



IDENTIFICACIÓN DE GENES RELEVANTES PARA LA PRODUCCIÓN DE *BIOFILM* EN LA BACTERIA AMBIENTAL *HALOMONAS TITANICAE* KHS3

Veinticinque, Luciana

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral IAL-CONICET-UNL

Director/a: Studdert, Claudia A.

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: *Halomonas titanicae* KHS3, *biofilm*, genes.

INTRODUCCIÓN

Halomonas titanicae KHS3 es una bacteria ambiental, halotolerante, aislada del Mar Argentino que presenta potencial biotecnológico tanto por su capacidad de biorremediación de hidrocarburos poliaromáticos, como por su capacidad de acumular polihidroxicanoatos. La formación de *biofilm* es una característica que puede influir en ambos procesos. La secuenciación de su genoma permitió identificar dos *clusters* de genes que corresponden a sistemas de transducción de señales tipo quimiotaxis. La interrelación entre ambos sistemas y su participación en la regulación del fenómeno de *biofilm*, el cual implica un cambio en el estilo de vida de las células, desde una forma planctónica a una forma sésil, adherida a superficies, genera interrogantes. El objetivo de este trabajo consistió en la identificación de nuevos genes involucrados en la formación de *biofilm*.

Título del proyecto: "Sistema quimiosensorial que regula la formación de *biofilm*: estudio de la vía tipo *Wsp* en la bacteria marina *Halomonas titanicae* KHS3".

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2020

Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

Director/a: Studdert, Claudia





OBJETIVOS

- Obtención de mutantes de la cepa ambiental *Halomonas titanicae* KHS3 por inserción al azar de un transposón.
- Identificación de mutantes con alteraciones fenotípicas en la producción de *biofilm* en comparación con la cepa salvaje.
- Identificación del gen interrumpido por la inserción del transposón en cada una de las mutantes seleccionadas por su fenotipo alterado.
- Caracterización de la producción de *biofilm* en las mutantes seleccionadas.

METODOLOGÍA

En la investigación se llevó a cabo una estrategia de mutagénesis al azar por inserción de un transposón sobre la cepa salvaje de *Halomonas titanicae* KHS3, con el fin de identificar genes involucrados en la producción de *biofilm*.

Se transformaron células de la cepa salvaje *Halomonas titanicae* KHS3 con un plásmido suicida que lleva un transposón denominado Tn1732, el cual contiene un *cassette* de resistencia a kanamicina (Kunte y Galinski, 1995). Las bacterias transformadas fueron sembradas en medio con kanamicina con el objeto de seleccionar aquellas que han adquirido la resistencia al antibiótico gracias a la inserción del transposón en su genoma. Cada colonia resistente al antibiótico representa un evento de inserción independiente, obteniéndose de este modo una colección de mutantes en las que el transposón se ha insertado al azar en un lugar diferente del genoma.

Se realizaron ensayos de formación de *biofilm* como *screening* de bacterias mutantes buscando identificar aquellas que presentan un fenotipo alterado en comparación con la cepa salvaje KHS3. Para ello se utilizaron distintos materiales de adhesión, medios de cultivo, temperaturas y tiempos de incubación, entre otros. Los ensayos de *biofilm* se llevaron a cabo siguiendo el protocolo de tinción con cristal violeta (López Sánchez *et al.*, 2013), utilizando como controles tanto la cepa salvaje KHS3 como cepas mutantes con alteraciones en la producción de *biofilm* previamente identificadas y caracterizadas en el laboratorio.

Así, se identificaron cuatro mutantes, dos de ellas con capacidad aumentada y dos con capacidad disminuida de formar *biofilm*. La alteración en la formación de *biofilm* se caracterizó en detalle, analizando en particular la cinética de formación y dispersión de *biofilm*, la movilidad, la formación de macrocolonias, la hidrofobicidad de la superficie celular, la producción de exopolisacáridos y otros factores que pueden afectar la producción de *biofilm*, así como el aspecto macroscópico del *biofilm* formado y la morfología de las colonias.



Al momento, se está trabajando en la identificación de los genes que fueron interrumpidos por la inserción del transposón en aquellas mutantes seleccionadas. La metodología consiste en preparar ADN genómico de las mismas y digerirlo con una enzima de restricción que no presente secuencia de reconocimiento dentro del transposón insertado, de forma tal que el corte se produzca obligadamente dentro de secuencias del ADN bacteriano.

Los fragmentos resultantes de la digestión serán clonados en un plásmido que confiere resistencia a un antibiótico distinto de kanamicina. Con el producto obtenido se transformarán bacterias, las cuales se seleccionarán en medio conteniendo kanamicina para recuperar aquellos plásmidos que incorporaron el fragmento de ADN genómico que contiene el transposón y sus secuencias flanqueantes. Los plásmidos obtenidos se secuenciarán utilizando cebadores específicos para el vector de clonado o el transposón. Luego se compararán las secuencias que flanquean el transposón con la secuencia completa de *H. titanicae* KHS3, con el fin de identificar el gen interrumpido.

CONCLUSIONES

Halomonas titanicae KHS3 es un aislamiento ambiental que tiene potencial biotecnológico. La hipótesis de trabajo en la que se basó el presente proyecto postula que, tanto el desarrollo de *biofilm* por parte de la bacteria como su dispersión, están regulados por distintos sistemas de señalización y proteínas efectoras, que en conjunto regulan las distintas etapas del proceso. Con el fin de identificar genes que tengan impacto positivo o negativo sobre la producción de *biofilm*, se realizó una estrategia de mutagénesis al azar por inserción de un transposón en la cepa salvaje. El éxito de la misma se comprobó mediante el análisis del porcentaje de bacterias mutantes KnR que resultaron sensibles a altas concentraciones de sal y comparando con datos publicados, se demostró que efectivamente se obtuvieron colonias aisladas que representan eventos de inserción independientes.

Los ensayos de *screening* en la formación de *biofilm* por parte de las bacterias mutantes permitieron identificar cuatro bacterias candidatas, dos de ellas con capacidad aumentada y dos con capacidad disminuida de formar *biofilm*. Además, una de ellas demostró tener un fenotipo significativamente distinto en cuanto a la morfología de colonia. Si bien al momento no se cuenta con información concreta sobre cuáles son los genes mutagenizados en cada uno de los casos, se están llevando a cabo los ensayos correspondientes con vista a lograr disponer de mayor información al respecto.

En conjunto, se espera que este proyecto complemente estudios que están actualmente en curso en el laboratorio y permitan obtener más herramientas para el estudio de la formación de *biofilm* en esta bacteria.



BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

D´Ippólito S, De Castro RE, Herrera Seitz MK (2011). “Chemotactic responses to gas oil of *Halomonas spp.* Strains isolated from saline environments in Argentina”. *Revista Argentina de Microbiología*, 43:107-110.

Gasperotti AF, Studdert CA, Revale S and Herrera Seitz MK (2015). “Draft Genome Sequence of *Halomonas sp.* KHS3, a Polyaromatic Hydrocarbon-Chemotactic Strain”. *Genome Announc* 3(2):e00020-15.

Hans Jörg Kunte, Erwin A. Galinski. Transposon mutagenesis in halophilic eubacteria: conjugal transfer and insertion of transposon Tn5 and Tn1732 in *Halomonas elongata*, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 128, Issue 3, May 1995, Pages 293–299

López-Sánchez, A., Jiménez-Fernández, A., Calero, P., Gallego, LD y Govantes, F. (2013). Nuevos métodos en el análisis de mutantes de biopelículas. *Informes de microbiología ambiental*, 5: 679-685.

