externo a través de una ranura que tiene un electrodo de compensación (deflector) en uno de los electrodos externos. Con el voltaje aplicado entre los electrodos central y externo, un campo eléctrico radial desvía la trayectoria de los iones hacia el electrodo central, mientras que la velocidad tangencial crea una fuerza centrífuga opuesta. Los iones permanecen en una espiral casi circular dentro de la trampa. Al mismo tiempo, el campo eléctrico axial causado por la forma cónica especial de los electrodos empuja los iones hacia la parte más ancha de la trampa iniciando oscilaciones axiales armónicas. Los electrodos externos se usan como placas receptoras para la detección de corriente de imagen de estas oscilaciones axiales. La frecuencia de estas oscilaciones armónicas es independiente de la velocidad del ion, pero es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la relación masa-carga. Los iones oscilan a diferente frecuencia lo que permite su separación (Zubarev y Makarov, 2013).

## **2. Justificación e Hipótesis**

### **2.1 Justificación**

En la actualidad están disponibles estudios sobre la microbiota gastrointestinal y sus importancia que tiene esta sobre el huésped, se ha revelado que existe importancia en su composición y que esta dependerá mucho de los hábitos que lleve a cabo el huésped como lo es su dieta, actividad física de esto dependerán los cambios y funciones que presente la MI. El interés en el estudio de esta, su composición y así su función ha crecido, muchos de los estudios se dan como consorcio y no como cepas individuales, eso debido al gran número de cepas que componen esta, así como la dificultad que con lleva su aislamiento de cepas e inclusive algunas son no cultivables. Esta es una limitante para conocer de manera individual la o las funciones que llevan a cabo cada una de las cepas presentes en la microbiota gastrointestinal así como saber su procedencia. Muchas de estas cepas son no autóctonas de la microbiota, han pasado de ser cepas transitorias a cepas colonizadoras formando parte permanente de la microbiota, esto indica que primeramente presentan capacidad de mantenerse en la microbiota y segundo cumplen con alguna función dentro de ella.

Existen estudios de la MI a nivel molecular como son de genómica y proteómica a nivel consorcio para entender la función de este en el sistema gastrointestinal. Una limitación importante de los enfoques basados en el ADN es que predicen funciones potenciales, pero no se sabe si los genes predichos se expresan en absoluto o, de ser así, en qué condiciones y en qué medida. Además, no es posible determinar si el ADN proviene de células activas y viables, inactivas o incluso muertas.

Es por todo lo anterior es la importancia del este estudio de las cepas de *Bacillus pumillus* UAMX y *Bacillus cereus* UAMX aisladas de manera individual de la microbiota gastrointestinal humana, el estudio de estas desde las perspectivas fisiológicas, genómicas y proteómicas podría dar respuesta a su posible función y capacidad de permanecer dentro de la microbiota gastrointestinal, análisis como es la secuenciación total del genoma darían información sobre todo el set de genes presentes en estas cepas, el porcentaje de genes asociados a funciones celulares, resistencia a antibióticos e inclusive las posibles rutas metabólicas que pueden llevar a cabo estas cepas así como un estudio de genética comparativa con otras cepas de la misma especie y conocer su similitud filogenética con otras cepas ya secuenciadas. El estudio proteómico (Secuenciación masiva de proteínas) así como fisiológico confirmarían lo presente a nivel genoma ya que estos corresponden al último nivel de expresión. Este estudio trata de dar respuesta de si las cepas de estudio son capaces de crecer en condiciones de pH y sales biliares similares a las presentes en el sistema gastrointestinal, si son capaces de metabolizar las posibles fuentes de nutrientes presentes, ya que esta podría ser variada desde fuentes simples o complejas, lo cual facilita o complica si metabolismo. También se busca investigar la posible función de estas cepas dentro del microbiota gastrointestinal humana.

## 2.2 Hipótesis

El uso de tecnologías de secuenciación masivas de genoma y proteoma en el análisis de las cepas de estudio aisladas del microbiota intestinal humana, podrían complementar el estudio fisiológico y así dar una posible respuesta de su función de estas cepas en la microbiota y su relación con el huésped.

## 3. Objetivos

### 3.1 Objetivo general

El objetivo de este estudio fue llevar a cabo de manera combinada un análisis fisiológico, genómico y proteómico de las cepas de *Bacillus pumilus* UAMX y *Bacillus cereus* UAMX para intentar dar respuesta a su posible capacidad para permanecer dentro de la microbiota gastrointestinal, así como la identificación de genes asociados a funciones celulares, resistencia a antibióticos y las posibles rutas metabólicas que pueden llevar a cabo estas cepas.

### 3.2 Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad de crecimiento en condiciones gastrointestinales simuladas in vitro (pH y sales biliares) de las cepas *Bacillus pumilus* UAMX y *Bacillus cereus* UAMX.
- Evaluar y seguir las cinéticas de crecimiento de las cepas *Bacillus pumilus* UAMX y *Bacillus cereus* UAMX sobre diferentes fuentes de carbono.
- Secuenciar del genoma de las cepas *Bacillus pumilus* UAMX y *Bacillus cereus* UAMX.
- Secuenciar el proteoma e identificar las proteínas expresadas por las cepas *Bacillus pumilus* UAMX y *Bacillus cereus* UAMX.

- Obtener la agrupación de genes y proteínas por función metabólica de las cepas *Bacillus pumilus* UAMX y *Bacillus cereus* UAMX.
- Predecir las rutas metabólicas llevadas a cabo por las cepas *Bacillus pumilus* UAMX y *Bacillus cereus* UAMX.
- Identificar genes de resistencia a antibióticos en los genomas de *Bacillus pumilus* UAMX y *Bacillus cereus* UAMX.

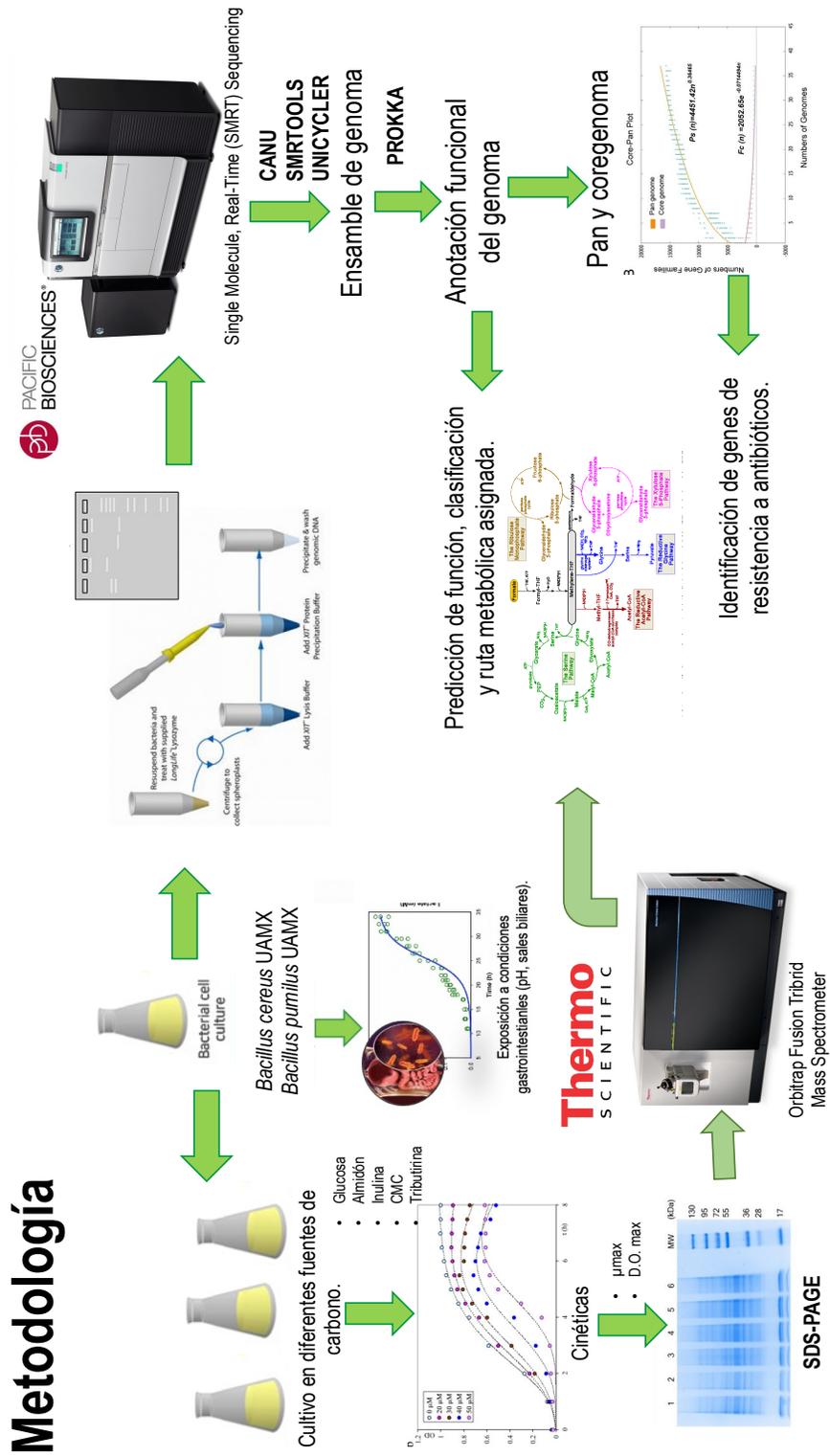


Figura 1. Diagrama general de la metodología desarrollada en el proyecto.

## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1 Propagación de cepas de estudio**

Las cepas de *Bacillus pumilus* UAMX (BP-UAMX) y *B. cereus* UAMX (BC-UAMX) fueron previamente aisladas de muestras de materia fecal de individuos con obesidad y personas delgadas respectivamente por Mayorga et al., 2016. Para su análisis, las cepas fueron propagadas en un medio de cultivo con la siguiente composición: (2.2 g/L NaCl, 10 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.4 g/L CaCl<sub>2</sub>, 0.4 g/L MgSO<sub>4</sub>, 0.72 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g/L extracto de levadura y 10 g/L glucosa) bajo condiciones de agitación (180 rpm), a 37 °C. Todos los reactivos fueron adquiridos con la compañía Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

### **4.2 Evaluación de resistencia en condiciones simuladas in vitro similares a las gastrointestinales**

Células de ambas cepas fueron tomadas en la fase exponencial, se lavaron con amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.0 y se expusieron a pH 2, 3 así como sales biliares en las concentraciones de 0.2 y 0.3 %, durante 1 y 2 horas. Una vez pasado este tiempo se inocularon al 10% en medio fresco antes descrito y se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento en un lector de placas (BioTek Synergy HT, USA), colocando como blanco células expuestas a pH 7.0. Observando la diferencia en las cinéticas como capacidad de crecer en dichas condiciones, las cinéticas de crecimiento fueron ajustadas como lo indica el apartado 4.2.1.

#### **4.2.1 Estimación de parámetros cinéticos**

Los datos cinéticos se dividieron en dos fases: la fase de crecimiento celular la cual y la fase de lisis celular cual se observa con el descenso de la densidad óptica se ajustaron utilizando el modelo Logístico de Velhurst-Pearl (Gatto et al., 1988, Peleg et al., 2007 y Sunday et al., 2012) y el exponencial respectivamente. Los

parámetros cinéticos de las ecuaciones 2 y 4 se obtuvieron utilizando las herramientas Solver y análisis de datos- Regresión lineal en Microsoft Excel®. Las ecuaciones utilizadas son las siguientes:

Modelo Velhurst–Pearl

$$\frac{dX}{dt} = \mu_1 X \left[ 1 - \frac{X}{X_{max}} \right] \quad (1)$$

Forma integrada del modelo Velhurst-Pearl

$$X(t) = \frac{X_{max}}{1 + \left( \frac{X_{max} - X_0}{X_0} \right) \exp(-\mu_1 t)} \quad (2)$$

Donde  $X_0$  es la concentración inicial de biomasa (DO),  $X_{max}$  es la concentración máxima de biomasa (DO), y  $\mu_1$  es la tasa de crecimiento específico ( $h^{-1}$ ).

Modelo exponencial

$$\frac{dX}{dt} = -\mu_0 X \quad (3)$$

Forma integrada del modelo exponencial

$$X(t) = X_0 \exp(-\mu_0 t) \quad (4)$$

Donde  $X_0$  es la densidad óptica inicial (DO),  $\mu_0$  es la tasa de decremento en la densidad óptica crecimiento específico ( $h^{-1}$ ).

#### **4.2.2 Cinética de crecimiento en diferentes fuentes de carbono**

A fin de probar el efecto de la fuente de carbono en el metabolismo de la cepa de estudio, se llevaron a cabo las cinéticas de crecimiento, utilizando como fuente de carbono; almidón (J.T.Baker, USA), inulina (S/M, México), caboximetilcelulosa (CMC, J.T. Baker, USA), tributirina (SIGMA-ALDRICH, USA) al 0.2 % y glucosa (BD Bioxon, México) 1% como control. Evaluando la absorbancia a 600 nm, 37 °C durante 40 horas en un lector de placas (BioTek Synergy HT, USA), los datos generados fueron ajustados a un modelo logístico. Posteriormente los parámetros cinéticos obtenidos fueron analizados estadísticamente con el software NCSS 2007, para un análisis de varianza de una vía, con un  $\alpha = 0.05$  (Hintze et al., 2007).

#### **4.3 Obtención de proteínas totales solubles.**

Las muestras de cultivo se recogieron en la fase logarítmica tardía y se centrifugaron a 11 000 rpm (4 °C) durante 10 min (Eppendorf R15), con lavados consecutivos con solución salina tamponada con fosfato fría (PBS, pH 7.2). A continuación, los sedimentos celulares se re-suspendieron en 291  $\mu$ L de PBS (pH 7.2) y 9  $\mu$ L de SDS al 10%. La ruptura celular se realizó utilizando un homogeneizador ultrasónico de 750 W (Cole-Parmer, Vernon Hills, EE. UU.) con 25 ciclos de 45 s, seguido de otro paso de centrifugación (11 000 rpm durante 20 min, a 4 °C). La fracción de proteína citosólica soluble se recuperó y cuantificó utilizando el método de Bradford [32]. Finalmente, SDS-PAGE se realizó usando geles de Tris-glicina-poliacrilamida al 12% y una cámara de electroforesis MiniProtean (BioRad, México), como lo describe Laemmli (1970).

### **4.3.1 Identificación de proteínas por espectrometría de masas**

#### *Digestión en gel*

Las secciones de gel se diseccionaron manualmente y se separaron con bicarbonato de amonio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) 2.5 mM en acetonitrilo (ACN) al 50% y luego se deshidrataron con 100  $\mu\text{L}$  de ACN al 100%. Las proteínas en las secciones de gel se redujeron con 20  $\mu\text{L}$  de DTT 10 mM en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM y se incubaron durante 45 min a 56 °C. Posteriormente, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se procedió a la alquilación mediante la adición de 20  $\mu\text{L}$  de yodoacetamida 100 mM en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM e incubando en la oscuridad durante 30 min. Posteriormente, los cubos de gel se lavaron con 100  $\mu\text{L}$  de ACN al 100% durante 5 min. Después de la eliminación de la solución, los cubos de gel se lavaron con 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  5 mM durante 5 min. Luego, los cubos de geles se lavaron de nuevo con 100  $\mu\text{L}$  de 100% ACN durante 5 min. Finalmente, los cubos de gel se secaron con CentriVap (Labconco Kansas, Missouri) durante 5 min. Las secciones de geles se rehidrataron con 10  $\mu\text{L}$  de solución de digestión que contenía 12.5 ng /  $\mu\text{L}$  de tripsina de oro de grado de espectrometría de masas (Promega, Madison, WI, EE. UU.) En  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  5 mM y se incubaron en un baño de agua a 37 °C durante la noche, la reacción se detuvo en -80 °C. Los péptidos resultantes se extrajeron tres veces con 30  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo al 50% con ácido fórmico al 5% mediante centrifugación a 1000 x g durante 30 s. Finalmente, las muestras se desalaron con puntas ZipTip- $\mu\text{C}18$  (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) y se secaron con un CentriVap (Labconco Kansas, Missouri).

### **4.3.2 Análisis nano LC-MS / MS**

Las muestras constituidas con 5  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico al 0,1% se inyectaron en una columna trampa nanoviper C18 (3  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$  X 2 cm, Dionex) a un caudal de 3  $\mu\text{L}$   $\text{min}^{-1}$ , y luego se separaron en una columna EASY spray C18 RSLC (2  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$  x 25 cm) con un caudal de 300  $\text{nl min}^{-1}$  se conecta a un sistema RSLC UltiMate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA) y se interconecta con un Orbitrap Fusion<sup>TM</sup> Tribrid<sup>TM</sup>

(Thermo-Fisher Scientific, San Jose, CA) espectrómetro de masas equipado con una fuente de nano iones "EASY Spray" (Thermo-Fisher Scientific, San José, CA). Para la separación de péptidos, se estableció un gradiente cromatográfico usando agua de grado MS con ácido fórmico al 0.1% (solvente A) y ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo al 90% (solvente B) durante 30 min como sigue: 10 min solvente A, 5-25% disolvente B en 20 min, disolvente B al 25-95% durante 5 min, disolvente B al 95% durante 10 min y disolvente B al 95-5% durante 5 min. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo de iones positivos con un voltaje de nanopulverización ajustado a 3,5 kV y una temperatura de la fuente a 280 °C. El calibrador externo incluía cafeína, Met-Arg-Phe-Ala (MRFA) y Ultramark 1621.

El espectrómetro de masas se hizo funcionar en un modo dependiente de los datos. Brevemente, los espectros de MS de barrido completo de la encuesta se adquirieron en el analizador Orbitrap, el barrido del rango de masas se estableció en 350-1500 m/z con una resolución de 120.000 (FWHM) usando un ajuste de control automático de ganancia (AGC) en 4.0 e<sup>5</sup> iones, máximo tiempo de inyección a 50 ms, exclusión dinámica 1 a 90S y tolerancia de masa de 10 ppm. Posteriormente, se seleccionó un escaneo de levantamiento de máxima velocidad para 3s para la posterior fragmentación de CID (Disociación por captura de electrones) o HCD (disociación colisional de mayor energía) de Orbitrap basada en árboles de decisión (Swaney et al., 2008; Frese et al., 2011). El umbral de señal para desencadenar un evento de MS / MS se estableció en 1.0e4 y la energía de colisión normalizada se estableció en 35 y 30% para CID y HCD, respectivamente. Se estableció el AGC de 3.0e4 y la ventana de aislamiento de 1.6 m / z para ambas fragmentaciones. El parámetro adicional para la activación Q incluido del CID se estableció en 0.25 ms y el tiempo de inyección en 50 ms. Para HCD, la primera masa se estableció en 120 m/z y el tiempo de inyección en 100 ms. Los ajustes para el árbol de decisión fueron los siguientes: para la fragmentación de HCD, los estados de carga 2 o 3 se escanearon en un rango de 650-1200 m/z, los estados de carga 4 se escanearon en un rango de 900-1200 m / zy los estados de carga 5 se escanearon en un rango de 950-1200 m / z; Para la fragmentación de CID, los estados de carga 3 se escanearon en un rango de 650-1200 m/z, el estado de carga 4 se escaneó en un rango de 300-900

m/z, y el estado de carga 5 en un rango de escaneo de 300-950 m/z. Todos los datos se adquirieron con el software Xcalibur 4.0.27.10 (Thermo-Fisher Scientific).

#### **4.3.3 Análisis e interpretación de datos proteómicos**

Los espectros de masas se analizaron con Proteome Discoverer 2.1 (PD, Thermo Fisher Scientific Inc.). Las búsquedas posteriores se llevaron a cabo utilizando el servidor Mascot (versión 2.4.1, Matrix Science, Boston, MA). Las búsquedas se realizaron contra la versión revisada de la base de datos Uniprot Viridiplantae (<http://www.uniprot.org/proteomes/?query=viridiplantae+&sort=score>). Los parámetros del análisis comprendieron: especificidad de proteasa trípica completa, dos escisiones perdidas permitidas, modificaciones estáticas cubiertas por carbamidometilación de cisteína (+57.021 Da). Además, las modificaciones dinámicas incluyeron la oxidación de metionina (+15,995 Da) y la desamidación en asparagina / glutamina (+0,984 Da). Para el método MS2, en el que la identificación se realizó a alta resolución en el Orbitrap, se aplicaron tolerancias de iones precursores y fragmentos de  $\pm 10$  ppm y  $\pm 0.2$  Da. Los impactos de péptidos resultantes se filtraron para un máximo de 1% de FDR utilizando el algoritmo Percolator (Käll et al., 2007).

#### **4.4 Secuenciación, ensamble y anotación total del genoma**

La extracción de DNA total se realizó con un Kit de la Marca Promega con número de catálogo A1120, siguiendo las especificaciones del fabricante y comprobando la presencia e integridad del DNA, mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, utilizando buffer TAE (Tris-acetato 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0).

Posteriormente se cuantificó el DNA, obteniendo una concentración mayor a los 80  $\mu$ g, por lo que se procedió a la secuenciación del genoma de ambas cepas, utilizando la tecnología PacBio RSII generando bibliotecas de tamaño 20 Kb (Rhoads et al., 2015, Macrogen, Inc., Seoul Korea).

Una vez secuenciado el genoma de ambas cepas se llevó a cabo el ensamble *de novo*, probando tres diferentes herramientas: CANU 1.8 (Koren et al., 2017), SMRTTools 5.0.1 y Unicycler GPLv3 (Wick et al., 2017). La calidad del ensamble se evaluó mediante el software QUAST 5.0 (Quality Assessment Tool for Genome Assemblies; Gurevich et al., 2013) y posteriormente se realizó la anotación génica con el software PROKKA GPLv3 (Seemann et al., 2014). Los genomas obtenidos se sometieron a las bases de datos de NCBI.

#### **4.5 Agrupación de genes por función (COG) y predicción de rutas metabólicas.**

Para ambos genomas se realizó la clasificación de los grupos de genes empleando la base de datos del sitio Web NCBI COG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>), creada para la clasificación funcional de proteínas de genomas completos (Roman et al., 2001). Así también se obtuvo la predicción de rutas metabólicas utilizando la base Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<https://www.genome.jp/kegg/>) (Kanehisa et al., 2000).

#### **4.6 Obtención del pangenoma**

Se obtuvo el pangenoma para cada una de las cepas, empleando el software GET\_HOMOLOGUES (Contreras et al., 2013) para lo cual se descargaron de la base de datos de NCBI, 38 genomas completos de *B. pumilus* y 49 genomas completos de *B. cereus*, que representan la diversidad existente en las bases de datos. Posteriormente se construyó el árbol filogenómico empleando el software GET\_PHYLOMARKERS (Vinuesa et al., 2018) con 30 genomas de *B. subtilis*, 35 *B. anthracis* y 25 *Lysinibacillus*.

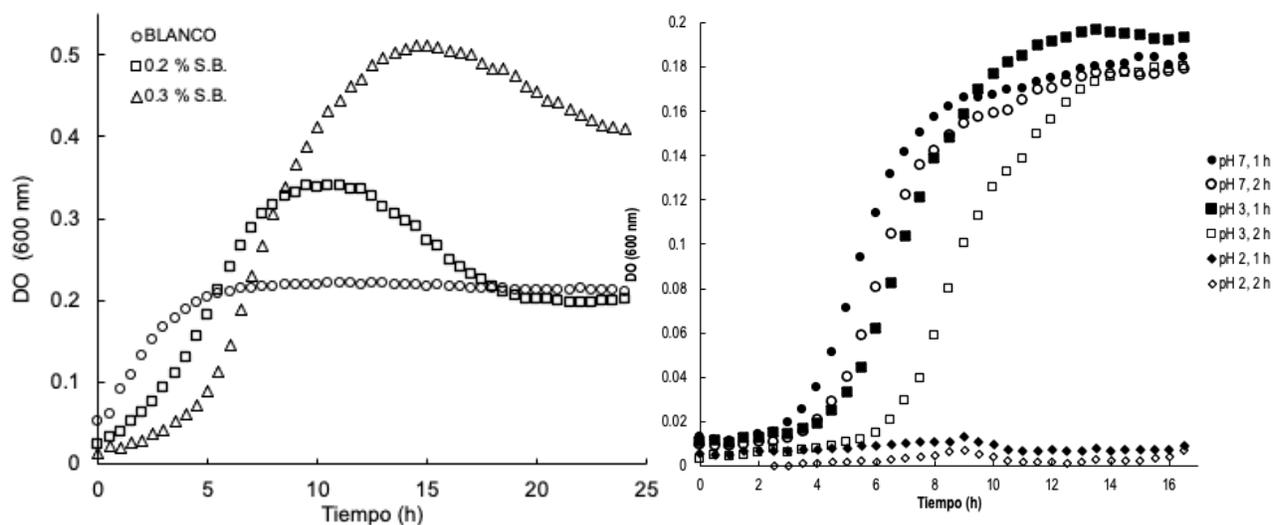
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Resistencia a sales biliares y pH ácido.

Se recomienda una combinación de estudios in vitro e in vivo para una mejor comprensión de la microbiota gastrointestinal. Sin embargo, los estudios in vitro son totalmente reproducibles, rápidos, menos costosos y no implican restricciones éticas. Sin embargo, una variación en el experimento puede restringir la comparación de datos entre los investigadores (Li et al., 2020, Stasiak-R'zanska et al., 2021 y Villareal et al., 2013). Aun así, los estudios in vitro se recomiendan como modelos para experimentos metabólicos y bioquímicos (Veisseire et al., 2020). Por lo tanto, en este estudio se realizó un modelo in vitro basado en la capacidad de *B. pumilus* UAMX y *B. cereus* UAMX para sobrevivir a valores de pH bajo y en presencia de sales biliares relacionadas con el tránsito gastrointestinal desde las secciones gástricas a las entéricas, ya que las cepas estudiadas fueron previamente aisladas del intestino de personas con sobrepeso en el caso de BP-UAMX y personas delgadas en el caso de BC-UAMX.

Se cultivaron aislados de BP-UAMX después de haber estado expuesto a sales biliares (0.2 y 0.3% p/v) (Kristoffersen et al., 2007) y a pH bajos (2 y 3) (Dressman et al., 1990), similares a las presentes en el sistema gastrointestinal. Para el caso de BP-UAMX al aumentar el porcentaje de sales biliares aumenta la  $X_{max}$  (Tabla 1),  $\mu_1$  disminuye con respecto al control en ambas concentraciones de sales biliares evaluadas. La Figura 2 muestra que BP-UAMX no solo resiste a sales biliares como lo reporta Berthold-Pluta et al., 2014; sino que además se favorece el crecimiento bajo estas condiciones ya que se obtiene un incremento en la densidad óptica. Así también se observa un desplazamiento de la fase de latencia, un periodo más corto de la fase estacionaria, así como una rápida presencia fase del descenso de la DO y una caída en la densidad óptica lo cual podría suponer baja de la tasa específica  $\mu_0$  (Tabla 1) al aumentar la concentración de sales biliares. Para BC-UAMX se observa en la Figura 3 la capacidad de crecimiento de esta cepa a las

concentraciones de sales biliares evaluadas, en este caso al aumentar la concentración de sales biliares disminuye el valor de  $X_{max}$  lo que indica un efecto negativo de estas sobre el crecimiento de BC-UAMX, la  $\mu_1$  disminuye al aumentar la concentración de sales biliares como se observa, la figura muestra una rápida y corta presencia de la fase estacionaria en comparación al control, mientras que la tasa específica disminuye al aumentar la concentración de sales biliares esto se supone y que existen cambios negativos en la densidad óptica (Tabla 3).



**Figura 2.** Cinéticas de crecimiento de *B. pumilus* UAMX en presencia de (a) sales biliares 0.2 y 0.3 % y (b) después de la exposición a valores de pH (2,3 y 7) por un periodo de 2 horas. Los datos fueron ajustados como indica el procedimiento experimental.

**Tabla 1.** Parámetros cinéticos obtenido por ajuste de datos a ecuación logística y exponencial para *Bacillus pumilus* UAMX a diferentes concentraciones de sales biliares (Control (0%), 0.2 % y 0.3 %).

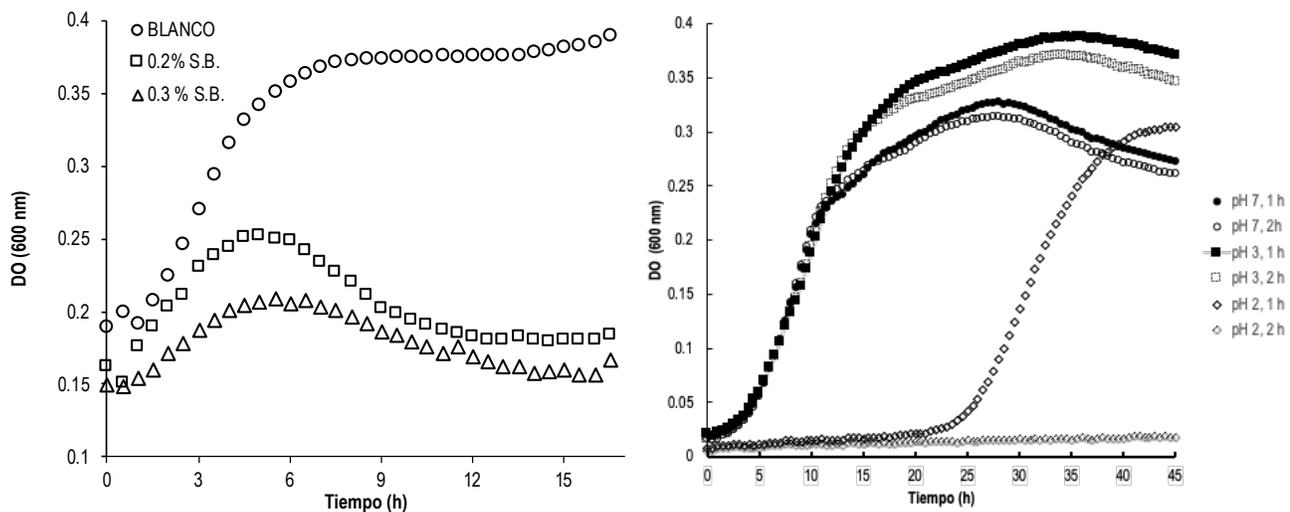
Condición	Sales biliares		
	0%	0.20%	0.30%
$X_{max}$ (D.O.)	0.222 ±0.01	0.364 ±0.02	0.517 ±0.024
$\mu_1$ (h <sup>-1</sup> )	0.773 ±0.114	0.563 ±0.018	0.567 ±0.029
$\mu_0$ (h <sup>-1</sup> )	0	0.053 ±0.004	0.036 ±0.005
R <sup>2</sup>	0.994	0.992	0.996

**Tabla 2.** Parámetros cinéticos obtenido por ajuste de datos a ecuación logística y exponencial para *Bacillus pumilus* UAMX a diferentes valores de pH de 7,3 y 2.

Condición	pH 7		pH 3		pH 2	
	1 h	2 h	1 h	2 h	1 h	2 h
<b>X<sub>max</sub></b> (D.O.)	0.171 ±0.003	0.163 ±0.005	0.196 ±0.011	0.180 ±0.009	N/A	N/A
<b>μ<sub>1</sub></b> (h <sup>-1</sup> )	0.940 ±0.074	0.991 ±0.036	0.742 ±0.023	0.433 ±0.029	N/A	N/A
<b>μ<sub>0</sub></b> (h <sup>-1</sup> )	0	0	0	0	N/A	N/A
<b>R<sup>2</sup></b>	0.998	0.998	0.998	0.975	N/A	N/A

Respecto a la Respuesta de Tolerancia al Ácido (RTA) se observaron cambios como respuesta adaptativa para la protección de la bacteria durante la incubación posterior (Figura 2 y 3) ya que se ve un aumento la X<sub>max</sub> para ambas cepas a ser expuestas a un pH 3, se ha reportado para cepas de *Bacillus* que tienen la capacidad de adaptarse al pH del estómago, este mecanismo se conoce como respuesta de tolerancia al ácido (RTA) y juega un papel importante en la adaptación de los patógenos intestinales al pH del estómago (Merrel et al., 2002, O'Driscoll et al., 1996 y M. Riesenbergs-Wilmes et al., 1996). Las células vegetativas de *B. cereus* pueden inducir este sistema RTA (Jobin et al., 2002 y Thomassin et al., 2006). Sin embargo, BP-UAMX al ser expuesto a pH 2, reduce en su totalidad el crecimiento después de 1 hora de exposición no siendo así para la cepa BC-UAMX el cual aún mantiene la capacidad de crecer a pH 2 después de ser expuesto por 1 hora.

Los datos sugieren la resistencia de las cepas de estudio al tránsito gastrointestinal pero es necesario realizar más estudios ya que este estudio in vitro es un modelo simple que tiene varias restricciones en comparación con las condiciones in vivo, dejando de lado factores tales como la fisiología humana del TGI y los movimientos peristálticos; la presencia de ácidos gástrico y enzimas pancreáticas (proteasas, amilasas y lipasas), sales y hormonas; así como, el capacidad microbiana para adherirse al epitelio intestinal y su capacidad para proliferar en presencia de otros microorganismos (Berthold-Pluta et al., 2015).



**Figura 3.** Cinéticas de crecimiento de *B. cereus* UAMX en presencia de (a) sales biliares 0.2 y 0.3 % y (b) después de la exposición a valores de pH (2,3 y 7 (Control)) por un periodo de 2 horas. Los datos fueron ajustados como indica el procedimiento experimental.

**Tabla 3.** Parámetros cinéticos obtenido por ajuste de datos a ecuación logística y exponencial para *Bacillus cereus* UAMX a diferentes concentraciones de sales biliares (Control (0%), 0.2 % y 0.3 %).

Condición	Sales biliares				
	0%	0.20%		0.30%	
$X_{max}$ (D.O.)	0.383 ±0.003	0.277	±0.018	0.224	0.003
$\mu_1$ (h <sup>-1</sup> )	0.440 ±0.035	0.436	±0.034	0.362	0.015
$\mu_0$ (h <sup>-1</sup> )	0	0.060	±0.006	0.034	±0.007
R <sup>2</sup>	0.983	0.983		0.983	

**Tabla 4.** Parámetros cinéticos obtenido por ajuste de datos a ecuación logística y exponencial para *Bacillus cereus* UAMX a diferentes valores de pH (7,3 y 2).

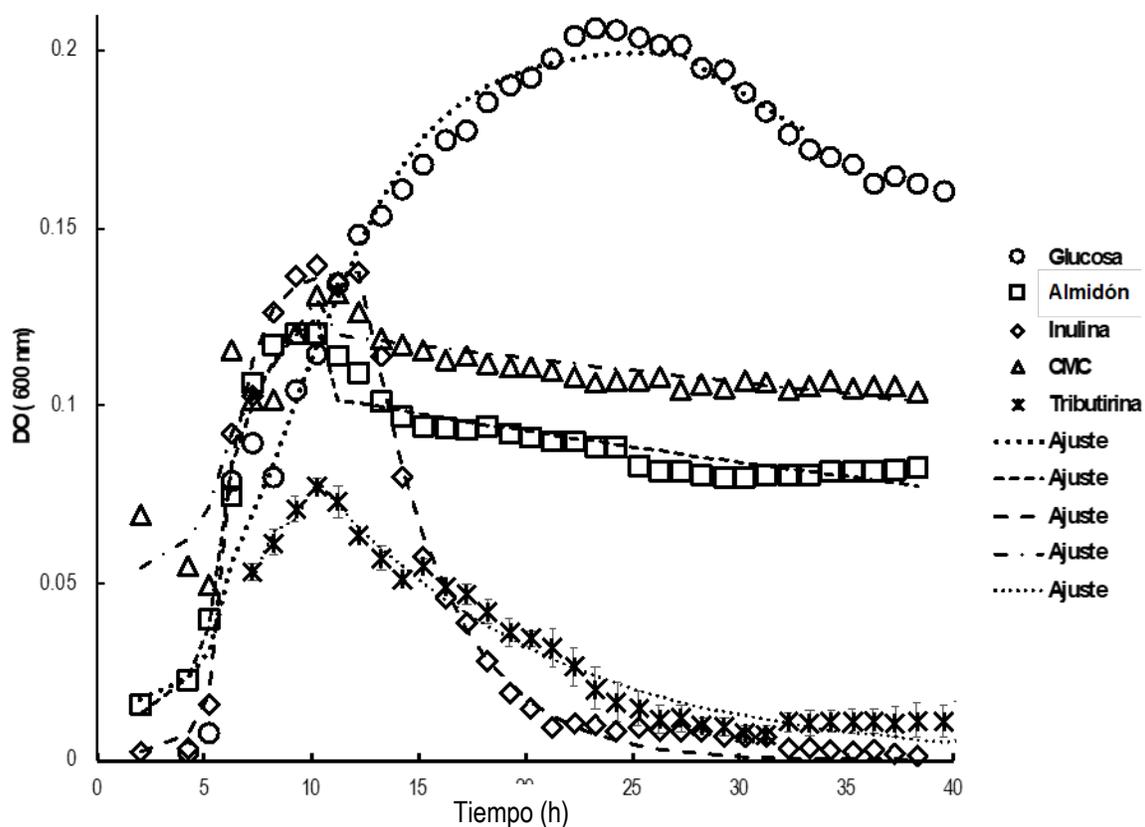
Condición	pH 7		pH 3		pH 2	
	1 h	2 h	1 h	2 h	1 h	2 h
$X_{max}$ (D.O.)	0.314 ± 0.006	0.302 ± 0.015	0.378 ± 0.01	0.357 ± 0.016	0.270 ± 0.000	N/A
$\mu_1$ (h <sup>-1</sup> )	0.323 ± 0.006	0.381 ± 0.018	0.283 ± 0.033	0.328 ± 0.079	0.445 ± 0.000	N/A
$\mu_0$ (h <sup>-1</sup> )	0.012 ± 0.002	0.012 ± 0.001	N/A	N/A	N/A	N/A
R <sup>2</sup>	0.996	0.998	0.998	0.997	0.989	N/A

## 5.2 Cinéticas de crecimiento con diferentes fuentes de carbono

Se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento, para cada una de las cepas (*B. pumilus* y *B. cereus*) las fuentes de carbono fueron glucosa, almidón, inulina, carboxi-metil-celulosa (CMC) y tributirina. Se realizó para cada una de las cinéticas un ajuste como se indica en el apartado de la metodología, para la fase de crecimiento su uso el modelo logístico propuesto por Velhurst-Pearl y para la fase en donde disminuyo la densidad óptica se podría suponer como la fase de descenso en un modelo de crecimiento exponencial invertido; con un coeficiente de correlación mayor a 0.95.

En la figura 3 se muestra la cinética de crecimiento para la cepa *Bacillus pumilus* UAMX. Como se puede observar esta cepa tuvo la capacidad de crecer en todas las fuentes de carbono evaluadas, teniendo el más alto valor DO<sub>max</sub> con glucosa, así también se observa que la fuente de carbono que menos favoreció el crecimiento de esta cepa fue la tributirina. Por otro lado, se observa que la inulina promueve la disminución en la densidad óptica para ambas cepas como se observa en las figuras 4 y 5 (Tabla 5 y 6), así también en el valor de  $\mu$  siendo el valor más alto en esta condición. Este comportamiento, se puede atribuir a la posible adaptación que adquirió del huésped, ya que esta cepa proviene de la microbiota de personas con obesidad, las cuales tenían presente en su dieta rica en calorías provenientes de

azúcares de fácil asimilación y grasas (Mayorga et al., 2016). Existen reportes de actividad lipolítica, relacionada a esterasas en cepas de *B. subtilis* (Ertuğrul et al., 2007; Eggert et al., 2001; Dartois et al., 1194). Todo lo anterior se puede explicar ya que está reportado que la biosíntesis de ácidos grasos es un proceso consumidor de energía y altamente regulado que permite mantener una composición exacta de la membrana que varía con el estado fisiológico de la célula y con la fuente de lípidos en respuesta a las condiciones ambientales, incluidos los medios de cultivo, la temperatura, el oxígeno y el pH (Diomandã et al., 2015). La membrana de *Bacillus* tiene un alto contenido de ácidos grasos ramificados (12-17 carbonos), insaturados y complejos y su biosíntesis es vital. Por ejemplo, *Bacillus cereus* es capaz de integrar ácidos grasos libres exógenos en la membrana celular como respuesta de adaptación a las bajas temperaturas y la anaerobiosis. Por el contrario, algunos lípidos exógenos como los monoglicéridos, los ácidos linolénico, palmítico y esteárico también pueden inhibir el crecimiento de las células vegetativas al disminuir el nivel de ATP intracelular. Por lo tanto, los lípidos exógenos pueden inducir un efecto positivo o negativo sobre las células vegetativas y la germinación de esporas (Diomandã et al., 2015, Lee et al., 2002, Vamanu et al., 2020 y Mcewan et al., 1998). Así, la reducción de la densidad óptica en BP-UAMX después de 10 h de cultivo en presencia de inulina y tributirina, puede suponerse como una respuesta de adaptación con base en la bibliografía y en función a los cambios presentados en las mediciones de densidad óptica. Además, la bioactividad de la microbiota y la biodisponibilidad de los nutrientes también están correlacionadas con la interacción dentro del patrón de la microbiota TGI para respaldar sus funciones fisiológicas, lo que no se consideró en este modelo experimental (Vamanu et al., 2020).



**Figura 4.** Curvas de crecimiento para *B. pumilus* UAMX sobre diferentes fuentes de carbono. Los datos se ajustaron como se indica en los procedimientos experimentales.

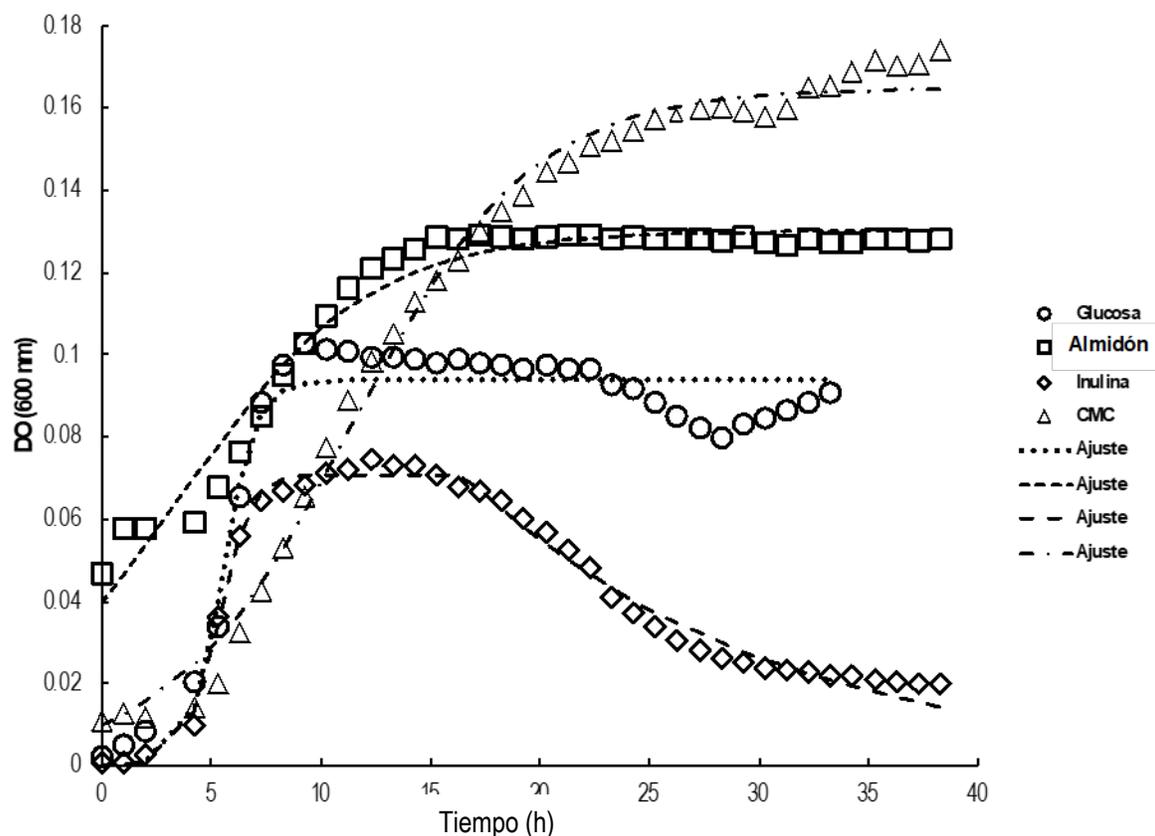
**Tabla 5.** Parámetros cinéticos obtenido por ajuste de datos a ecuación logística y exponencial para *Bacillus pumilus* UAMX a sobre diferentes fuentes de carbono.

	Glucosa	Almidón	Inulina	CMC	Tributirina
<b>X<sub>max</sub></b> <b>(D.O.)</b>	0.201 ±0.019	0.140 ±0.019	0.137 ±0.006	0.172 ±0.010	0.070 ±0.001
<b>μ<sub>1</sub></b> (h <sup>-1</sup> )	0.327 ±0.034	0.614 ±0.104	1.050 ±0.12	0.192 ±0.005	1.555 ±0.02
<b>μ<sub>0</sub></b> (h <sup>-1</sup> )	0.019 ±0.003	0.011 ±0.001	0.293 ±0.125	0.006 ±0.001	0.092 ±0
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9858	0.9696	0.996	0.95653	0.96897

En la figura 5 se muestra la cinética de crecimiento de la cepa *Bacillus cereus* UAMX en diferentes fuentes de carbono. Se observa que no creció en tributirina y que el

crecimiento se favoreció en fuentes de carbono complejas como almidón y CMC. Esto último se puede deber al origen de la cepa, la cual fue aislada de la microbiota de personas delgadas, las cuales estaban probablemente expuestas a mayor en fibra (Mayorga et al., 2016).

En bibliografía se habla de una forma alternativa para que las células de *B. pumilus* enfrenten la exposición a fuentes de carbono no glucolíticas, es la esporulación (Handtke et al., 2018; Mallozzi et al., 2010). Proceso que podríamos estar observando en nuestro caso como descenso en la densidad óptica en los cultivos con inulina y tributirina. Sin embargo, queda como suposición lo anterior debido a no haber realizado dicha medición en este estudio. El cambio en la composición de medio y concentración de la fuente de carbono tiene efecto sobre la esporulación, concentración de biomasa, así como en el consumo de glucosa de *Bacillus thuringiensis* (Lima-Pérez et al., 2019). En la figura 4, se puede observar que existen diferencias en los valores de  $X_{max}$  para *B. pumilus*, entre las fuentes de carbono glucosa, CMC y tributirina. Siendo la mayor  $X_{max}$  la de CMC, lo cual indica que es la fuente de carbono con la cual esta cepa crece mejor. Respecto al valor de  $\mu_1$  (tabla 5) el valor de este parámetro obtenido en las cinéticas con diferentes fuentes de carbono, muestran ser diferentes estadísticamente. En la figura 5, se observa que las fuentes de carbono más complejas (almidón y CMC), favorecen el valor de  $X_{max}$  de *Bacillus cereus* UAMX, respecto al parámetro  $\mu_1$  para esta misma cepa, para este parámetro con las fuentes almidón y CMC son iguales estadísticamente, además de ser los valores más pequeños lo cual indica que estas fuentes de carbono favorecen la tasa específica de crecimiento.



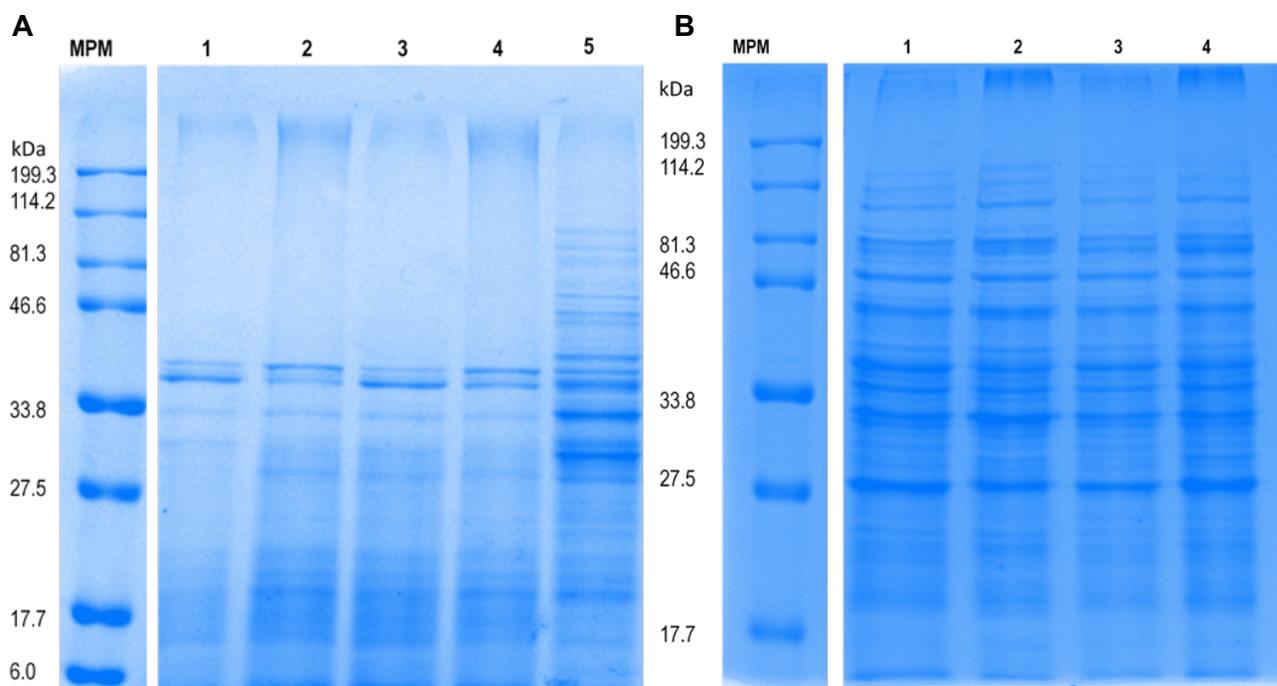
**Figura 5.** Curvas de crecimiento cinético para *B. cereus* UAMX sobre diferentes fuentes de carbono. Los datos se ajustaron como se indica en los procedimientos experimentales.

**Tabla 6.** Parámetros cinéticos obtenido por ajuste de datos a ecuación logística y exponencial para *Bacillus cereus* UAMX sobre diferentes fuentes de carbono.

	Glucosa	Almidón	Inulina	CMC
<b>Xmax (D.O.)</b>	0.099 ± 0.014	0.130 ± 0.002	0.073 ± 0.019	0.168 ± 0.014
<b>μ<sub>1</sub> (h<sup>-1</sup>)</b>	1.312 ± 0.151	0.234 ± 0.033	1.509 ± 0.079	0.241 ± 0.074
<b>μ<sub>0</sub> (h<sup>-1</sup>)</b>	N/A	N/A	0.096	N/A
<b>R<sup>2</sup></b>	0.949	0.982	0.993	0.992

### 5.3 Perfiles de proteínas

Se llevó a cabo la extracción de proteínas totales de los cultivos para cada una de las fuentes de carbono evaluadas, esto para cada una de las cepas. Las muestras fueron tomadas en la fase logarítmica tardía.



**Figura 6.** Perfil electroforético de proteínas de la fracción citosólica, producidas por las cepas de *Bacillus*, bajo diferente fuente de carbono. A) Tris-glicina SDS-PAGE 12 % (*B. pumilus*), MPM. Marcador de peso molecular: High-range (Biorad) carril 1. Glucosa. Carril 2. Almidón. Carril 3. Inulina. Carril 4. CMC. Carril 5. Tributirina. B) Tris-glicina SDS-PAGE 12% (*B. cereus*), MPM. Marcador de peso molecular: High-range (Biorad) carril 1. Glucosa. Carril 2. Almidón. Carril 3. Inulina. Carril 4. CMC.

Se puede ver en el perfil de proteínas (Figura 6) para la cepa *B. pumilus* UAMX, un bandeo similar por debajo de los 46.6 kDa en los carriles 1 a 4, solo cambiando la intensidad de las bandas.

Respecto al carril 5 se observa la presencia de bandas no presentes en los otros carriles entre los 114.2 y 46.6 kDa, lo cual indica una diferencia en expresión de

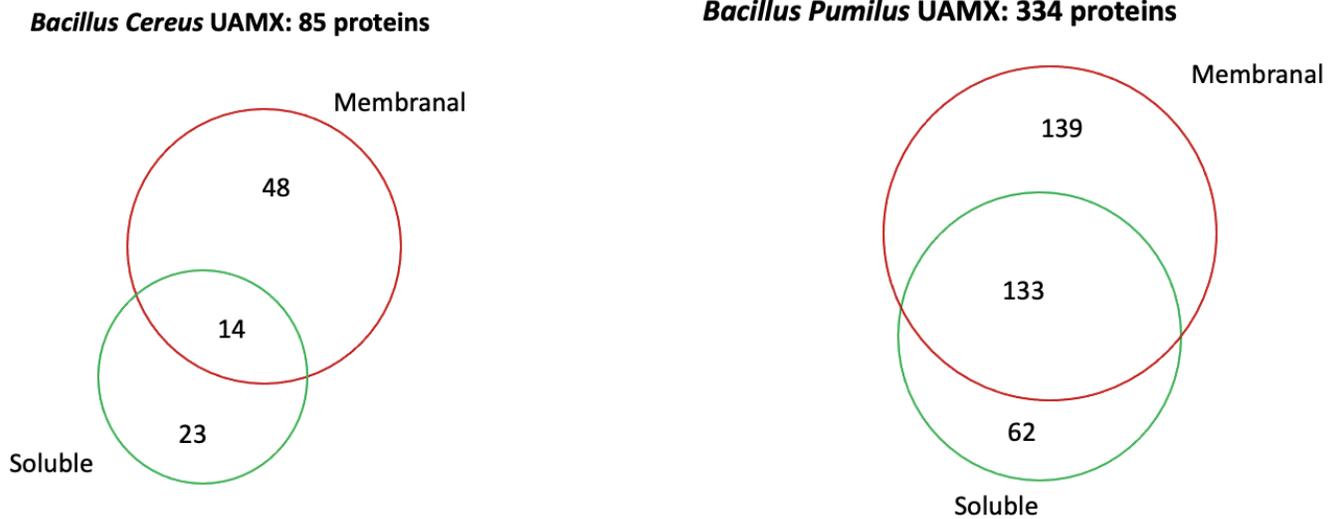
proteínas, cuando el cultivo se hace con tributirina (carril 5) como fuente de carbono. Se ha demostrado el aumento en la abundancia de proteínas asociadas al metabolismo de ácidos grasos, ya que estos pueden ser una fuente valiosa de carbono para las células que no tienen acceso a glucosa o carbohidratos comparables (Voigt et al., 2007; Koburger et al., 2005).

Esto podría explicarse suponiendo una expresión diferencial derivada de varios procesos como la fluidez de la membrana, la lisis y la esporulación fomentado bajo condiciones estresantes, que fueron más evidentes en presencia de tributirina, ya que la fuente de ácidos grasos es un efector importante dentro del metabolismo regulación y adaptación (Diomanda et al., 2015, Koburger et al., 2005, Song et al., 2013 y Voigt et al., 2007). El aumento de proteínas expresadas asociado con el metabolismo de los ácidos grasos puede proporcionar acceso a fuentes alternativas de carbono cuando la glucosa u otros carbohidratos comparables no están disponibles (Koburger et al., 2005 y Voigt et al., 2007). Por lo tanto, exponer a BP-UAMX a las fuentes de carbono no glucolíticas da lugar a nuevas alternativas que pueden abordarse en el futuro.

El perfil de proteínas para la cepa *B.cereus* UAMX (Fig. 16, B), se observa un mismo bandeo en todos los carriles y diferencias en la intensidad de las bandas.

### **5.3.1 Identificación de proteínas**

Se identificaron para *Bacillus pumilus* UAMX 334 proteínas: 139 membranales, 62 de citosol, compartiendo 14 proteínas y para *Bacillus cereus* UAMX 85 proteínas: 48 membranales, 23 de citosol, compartiendo 133 proteínas. (Figura 7). En el caso de las proteínas identificadas para la cepa *B.cereus*, se logró determinar el número de proteínas presentes, no siendo así sus secuencias, lo que delimito para su análisis.



**Figura 7.** Comparación del número de proteínas identificadas.

La tabla 7 muestra la ontología de las proteínas expresadas por las cepas de *Bacillus pumilus* UAMX en el medio suplementado con glucosa como fuente de carbono. La mayoría de las proteínas funcionales identificadas fueron asociadas con el transporte de carbohidratos, la producción de energía, así como con el metabolismo e intermediarios estructurales para el incremento de la biomasa celular, que podrían estar asociados con las tasas de crecimiento y producción celular observadas. Es bien sabido que el género *Bacillus* produce varias enzimas de interés industrial, pero se producen lipasas en pequeñas cantidades que coinciden el análisis proteómico obtenido (Tabla 8) de pocas proteínas asociado con el metabolismo de los lípidos (Song et al., 2013). Los lípidos desempeñan un papel como fuente de energía y fluidez de la membrana para el crecimiento, la esporulación y la supervivencia óptimos de *Bacillus*.

**Tabla 7.** Promedio de categoría de COG *Bacillus pumilus* UAMX

<b>Función</b>	No. genes	%	No. Proteínas citosol	%	No. Proteínas membrana	%
Estructura y dinámica de la cromatina.	1	0.03				
Producción y conversión de energía	159	5.06	11	9.09	29	10.36
Control del ciclo celular, división celular, partición cromosómica	52	1.65	2	1.65	4	1.43
Transporte y metabolismo de aminoácidos	308	9.80	6	4.96	19	6.79
Transporte y metabolismo de nucleótidos	85	2.70	9	7.44	15	5.36
Transporte y metabolismo de carbohidratos	249	7.92	14	11.57	27	9.64
Transporte y metabolismo de coenzimas	170	5.41	5	4.13	9	3.21
Transporte y metabolismo de lípidos	121	3.85	1	0.83	5	1.79
Traducción, estructura ribosomal y biogénesis.	228	7.25	30	24.79	56	20.00
Transcripción	279	8.87	11	9.09	24	8.57
Replicación, recombinación y reparación.	110	3.50	6	4.96	18	6.43
Biogénesis de pared celular/membrana/envoltura	181	5.76	1	0.83	4	1.43
motilidad celular	61	1.94	0	0.00	0	0.00
Modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperonas	118	3.75	11	9.09	16	5.71
Transporte y metabolismo de iones inorgánicos	158	5.03	3	2.48	9	3.21
Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios	73	2.32	2	1.65	5	1.79
Solo predicción de función general	277	8.81	1	0.83	10	3.57
Función desconocida	183	5.82	2	1.65	5	1.79
Mecanismos de transducción de señales	177	5.63	4	3.31	15	5.36
Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular	27	0.86	1	0.83	2	0.71
Mecanismos de defensa	69	2.19	1	0.83	6	2.14
Estructuras extracelulares	2	0.06	0	0.00	0	0.00
Mobiloma: profagos, transposones	56	1.78	0	0.00	2	0.71

La biosíntesis de ácidos grasos es un proceso consumidor de energía y altamente regulado que permite mantener una composición exacta de la membrana que varía con el estado fisiológico de la célula y con la fuente de lípidos como respuesta a las

condiciones ambientales, incluyendo los medios de cultivo, la temperatura, el oxígeno y el pH (Diomanda et al., 2015). La membrana de *Bacillus* tiene un alto contenido de ácidos grasos ramificados (12-17 carbonos), insaturados y complejos y su biosíntesis es vital. Por ejemplo, *Bacillus cereus* es capaz de integrar ácidos grasos libres en la membrana celular como respuesta de adaptación a las bajas temperaturas y anaerobiosis. Por el contrario, algunos lípidos exógenos como los monoglicéridos, linolénico, los ácidos palmítico y esteárico también pueden inhibir el crecimiento de las células vegetativas al disminuir el nivel de ATP intracelular. Por lo tanto, los lípidos exógenos pueden inducir una reacción positiva o negativa sobre las células vegetativas y la germinación de esporas (Diomanda et al., 2015, Lee et al., 2002, McEwan et al., 2004 y Vamanu et al., 2020). Así, la reducción de las células vegetativas de BP-UAMX después de 10 h de cultivo en presencia de inulina y tributirina se puede suponer que está relacionado con el inicio de la esporulación como respuesta de adaptación a estas fuentes de carbono, ya que la bibliografía habla de comportamientos similares. Además, la bioactividad de la microbiota y la biodisponibilidad de los nutrientes también están correlacionadas con la interacción dentro del patrón de microbiota TGI para apoyar sus funciones fisiológicas, que no fue considerado bajo este modelo experimental.

**Tabla 8.** Ontología de proteínas expresadas por *Bacillus pumilus* UAMX\*

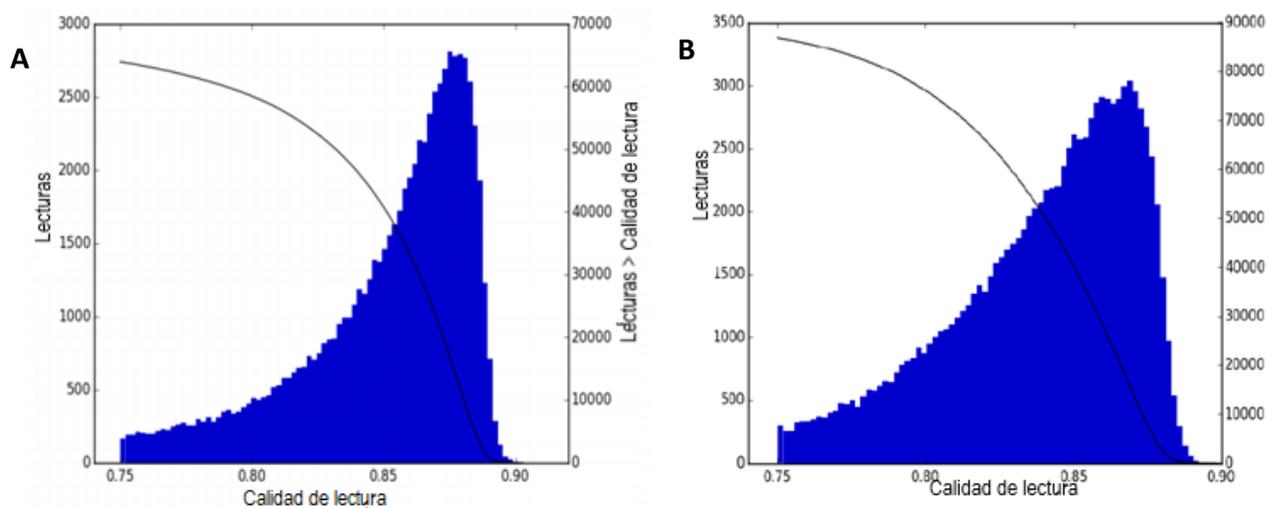
Ruta metabólica	Número de proteínas	
	Citosol	Membrana
00010 Glucólisis / Gluconeogénesis	8	14
00020 Ciclo de citrato (TCA cicle)	3	11
00030 Vía de las pentosas fosfato	3	7
00051 Metabolismo de la fructosa y manosa	2	3
00052 Metabolismo de galactosa	0	2
00061 Biosíntesis de ácidos grasos	1	2
00071 Degradación de ácidos grasos	1	1
00190 Fosforilación oxidativa	3	5
00220 Biosíntesis de arginina	1	1
00261 Biosíntesis de monobactámicos	1	1
00290 Biosíntesis de valina, leucina e isoleucina	1	2
00500 Metabolismo del almidón y la sacarosa	0	3
00561 Metabolismo de glicerolípidos	3	4
00564 Metabolismo de glicerofosfolípidos	1	2
00630 Metabolismo de glioxilatos y dicarboxilatos	2	5
00790 Biosíntesis de folato	1	1
00910 Metabolismo del nitrógeno	1	1
00920 Metabolismo del azufre	1	1
00983 Metabolismo de fármacos - otras enzimas	2	2
01051 Biosíntesis de ansamicina	0	1
01501 resistencia a betalactámicos	1	1
02010 transportadores ABC	2	3
02024 Detección de quórum	3	6
02040 Ensamble flagelar	2	2
02060 Sistema de fosfotransferasa (PTS)	2	3

## 5.4 Secuenciación de genoma

Los genomas completos de ambas cepas de estudio fueron secuenciados, estos mostraron una calidad de lectura mayor a 0.80 para ambos casos (Figura 8), así también el número de bases leídas por cada genoma, siendo el genoma de *B. cereus* 1.5 (Tabla 9) más grande al de la cepa de la especie *B. pumilus*.

**Tabla 9.** Resultados de secuenciación de genoma.

Cepa	Número de bases leídas	Lecturas	N50	Largo de lectura	Calidad de lectura
<i>B. pumilus</i> UAMX	982,233,847	75,092	19,050	13,080	0.851
<i>B. cereus</i> UAMX	1,467,343,147	103,477	19,346	14,180	0.839



**Figura 8.** Calidad de lecturas por Polimerasa. A) *Bacillus pumilus* UAMX, B) *Bacillus cereus* UAMX

### 5.4.1 Ensamble de genomas

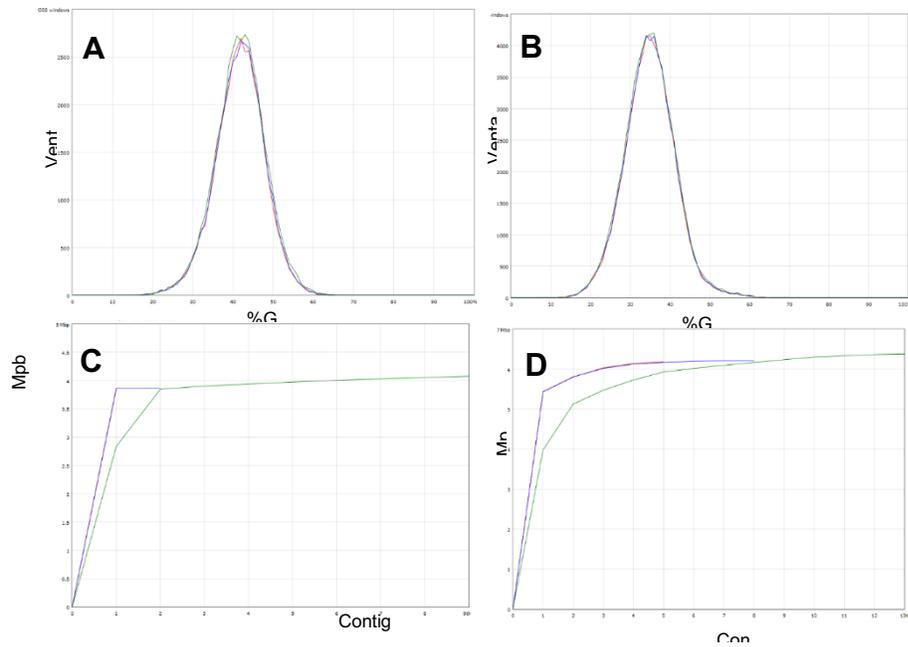
De los tres softwares ensambladores (CANU, SMRTOOLS y Unicycler) de secuencias generadas por tecnologías de secuenciación en tiempo real de una sola molécula (SMRT) mejor ensamble obtenido con el software Canu (Figura 9, C y D), el cual arrojó el menor número de Contigs y el mejor valor de N50 (Tabla 10), cerrando así todo el genoma de la cepa *B. pumilus*.

En la Tabla 10 se observa el número de secuencias codificantes (CDS), ARN<sub>r</sub> y ARN<sub>t</sub>. El número de éstos es proporcional al tamaño del genoma, no siendo así para el porcentaje de GC, el cual está relacionado con una serie de factores, incluido el tamaño del genoma y la mutación de este (Bentley et al., 2004), si la bacteria es de vida libre o no (Rocha et al., 2002), (Woolfit et al., 2003), el medio ambiente (Foerstner et al., 2005), la aerobiosis (Naya et al., 2002), utilización de nitrógeno (McEwan et al., 1998) y posiblemente temperatura (Musto et al., 2006). Es decir que el porcentaje de GC será distinto entre especies y también entre cepas.

**Tabla 10. Características generales de los genomas**

	<i>B. pumilus</i> UAMX	<i>B. cereus</i> UAMX
No. acceso Web NCBI		
<b>Software de ensamble</b>	Canu	Canu
<b>Número de contigs</b>	1	5
<b>Contig más largo (pb)</b>	3,854,893	5,431,672
<b>N50</b>	3,854,893	5,431,672
<b>Tamaño (pb)</b>	3,854,893	6,185,599
<b>Contenido G+C (%)</b>	42	34.95
<b>Secuencias codificantes (CDS)</b>	3,192	6,094
<b>ARN ribosomal</b>	24	42
<b>ARN transferencia</b>	81	106
<b>ARN tm</b>	1	1

## **5.4.1 CALIDAD DE SECUENCIAS**



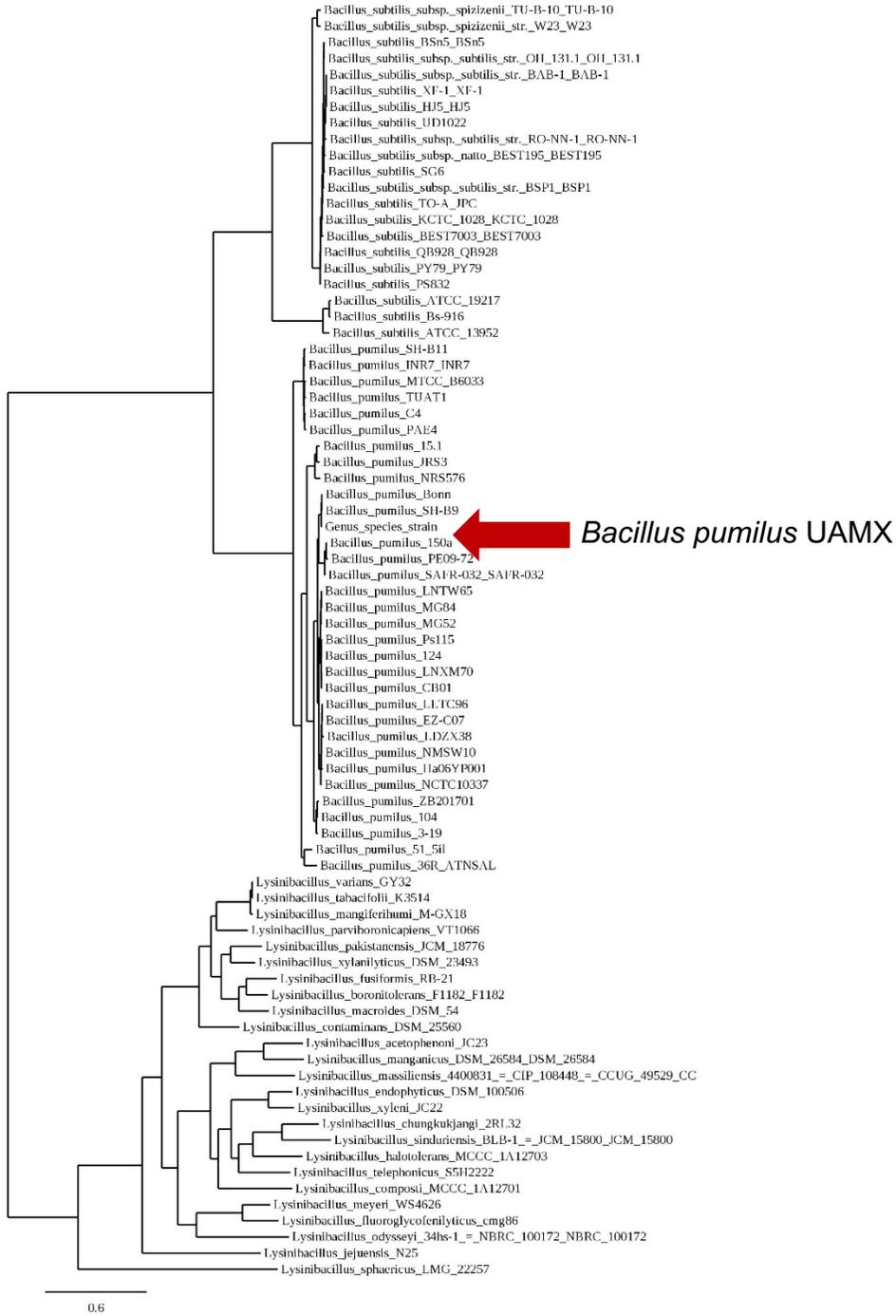
**Figura 9.** Comparación entre softwares ensambladores. A (*B. pumilus* UAMX) y B (*B. cereus* UAMX) muestran el número de ventanas para cada porcentaje de GC. Los contigs se dividen en ventanas no superpuestas de 100 pb. Los gráficos C y D enumeran el número contigs generados por cada software ensamblador con el cual se cubre el tamaño total del genoma. Las líneas roja, azul y verde corresponden a CANU, SMRTTOOLS y Unicycler respectivamente.

### 5.5 Número de acceso GenBank para las cepas de estudio

Los genomas completos de las cepas de estudio fueron secuenciados y depositados en GenBank (NCBI) con los números de acceso asignados “*Bacillus pumilus* str. UAMX isolate”: CP058951 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP058951.1/>), *Bacillus cereus* str UAMX isolate: JAJNEN010000000 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JAJNEN000000000>).

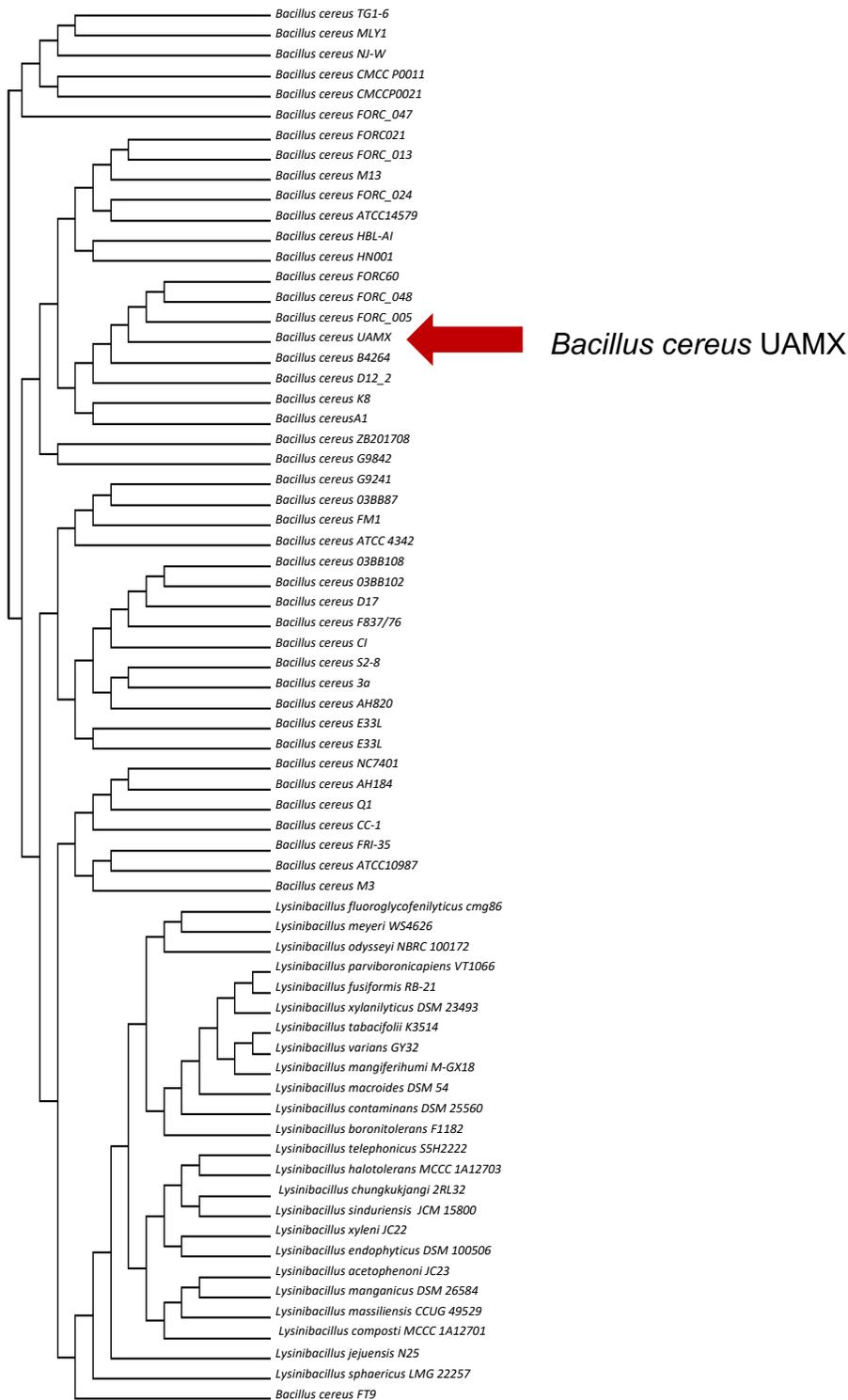
En la figura 10, se observa que la cepa *B. pumilus* UAMX, pertenece al grupo de las cepas de *B. pumilus* y está estrechamente relacionada con las cepas Boon y SH-B9. El grupo de *Lysinibacillus* como era de esperarse, se encuentra separado del género *Bacillus*.

### 5.5.1 Identificación filogenómica de las cepas



**Figura 10.** Árbol filogenómico creado a partir de coregenoma de las cepas *B. pumilus*, *B. subtilis* y *Lysinibacillus*.

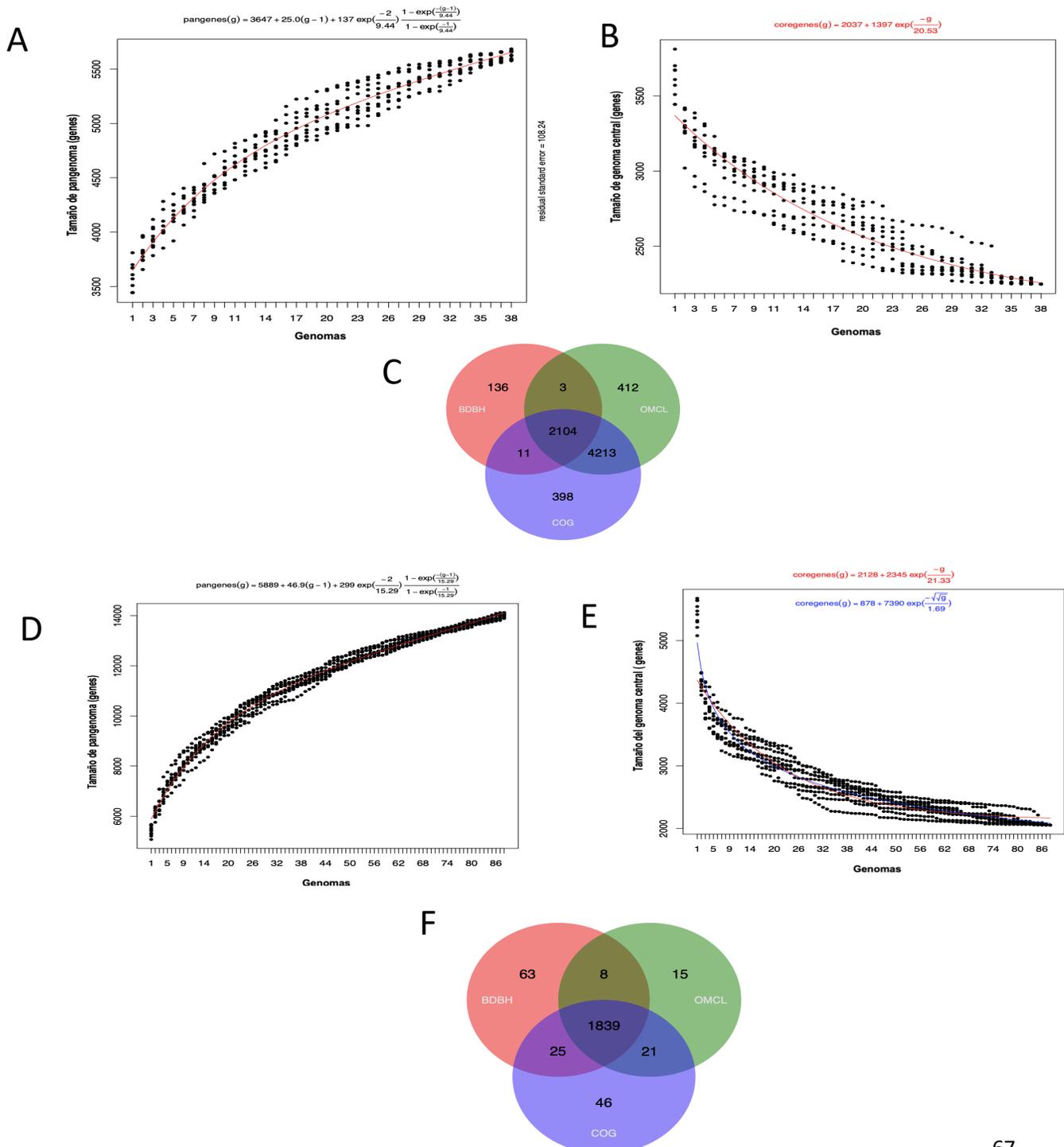
En la figura 11, se observa que la cepa *B. cereus* UAMX, pertenece al grupo de las cepas de *B. cereus* y está estrechamente relacionada con las cepas FORC esta última aislada de cultivo de pepino. El grupo de *Lysinibacillus* como era de esperarse, se encuentra separado del género *Bacillus* aunque llama la atención la cercanía entre algunas cepas de *B. cereus* con *Lysinibacillus* esto puede deberse a que aún hay en base de datos cepas de *Bacillus* que no han sido reclasificadas. Autores como Ahmed et al. (2007) y Xu et al., (2015) señalan la gran interrelación entre los géneros *Lysinibacillus* and *Bacillus*, donde el pangenoma de *B. cereus* y *Lysinibacillus* muestra que comparten 1693 genes, un número mayor que el que comparten *B. cereus* and *B. subtilis* que es de 1,675 genes.



**Figura 11.** Árbol filogenómico creado a partir de coregenoma de las cepas *B. cereus* y *Lysinibacillus*.

## 5.6 Pangenoma

El pangenoma representa la suma del genoma central y el genoma prescindible, éste último conformado por genes presentes en algunas (Figura 12), pero no en todas, las cepas estudiadas, así como los genes específicos de la cepa (Tettelin et al., 2008).



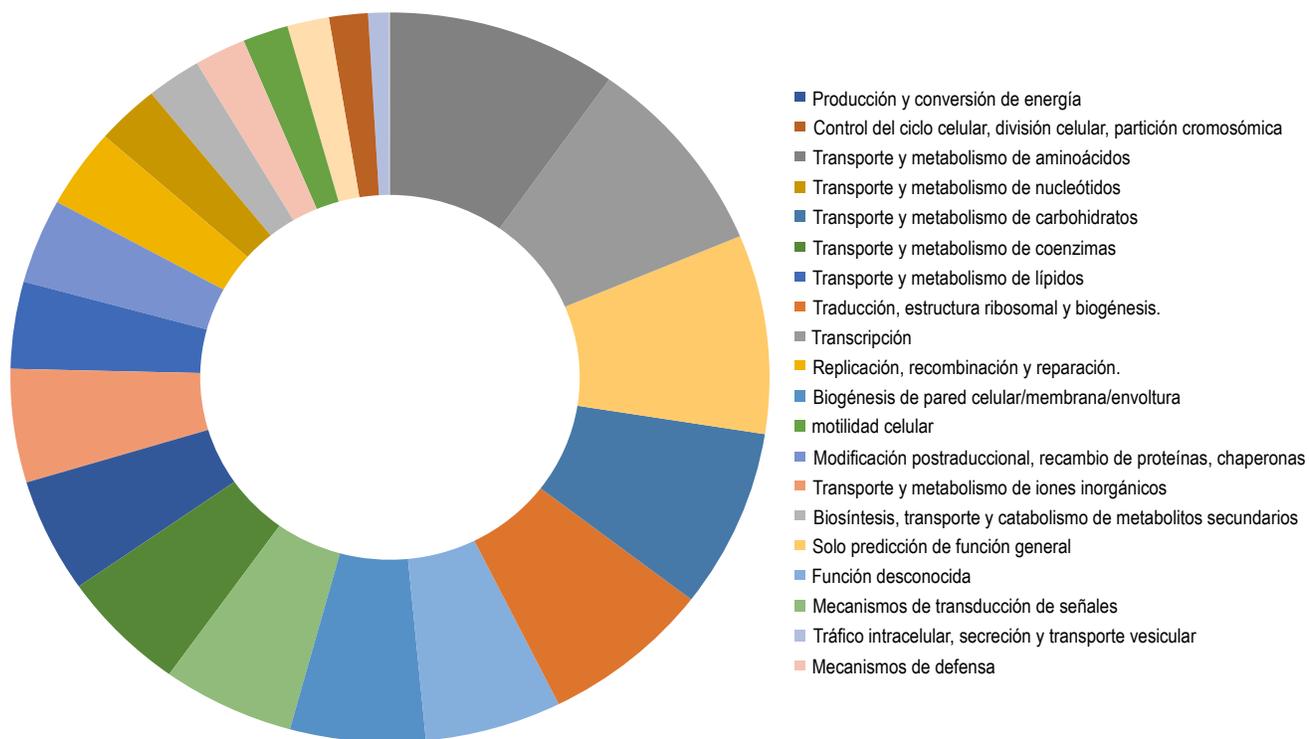
**Figura 12.** Análisis de pangenoma de los genomas *Bacillus pumilus* y *Bacillus cereus*. (A y D) Estimación del tamaño del pangenoma con el ajuste de Tettelin. (B y E ) Estimación del tamaño del genoma central con los ajustes de Tettelin (azul) y Willenbrock (rojo). (C y F) Diagrama de Venn de genomas centrales generados por las estrategias BDBH, COG y OMCL.

El pangenoma para *B. pumilus* (Figura 12 B), presenta un aumento en número de genomas aumentando el número de familias de genes, indicando que se encuentra abierto. Para el caso del pangenoma de *B.cereus*, se observa que aumenta con el número de nuevas familias de genes y el número de genomas, que corresponde a un pangenoma abierto también. Cabe señalar que en la literatura consultada no se encontraron reportes específicos sobre el pangenoma de las cepas estudiadas.

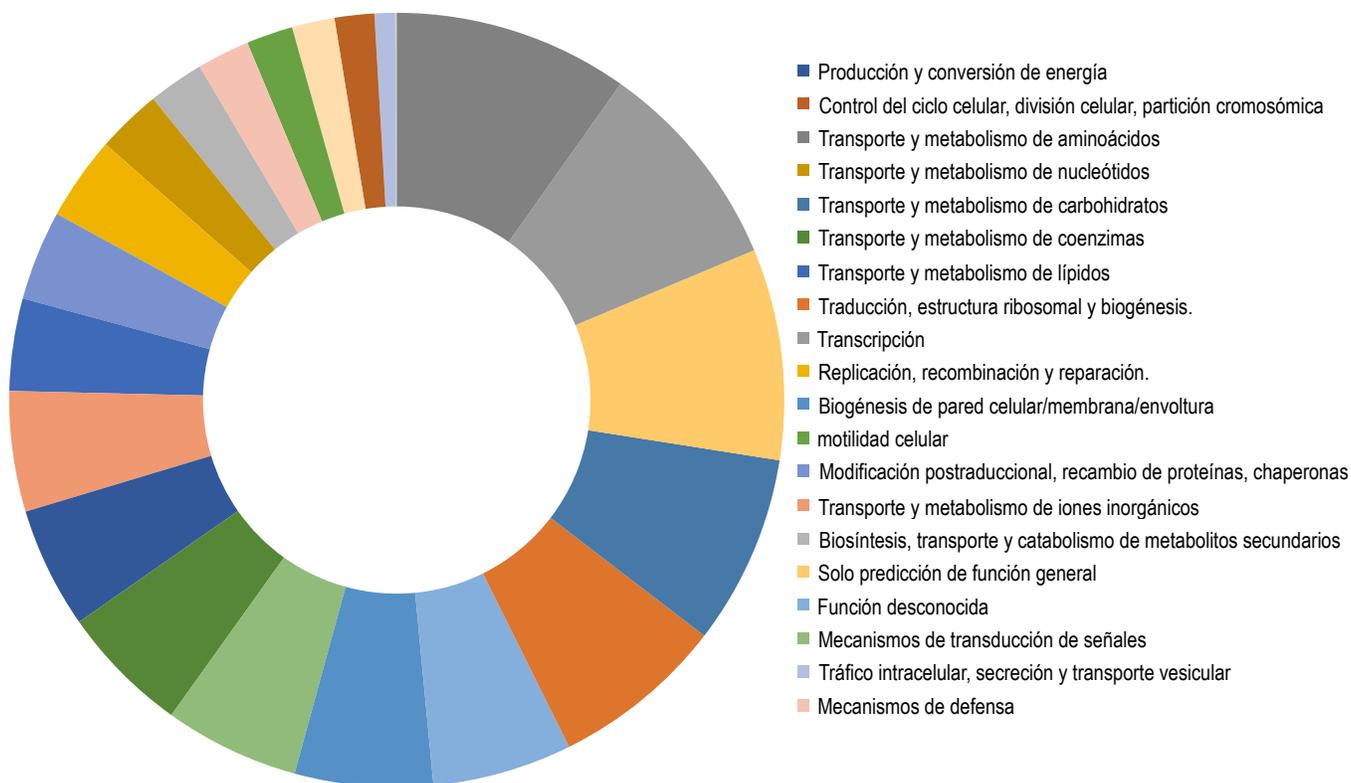
### 5.7 Agrupación de genes por función (COG)

Se agruparon en grupos los genes de los genomas antes ensamblados, para lo cual los genomas se sometieron a la COG (Cluster Orthogonal Group) Database del sitio Web NCBI. El mayor porcentaje (Figura 13) de los genes de la cepa *B. pumilus* están relacionados con: el metabolismo y transporte de aminoácidos (9.79%), transcripción (8.87%), traducción (7.25%), metabolismo y transporte de carbohidratos (7.92 %); así también un alto porcentaje de genes están destinados a funciones generales (8.81 %).

Respecto la cepa de *B. cereus* (Figura 14), el mayor porcentaje es para el grupo asociado a funciones generales (10.37%) siguiendo, la transcripción (9.14%), el metabolismo y transporte de aminoácidos (9.0%), además del transporte y metabolismo de carbohidratos (6.29 %).



**Figura 13.** Agrupación de genes por función del genoma de *B. pumilus* UAMX



**Figura 14.** Agrupación de genes por función del genoma de *B. cereus* UAMX

## 5.8 Predicción de rutas metabólicas

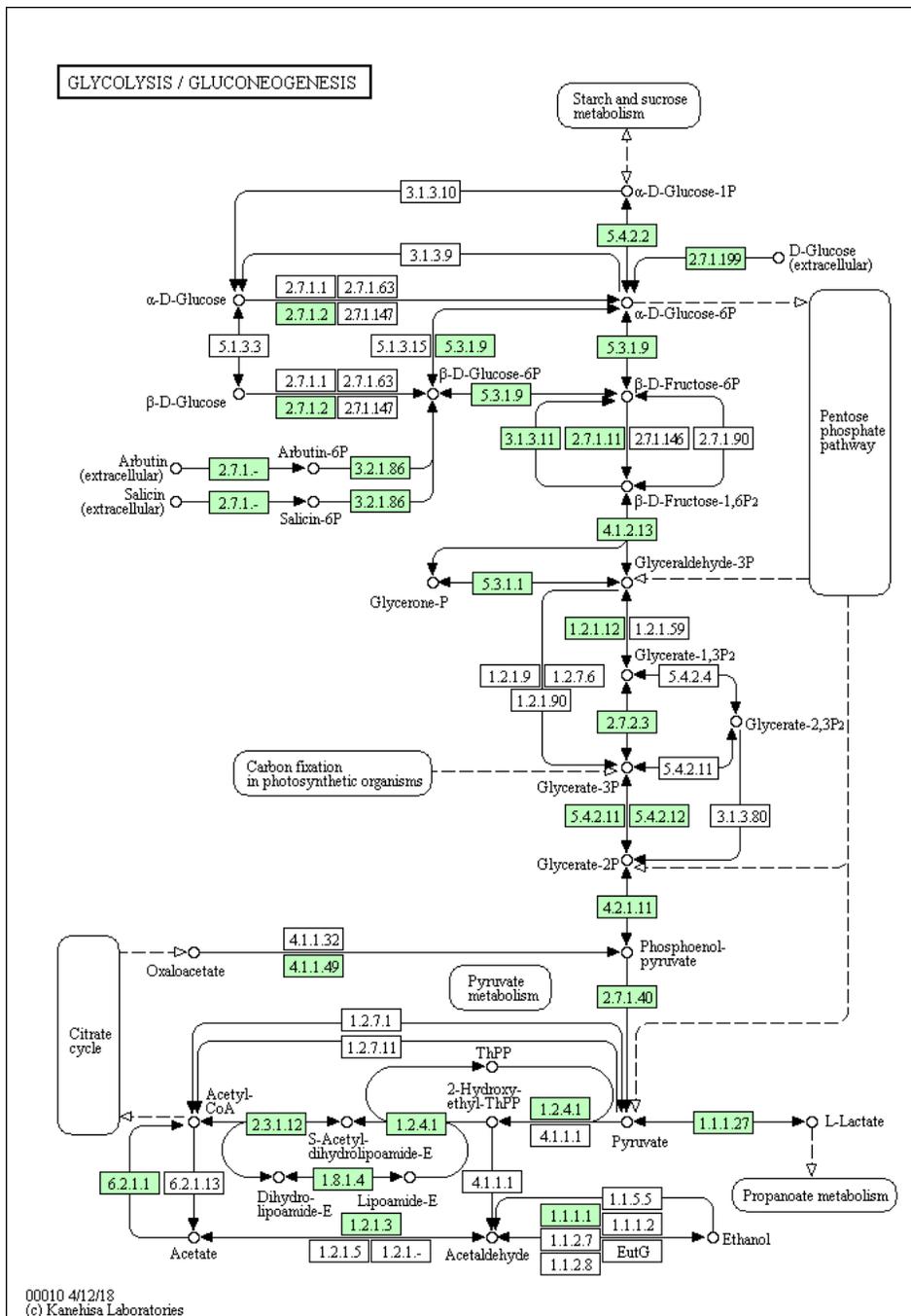
El agrupamiento por COG (Tabla 11), nos indicó el porcentaje de genes que llevan alguna función metabólica, pero no a través de que ruta, para esto se realizó la predicción de rutas metabólicas que pueden llevar utilizando la enciclopedia KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

**Tabla 11.** Genes asociados a metabolismo, degradación de compuestos y resistencia.

Ruta metabólica	Número de genes	
	<i>Bacillus pumilus</i> UAMX	<i>Bacillus cereus</i> UAMX
00010 Glucólisis / Gluconeogénesis	28	32
00020 Ciclo de citrato (ciclo CAT )	18	23
00030 Vía de las pentosas fosfato	24	22
00500 Metabolismo de almidón y sacarosa	19	28
00520 Metabolismo de azúcar amino y azúcar nucleótido	28	35
00620 Metabolismo del piruvato	28	35
00071 Degradación de ácidos grasos	9	13
00190 Metabolismo de glioxilato y dicarboxilato	24	26
00061 Biosíntesis de ácidos grasos	15	15
00261 Biosíntesis de monobactámicos	6	6
00521 Biosíntesis de estreptomicina	7	7
00405 Biosíntesis de fenacina	2	2
00362 Degradación de benzoato	4	4
00627 Degradaedación de aminobenzoato	1	2
05150 Infeccción Staphylococcus aureus	5	8
01501 Resistencia a beta-lactámicos	9	16
01502 Resistencia Vancomicina	6	7
01503 Resistenciaaa péptidos antimicrobianos cationicos	7	8
01523 Resistencia anfolitas	4	5

Este análisis nos predijo que ambas cepas de estudio pueden llevar a cabo rutas metabólicas como son: Glucolisis, Gluconeogénesis, ciclo del ácido tricarboxílico (ciclo TCA), vía pentosas fosfato, metabolismo del piruvato así como metabolismo de almidón y sacarosa; también presentan genes de las vías de degradación de ácidos grasos. Además, tienen la capacidad de llevar a cabo la biosíntesis de antibióticos como estreptomina y monobactámicos.

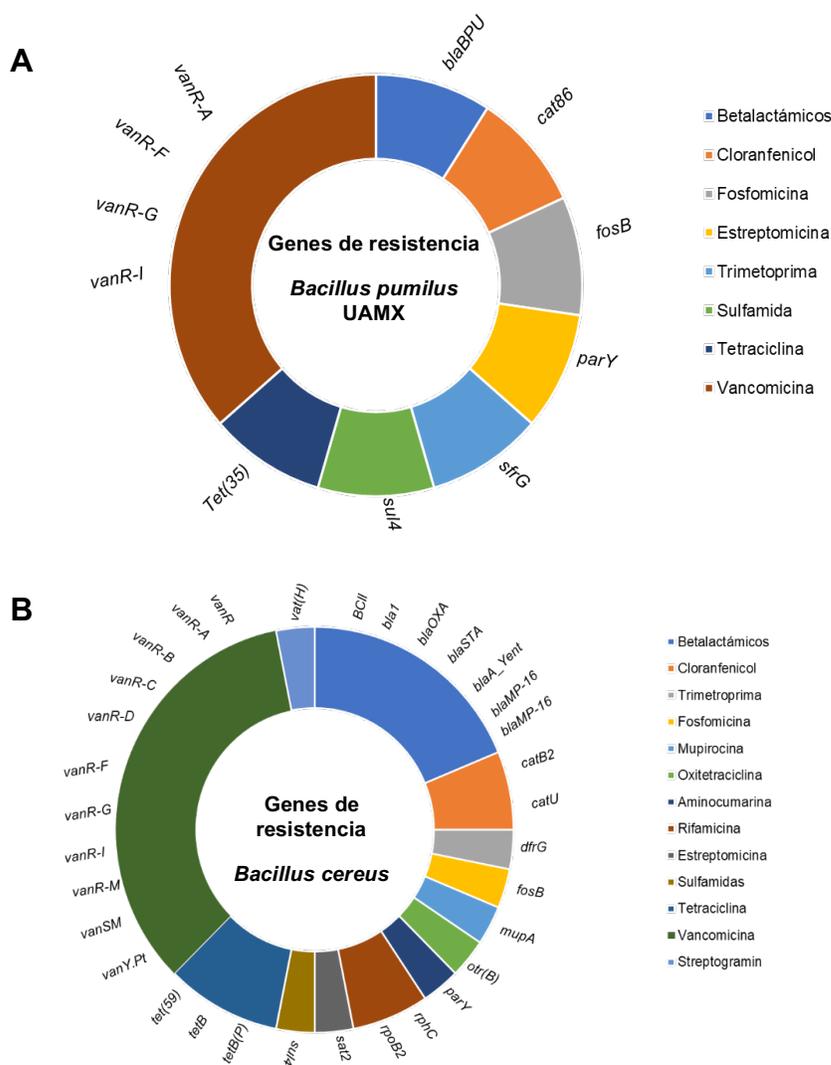
Para cada una de las vías metabólicas que se predicen la enciclopedia KEEG, enumera los genes y da la ruta en la cual éstos podrían estar involucrados (Figura 15).



**Figura 15.** Ruta de la glucólisis y gluconeogénesis enciclopedia KEGG, genes en color verde son genes presentes en los genomas de las cepas de estudio.

## 5.9 Identificación de genes de resistencia a antibióticos

Para la identificación de genes asociados a resistencia a antibióticos, se utilizó la base de datos CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database). Se observa (Figura 16) una gran cantidad de genes asociados a la resistencia de antibióticos en ambos genomas, predominando los genes asociados a la resistencia a vancomicina para ambas cepas de estudio. *Bacillus cereus* UAMX presentó en mayor número genes asociados a resistencia de antibióticos betalactámicos y tetraciclina.



**Figura 16.** Presencia de genes asociados a resistencia de antibióticos en los genomas. A) *Bacillus pumilus* UAMX. B) *Bacillus cereus* UAMX.

## 6. CONCLUSIONES

Ambas cepas de *Bacillus* estudiadas mostraron una adaptabilidad a las condiciones del TGI simuladas, lo que indica que estas cepas podrían tener la capacidad de sobrevivir en el intestino. Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que BP-UAMX y BC-UAMX podrían ser colonizadoras de la microbiota del TGI.

Las determinaciones realizadas en este trabajo mostraron que las cepas BP-UAMX y BC-UAMX, tienen la capacidad de metabolizar todas las fuentes de carbono evaluadas a excepción de tributirina para la cepa de la especie *cereus*. Se presentando un mejor crecimiento en fuentes complejas en la cepa BC-UAMX en comparación a la cepa BP-UAMX que creció mejor en glucosa. En general la cepa BP-UAMX presentó valores más altos de D.O.max en comparación con BC-UAMX. Se observó que la inulina disminuyó en la lectura de la densidad óptica en ambas cepas.

Existen diferencias en los perfiles de proteínas entre cepas. El perfil de proteínas del crecimiento en tributirina para la cepa BP-UAMX es el cual presenta mayor número de bandas de proteínas expresadas en comparación con las demás fuentes de carbono.

La secuenciación de los genomas para este estudio, con la tecnología PacBio se vio favorecida ya que en el caso de la cepa BP-UAMX, se logró cerrar todo el genoma y para la cepa BC-UAMX, el número de contigs fue reducido.

Las cepas estudiadas están filogenéticamente estrechas con las cepas *Bacillus pumilus* Boon y *Bacillus cereus* FORC 60. El pangenoma de *Bacillus cereus* y *Bacillus pumilus*, presentan ambos en el número de familia de genes al agregar genomas por lo que se pueden considerar pangenomas abiertos, aunque en el caso de *Bacillus pumilus* sería necesario agregar más genomas para verificarlo.

La mayoría de los genes presentes en ambos genomas están asociados a funciones generales de transcripción, traducción y metabolismo de aminoácidos y carbohidratos. Se presentó un amplio número de genes asociados a resistencia a

antibióticos, principalmente a vancomicina, aunque se no encontró evidencia de su expresión.

## **7. PERSPECTIVAS**

Este estudio representó un primer acercamiento a la comprensión de la fisiología de BP-UAMX y BC-UAMX. Aunque el propósito de este estudio fue evaluar la resistencia de ambas cepas a condiciones gástricas simuladas, la secuenciación genómica y el análisis bioinformático revelaron vías metabólicas alternativas en las cepas de estudio que requieren más análisis a profundidad. Para poder corroborar los resultados obtenidos respecto a la posible supervivencia a condiciones gastrointestinales de las cepas estudiadas y evaluar la posible esporulación. Además, se podría realizar en un futuro pruebas como son: adherencia a líneas celulares caco-2 así como co-agregación, también se podría evaluar la resistencia a antibióticos de manera in situ y la búsqueda y purificación de proteínas de interés industrial como son las lipasas que mostro tener presentes en su genoma. Se propone realizar un estudio de transcriptómica (Secuenciación masiva de ARN), ya que el estudio de proteómica no se logró realizar con satisfacción en este trabajo dicho estudio nos podría dar respuesta de nivel de expresión de los genes que se encontraron en el genoma de las cepas de estudio.

## REFERENCIAS

- Aebersold, R., & Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422(6928), 198-207.
- Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A., & Fujiwara, T. (2007). Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(5), 1117-1125.
- Alou, M. T., Fournier, P. E., Raoult, D. (2016). "*Bacillus mediterraneensis*," a new bacterial species isolated from human gut microbiota. *New Microbes and New Infections*, 12, 86-87.
- Álvarez Calatayud, G., Guarner, F., Requena, T., & Marcos, A. (2018). Dieta y microbiota. Impacto en la salud. *Nutrición Hospitalaria*, 35(SPE6), 11-15.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J; MetaHIT Consortium, Antolín M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariáz G, Dervyn R, Foerstner KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Mérieux A, Melo Minardi R, M'rini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, May 12;473 (7346):174-80.
- Baldwin, M. A. (2004). Protein identification by mass spectrometry: issues to be considered. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3(1), 1-9.
- Bentley, S. D., & Parkhill, J. (2004). Comparative genomic structure of prokaryotes. *Annual Review of Genetics*, 38, 771-791.
- Boguski, M. S., & McIntosh, M. W. (2003). Biomedical informatics for proteomics. *Nature*, 422(6928), 233-237.

- Bourlioux, P., Koletzko, B., Guarner, F., & Braesco, V. (2003). The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," held in Paris, June 14, 2002. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(4), 675-683.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brüssow, H., Canchaya, C., & Hardt, W. D. (2004). Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 560-602.
- Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., & Burcelin, R. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 57(6), 1470-1481.
- Cebra, J. J., Jiang, H. Q., Boyko, N., & Tlaskalova-Hogenova, H. (2005). The role of mucosal microbiota in the development, maintenance, and pathologies of the mucosal immune system. *Mucosal Immunology*, Elsevier Press 3th edición 335-368.
- Contreras-Moreira, B., & Vinuesa, P. (2013). GET\_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), 7696-7701.
- Dartois, V., Coppee, J. Y., Colson, C., & Baulard, A. (1994). Genetic analysis and overexpression of lipolytic activity in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(5), 1670-1673.
- Daubin, V., & Ochman, H. (2004). Bacterial genomes as new gene homes: the genealogy of ORFans in *E. coli*. *Genome research*, 14(6), 1036-1042.
- David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ, Turnbaugh PJ. (2014) Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 23;505(7484):559-63.
- del Campo-Moreno, R., Alarcón-Cavero, T., D'Auria, G., Delgado-Palacio, S., & Ferrer-Martínez, M. (2018). Microbiota and Human Health: characterization techniques and transference. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English Edition)*, 36(4), 241-245.
- DiBaise, J. K., Zhang, H., Crowell, M. D., Krajmalnik-Brown, R., Decker, G. A., & Rittmann, B. E. (2008, April). Gut microbiota and its possible relationship with obesity. In *Mayo clinic proceedings Elsevier Press (Vol. 83, No. 4, pp. 460-469)*.

- Diomande, S. E., Guinebretière, M. H., Broussolle, V., & Brillard, J. (2015). Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. *Frontiers in Microbiology*, 6, 813.
- Eggert, T., van Pouderooyen, G., Dijkstra, B. W., & Jaeger, K. E. (2001). Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties, and three-dimensional structure. *FEBS letters*, 502(3), 89-92.
- Ertuğrul, S., Dönmez, G., & Takaç, S. (2007). Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials*, 149(3), 720-724.
- Fakhry, S., Sorrentini, I., Ricca, E., De Felice, M., & Baccigalupi, L. (2008). Characterization of spore forming Bacilli isolated from the human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 105(6), 2178-2186.
- Feil, E. J. (2004). Small change: keeping pace with microevolution. *Nature Reviews Microbiology*, 2(6), 483-495.
- Foerster, K. U., Von Mering, C., Hooper, S. D., & Bork, P. (2005). Environments shape the nucleotide composition of genomes. *EMBO reports*, 6(12), 1208-1213.
- Gatto, M., Muratori, S., & Rinaldi, S. (1988). A functional interpretation of the logistic equation. *Ecological Modelling*, 42(2), 155-159.
- Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Gueye, S. A., Lupetti, A., & Senesi, S. (2015). Survival and persistence of *Bacillus clausii* in the human gastrointestinal tract following oral administration as spore-based probiotic formulation. *Journal of Applied Microbiology*, 119(2), 552-559.
- Görg, A., Weiss, W., & Dunn, M. J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4(12), 3665-3685.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072-1075.
- Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., & Aebersold, R. (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology*, 17(10), 994-999.
- Harvey, D.J. 2019, Mass Spectrometry Ionization Methods Overview. En Encyclopedia of Analytical Science 3th Editors: Paul Worsfold, Colin Poole, Alan Townshend, Manuel Miró. Academic Press, 398-410
- Hong, H. A., To, E., Fakhry, S., Baccigalupi, L., Ricca, E., & Cutting, S. M. (2009). Defining the natural habitat of *Bacillus* spore-formers. *Research in microbiology*, 160(6), 375-379.

- Herrero de Lucas, E., Cachafeiro Fuciños, L., Asensio Martín, M. J., & Cáceres Giménez, N. (2018). Interacciones entre el huésped y la microbiota. *Medicine: Enfermedades infecciosas (IV) Interacción bacteria-huésped. Respuesta inflamatoria sistémica. Infección Nosocomial*, 12(52): 3059-3065.
- Hooper, L. V., & Gordon, J. I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292(5519), 1115-1118.
- Hoyles, L., Honda, H., Logan, N. A., Halket, G., La Ragione, R. M., & McCartney, A. L. (2012). Recognition of greater diversity of *Bacillus* species and related bacteria in human faeces. *Research in Microbiology*, 163(1), 3-13.
- Ilinskaya ON, Ulyanova VV, Yarullina DR and Gataullin IG (2017) Secretome of Intestinal Bacilli: A Natural Guard against Pathologies. *Frontiers in Microbiology*. 8:1666.
- James, P. (1997). Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 30(4), 279-331.
- Jobin, M. P., Clavel, T., Carlin, F., & Schmitt, P. (2002). Acid tolerance response is low-pH and late-stationary growth phase inducible in *Bacillus cereus* TZ415. *International Journal of Food Microbiology*, 79(1-2), 65-73.
- Johnson, R. S., Davis, M. T., Taylor, J. A., & Patterson, S. D. (2005). Informatics for protein identification by mass spectrometry. *Methods*, 35(3), 223-236.
- Kalliomäki, M. A., & Walker, W. A. (2005). Physiologic and pathologic interactions of bacteria with gastrointestinal epithelium. *Gastroenterology Clinics*, 34(3), 383-399.
- Kleiman, S. C., Carroll, I. M., Tarantino, L. M., & Bulik, C. M. (2015). Gut feelings: a role for the intestinal microbiota in anorexia nervosa?. *The International Journal of Eating Disorders*, 48(5), 449.
- Koburger, T., Weibezahn, J., Bernhardt, J., Homuth, G., & Hecker, M. (2005). Genome-wide mRNA profiling in glucose starved *Bacillus subtilis* cells. *Molecular Genetics and Genomics*, 274(1), 1-12.
- Koburger, T., Weibezahn, J., Bernhardt, J., Homuth, G., & Hecker, M. (2005). Genome-wide mRNA profiling in glucose starved *Bacillus subtilis* cells. *Molecular Genetics and Genomics*, 274(1), 1-12.
- Koren, S., Walenz, B. P., Berlin, K., Miller, J. R., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2017). Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Research*, 27(5), 722-736.
- Kristoffersen, S. M., Ravnum, S., Tourasse, N. J., Økstad, O. A., Kolstø, A. B., & Davies, W. (2007). *Low concentrations of bile salts induce stress*

- responses and reduce motility in Bacillus cereus ATCC 14570. Journal of Bacteriology*, 189(14), 5302-5313.
- La Rosa Hernández, D., Gómez Cabeza, E. J., & Sánchez Castañeda, N. (2014). La microbiota intestinal en el desarrollo del sistema inmune del recién nacido. *Revista Cubana de Pediatría*, 86(4), 502-513.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680.
- Lagier, J.C., Armougom, F., Million, M., Hugon, P., Pagnier, I., Robert, C., Bittar, F., Fournous, G., Gimenez, G., Maraninchi, M., Trape, J.F., Koonin, E.V., La Scola, B., Raoult, D. (2012). Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(12), 1185-1193.
- Lauer, P., Rinaudo, C.D., Soriani, M., Margarit, I., Maione, D., Rosini, R., Taddei, A.R., Mora, M., Rappuoli, R., Grandi, G., Telford, J.L. (2005). Genome analysis reveals pili in Group B Streptococcus. *Science*, 309(5731), 105-105.
- Lee, J. Y., Kim, Y. S., & Shin, D. H. (2002). Antimicrobial synergistic effect of linolenic acid and monoglyceride against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 2193-2199.
- Li, C., Yu, W., Wu, P., & Chen, X. D. (2020). Current in vitro digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology*, 96, 114-126.
- Lima-Pérez, J., López-Pérez, M., Viniegra-González, G., & Loera, O. (2019). Solid-state fermentation of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* HD-73 maintains higher biomass and spore yields as compared to submerged fermentation using the same media. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 1-9.
- Link, A. J., Eng, J., Schieltz, D. M., Carmack, E., Mize, G. J., Morris, D. R., ... & Yates, J. R. (1999). Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nature Biotechnology*, 17(7), 676-682.
- Lopetuso, L. R., Scaldaferri, F., Franceschi, F., & Gasbarrini, A. (2016). *Bacillus clausii* and gut homeostasis: state of the art and future perspectives. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 10(8), 943-948.
- Mahida, Y. R. (2004). Epithelial cell responses. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18(2), 241-253.
- Makarov, A. (2000). Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry*, 72(6), 1156-1162.

- Makarov, A., Denisov, E., Kholomeev, A., Balschun, W., Lange, O., Strupat, K., & Horning, S. (2006). Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, 78(7), 2113-2120.
- Mallozzi, M., Viswanathan, V. K., & Vedantam, G. (2010). Spore-forming Bacilli and Clostridia in human disease. *Future Microbiology*, 5(7), 1109-1123.
- Martín, R., Soberón, N., Vázquez, F., & Suárez, J. E. (2008). La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(3), 160-167.
- Mayorga Reyes, L., Gonzalez Vazquez, R., Cruz Arroyo, S. M., Melendez Avalos, A., Reyes Castillo, P. A., Chavaro Perez, D. A., & Azaola Espinosa, A. (2016). Correlation between diet and gut bacteria in a population of young adults. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67(4), 470-478.
- Mcewan, C. E., Gatherer, D., & Mcewan, N. R. (1998). Nitrogen-fixing aerobic bacteria have higher genomic GC content than non-fixing species within the same genus. *Hereditas*, 128(2), 173-178.
- Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V., & Rappuoli, R. (2005). The microbial pan-genome. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15(6), 589-594.
- Meng, F., Forbes, A. J., Miller, L. M., & Kelleher, N. L. (2005). Detection and localization of protein modifications by high resolution tandem mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 24(2), 126-134.
- Merrell, D. S., & Camilli, A. (2002). Acid tolerance of gastrointestinal pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, 5(1), 51-55.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31-46.
- Michalski, A., Damoc, E., Lange, O., Denisov, E., Nolting, D., Müller, M., & Makarov, A. (2012). Ultra-high resolution linear ion trap Orbitrap mass spectrometer (Orbitrap Elite) facilitates top down LC MS/MS and versatile peptide fragmentation modes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(3).
- Michel-Aceves, R. J., Izeta-Gutiérrez, A. C., Torres-Alarcón, G., & Michel-Izeta, A. C. M. (2017). La microbiota y el microbioma intestinal humano. (Entre las llaves del reino y una nueva caja de Pandora). *Revista de Sanidad Militar*, 71(5), 443-448.
- Mills, S., Stanton, C., Lane, J. A., Smith, G. J., & Ross, R. P. (2019). Precision Nutrition and the Microbiome, Part I: Current State of the Science. *Nutrients*, 11(4), 923. doi:10.3390/nu11040923
- Mulder, I. E., Schmidt, B., Stokes, C. R., Lewis, M., Bailey, M., Aminov, R. I., ... & Kelly, D. (2009). Environmentally-acquired bacteria influence

- microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. *BMC Biology*, 7(1), 1-20.
- Munoz-Garach, A., Diaz-Perdigones, C., & Tinahones, F. J. (2016). Gut microbiota and type 2 diabetes mellitus. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*, 63(10), 560-568.
- Musto, H., Naya, H., Zavala, A., Romero, H., Alvarez-Valín, F., & Bernardi, G. (2006). Genomic GC level, optimal growth temperature, and genome size in prokaryotes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 347(1), 1-3.
- Naya, H., Romero, H., Zavala, A., Alvarez, B., & Musto, H. (2002). Aerobiosis increases the genomic guanine plus cytosine content (GC%) in prokaryotes. *Journal of Molecular Evolution*, 55(3), 260-264.
- Neish, A. S. (2002). The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. *Microbes and Infection*, 4(3), 309-317.
- Nesvizhskii, A. I., & Aebersold, R. (2004). Analysis, statistical validation and dissemination of large-scale proteomics datasets generated by tandem MS. *Drug Discovery Today*, 9(4), 173-181.
- O'Driscoll, B., Gahan, C. G., & Hill, C. (1996). Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5), 1693-1698
- Ouwehand, A. C., & Vaughan, E. E. (Eds.). (2006). *Gastrointestinal Microbiology*. CRC Press.
- Pallen, M. J., & Wren, B. W. (2007). Bacterial pathogenomics. *Nature*, 449(7164), 835-842.
- Patterson, S. D. (2003). Data analysis—the Achilles heel of proteomics. *Nature Biotechnology*, 21(3), 221-222.
- Peleg, M., Corradini, M. G., & Normand, M. D. (2007). The logistic (Verhulst) model for sigmoid microbial growth curves revisited. *Food Research International*, 40(7), 808-818.
- Rajawat, J. & Jhingan, G. (2019) Mass spectroscopy. En: *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources*. Editor: Gauri Misra, Academic Press, 1-20.
- Rajilić-Stojanović, M., & de Vos, W. M. (2014). The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), 996–1047.
- Ramakrishna, B. S., & Roediger, W. E. W. (1990). Bacterial short chain fatty acids: their role in gastrointestinal disease. *Digestive Diseases*, 8(6), 337-345.
- Reid, G. E., & McLuckey, S. A. (2002). 'Top down' protein characterization via tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 37(7), 663-675.

- Reid, G., Sanders, M. E., Gaskins, H. R., Gibson, G. R., Mercenier, A., Rastall, R., ... & Klaenhammer, T. R. (2003). New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 37(2), 105-118.
- Rhoads, A., & Au, K. F. (2015). PacBio sequencing and its applications. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 13(5), 278-289.
- Rocha, E. P., & Danchin, A. (2002). Base composition bias might result from competition for metabolic resources. *Trends in Genetics*, 18(6), 291-294.
- Ruiz A. (2019) Introducción al aparato digestivo. Manual MSD Merck and Co., Inc., Kenilworth, NJ, <https://www.msdmanuals.com>
- Russell, S. A., Old, W., Resing, K. A., & Hunter, L. (2004). Proteomic informatics. *International Review of Neurobiology*, 61, 127-157.
- Salzman, N. H., Chou, M. M., de Jong, H., Liu, L., Porter, E. M., & Paterson, Y. (2003). Enteric salmonella infection inhibits Paneth cell antimicrobial peptide expression. *Infection and Immunity*, 71(3), 1109-1115.
- Santamaría-González, V. S., & Alvarado-Delgadillo, A. A. (2002). Flora cutánea como protección y barrera de la piel normal. *Revista del Centro Dermatológico Pascua*, 11(1):18-21.
- Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., & de Vos, W. M. (2005). Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current opinion in biotechnology*, 16(2), 204-211.
- Schadt, E. E., Turner, S., & Kasarskis, A. (2010). A window into third-generation sequencing. *Human Molecular Genetics*, 19(R2), R227-R240.
- Sebastián-Domingo, J. J., & Sánchez-Sánchez, C. (2018). De la flora intestinal al microbioma. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 110(1), 51-56.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069.
- Shetty, S. A., Hugenholtz, F., Lahti, L., Smidt, H., & de Vos, W. M. (2017). Intestinal microbiome landscaping: insight in community assemblage and implications for microbial modulation strategies. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(2), 182–199. doi:10.1093/femsre/fuw045
- Sims, D., Sudbery, I., Illott, N. E., Heger, A., & Ponting, C. P. (2014). Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 15(2), 121-132.
- Song, P., Chen, C., Tian, Q., Lin, M., Huang, H., & Li, S. (2013). Two-stage oxygen supply strategy for enhanced lipase production by *Bacillus*

*subtilis* based on metabolic flux analysis. *Biochemical ENGINEERING JOURNAL*, 71, 1-10.

- Stasiak-Róžańska, L., Berthold-Pluta, A., Pluta, A. S., Dasiewicz, K., & Garbowska, M. (2021). Effect of Simulated Gastrointestinal Tract Conditions on Survivability of Probiotic Bacteria Present in Commercial Preparations. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(3), 1108.
- Sunday, J., James, A. A., Ibijola, E. A., Ogunrinde, R. B., & Ogunyebi, S. N. (2012). A computational approach to Verhulst-Pearl Model. *IOSR Journal of Mathematics*, 4(3), 06-13.
- Tam, N. K., Uyen, N. Q., Hong, H. A., Duc, L. H., Hoa, T. T., Serra, C. R., ... & Cutting, S. M. (2006). The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *Journal of Bacteriology*, 188(7), 2692-2700.
- Tatusov, R. L., Natale, D. A., Garkavtsev, I. V., Tatusova, T. A., Shankavaram, U. T., Rao, B. S., ... & Koonin, E. V. (2001). The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Research*, 29(1), 22-28.
- Tettelin, H., Riley, D., Cattuto, C., & Medini, D. (2008). Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Current Opinion in Microbiology*, 11(5), 472-477.
- Thomassin, S., Jobin, M. P., & Schmitt, P. (2006). The acid tolerance response of *Bacillus cereus* ATCC14579 is dependent on culture pH, growth rate and intracellular pH. *Archives of Microbiology*, 186(3), 229-239.
- Treangen, T. J., & Salzberg, S. L. (2012). Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Nature Reviews Genetics*, 13(1), 36-46.
- Vamanu, E., & Gatea, F. (2020). Correlations between microbiota bioactivity and bioavailability of functional compounds: A mini-review. *Biomedicines*, 8(2), 39.
- Veisseire, P., Bonnet, M., Saraoui, T., Poupet, C., Camarès, O., Gachinat, M., ... & Bornes, S. (2020). Investigation into in vitro and in vivo *Caenorhabditis elegans* models to select cheese yeasts as probiotic candidates for their preventive effects against *Salmonella Typhimurium*. *Microorganisms*, 8(6), 922.
- Villarreal, M. L. M., Padilha, M., Vieira, A. D. S., Franco, B. D. G. D. M., Martinez, R. C. R., & Saad, S. M. I. (2013). Advantageous direct quantification of viable closely related probiotics in Petit-Suisse cheeses under in vitro gastrointestinal conditions by propidium monoazide-qPCR. *PLoS One*, 8(12), e82102.

- Vinuesa, P., Ochoa-Sánchez, L. E., & Contreras-Moreira, B. (2018). GET\_PHYLOMARKERS, a software package to select optimal orthologous clusters for phylogenomics and inferring pan-genome phylogenies, used for a critical geno-taxonomic revision of the genus *Stenotrophomonas*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 771.
- Voigt, B., Hoi, L. T., Jürgen, B., Albrecht, D., Ehrenreich, A., Veith, B., Evers S., Maurer KH., Hecker M., Schweder, T. (2007). The glucose and nitrogen starvation response of *Bacillus licheniformis*. *Proteomics*, 7(3), 413-423.
- Washburn, M. P., Wolters, D., Yates, J. R. (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnology*, 19(3), 242-247.
- Wick R.R., Judd L.M., Gorrie C.L., Holt K.E. (2017) Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol* 13(6): e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>.
- Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J. C., Yan J.X., Gooley, A.A., Hughes G., Humphery-Smith I., Williams K.L, Hochstrasser, D. F. (1996). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology*, 14(1), 61-65.
- Wilmes-Riesenberg, M. R., Bearson, B., Foster, J. W., & Curtis 3rd, R. (1996). Role of the acid tolerance response in virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity*, 64(4), 1085-1092.
- Woolfit, M., & Bromham, L. (2003). Increased rates of sequence evolution in endosymbiotic bacteria and fungi with small effective population sizes. *Molecular Biology and Evolution*, 20(9), 1545-1555.
- Xu, K., Yuan, Z., Rayner, S., & Hu, X. (2015). Genome comparison provides molecular insights into the phylogeny of the reassigned new genus *Lysinibacillus*. *BMC genomics*, 16(1), 1-12.
- Zaldívar Ochoa, M. (2002). El sistema inmunológico de las mucosas. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 18(5), 352-354.
- Zhang, Y., Fonslow, B. R., Shan, B., Baek, M. C., & Yates III, J. R. (2013). Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chemical Reviews*, 113(4), 2343-2394.
- Zubarev, R. A., Makarov, A. (2013). Orbitrap mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 2013, 85, 11, 5288–5296.

## Productos del trabajo obtenidos

- José Luis Reyes Cortes, Edith Ponce Alquicira, Alejandro Azaola Espinosa, Luis Fernando Lozano Aguirre Beltrán. Pangenoma y coregenoma de *Bacillus pumilus*. Trabajo libre presentado en el XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 23 a 28 de junio, 2019 en León, Guanajuato México.
- Reyes-Cortes, José Luis, Alejandro Azaola-Espinosa, Luis Lozano-Aguirre, and Edith Ponce-Alquicira. 2021. "Physiological and Genomic Analysis of *Bacillus pumilus* UAMX Isolated from the Gastrointestinal Tract of Overweight Individuals" *Microorganisms* 9, no. 5: 1076. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051076>.
- José Luis Reyes Cortes, Edith Ponce Alquicira, Alejandro Azaola Espinosa, Luis Fernando Lozano Aguirre Beltrán. Physiological and genomic analysis of *Bacillus pumilus* UAMX isolated from the gastrointestinal tract of overweight individuals. Trabajo libre presentado en el European Biotechnology Congress 2022, 6 a 8 de octubre, 2022 en Praga, Republica Checa.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00270

Matrícula: 2171801042

Estudio fisiológico y genómico de dos cepas del género *Bacillus*, aisladas de la microbiota humana.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 2 del mes de septiembre del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. ALEJANDRO AZAOLA ESPINOSA
- DR. LUIS FERNANDO LOZANO AGUIRRE BELTRAN
- DR. ROGELIO VALADEZ BLANCO
- DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: JOSE LUIS REYES CORTES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Aprobar*

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



JOSE LUIS REYES CORTES  
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. ALEJANDRO AZAOLA ESPINOSA

VOCAL

DR. LUIS FERNANDO LOZANO AGUIRRE BELTRAN

VOCAL

DR. ROGELIO VALADEZ BLANCO

SECRETARIO

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ