



Ciencia Latina
Internacional

Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar, Ciudad de México, México.
ISSN 2707-2207 / ISSN 2707-2215 (en línea), marzo-abril 2024,
Volumen 8, Número 2.

https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i2

**CONSTRUCCIÓN EN *Escherichia coli* DEL
PLÁSMIDO pamea2 QUE CONTIENE EL GEN
csra DE *Bacillus licheniformis* M2-7**

**CONSTRUCTION IN *Escherichia coli* OF THE pamea2 PLASMID
CONTAINING THE *csra* GENE OF *Bacillus licheniformis* M2-7**

America Yaret Bello Mendoza

Universidad Autónoma de Guerrero, México

José Alberto Hernández Eligio

Universidad Autónoma de México, México

Alejandro Bolaños Dircio

Universidad Autónoma de Guerrero, México

Yanet Romero Ramírez

Universidad Autónoma de Guerrero, México

Augusto Rojas Aparicio*

Universidad Autónoma de Guerrero, México

DOI: https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i2.11618

Construcción en *Escherichia coli* del Plásmido pAmeA2 que Contiene el Gen *csrA* de *Bacillus licheniformis* M2-7

America Yaret Bello Mendoza¹16279970@uagro.mx<https://orcid.org/0009-0001-3142-8419>Universidad Autónoma de Guerrero
México**José Alberto Hernández Eligio**alberto.hernandez@ibt.unam.mx<https://orcid.org/0000-0002-2787-8732>Universidad Autónoma de México
México**Alejandro Bolaños Dircio**alexo_guerrero@hotmail.com<https://orcid.org/0000-0003-1638-3870>Universidad Autónoma de Guerrero
México**Yanet Romero Ramírez**yanetromero7@gmail.com<https://orcid.org/0000-0002-8383-4128>Universidad Autónoma de Guerrero
México**Augusto Rojas Aparicio**rojas9101@gmail.com<https://orcid.org/0009-0004-4269-4589>Universidad Autónoma de Guerrero
México

RESUMEN

Actualmente el uso de los hidrocarburos aromáticos policíclicos se ha asociado a la contaminación de la flora y fauna, repercutiendo sobre la salud humana. Para corregir esta problemática, se han desarrollado métodos de biorremediación basados en la aplicación de microorganismos capaces de restaurar ambientes contaminados con este tipo de hidrocarburos. Uno de los modelos bacterianos utilizados es la cepa de *Bacillus licheniformis* M2-7, que tiene la capacidad de degradar HAPs. Esto lo lleva a cabo a partir del sistema Csr, que contiene el gen *csrA* que codifica para la proteína CsrA, asociada a la motilidad y capacidad de utilizar hidrocarburos como fuente de carbono. La presente investigación tuvo como objetivo la construcción del plásmido que contiene el gen *csrA* de *B. licheniformis* M2-7. Para ello se caracterizó *in silico* el gen *csrA*, se realizó la extracción del ADN de *B. licheniformis* M2-7 y la amplificación del gen *csrA* por PCR. El gen fue clonado en el vector pJET1.2/Blunt para la construcción del plásmido. Se transformaron y seleccionaron a las cepas de *E. coli*, para posteriormente confirmar la presencia de *csrA* por PCR, digestión enzimática y secuenciación. Se logró construir y confirmar la presencia del plásmido pAmeA2.

Palabras clave: *Bacillus licheniformis* M2-7, *csrA*, plásmidos, HAPs

¹ Autor principal

Correspondencia: rojas9101@gmail.com

Construction in *Escherichia coli* of the pAmeA2 Plasmid Containing the *csrA* Gene of *Bacillus licheniformis* M2-7

ABSTRACT

Currently, the use of polycyclic aromatic hydrocarbons has been associated with the contamination of flora and fauna, affecting human health. To correct this problem, bioremediation methods have been developed based on the application of microorganisms capable of restoring environments contaminated with this type of hydrocarbons. One of the bacterial models used is the *Bacillus licheniformis* M2-7 strain, which has the capacity to degrade PAHs. This is carried out by the Csr system, which contains the *csrA* gene that codes for the CsrA protein, associated with motility and the capacity to use hydrocarbons as a carbon source. The present investigation was aimed at constructing the plasmid containing the *csrA* gene of *B. licheniformis* M2-7. For this purpose, the *csrA* gene was characterized in silico, the DNA of *B. licheniformis* M2-7 was extracted and the *csrA* gene was amplified by PCR. The gene was cloned into the pJET1.2/Blunt vector for plasmid construction. *E. coli* strains were transformed and selected, and the presence of *csrA* was confirmed by PCR, enzymatic digestion and sequencing. The presence of the plasmid pAmeA2 was constructed and confirmed.

Keywords: *Bacillus licheniformis* M2-7, *csrA*, plasmids, PAHs

Artículo recibido 11 marzo 2024
Aceptado para publicación: 12 abril 2024



INTRODUCCIÓN

Bacillus licheniformis M2-7 es una bacteria anaerobia facultativa y termorresistente, con un rango de temperatura de crecimiento de 37 a 60°C y puede resistir temperaturas de 110°C (Guavara-Luna et al., 2022). Se ha demostrado que *B. licheniformis* M2-7 utiliza hidrocarburos como gasolina y gasóleo, como única fuente de carbono (Guavara-Luna et al., 2022), también puede crecer en presencia de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), como naftaleno, fenantreno, pireno y benzo[a]pireno (Guavara-Luna et al., 2018; Rojas-Aparicio et al., 2018) y se ha reportado que esta cepa utiliza el Sistema Regulador de Almacenamiento de Carbono (Csr, por sus siglas en inglés) como mecanismo para degradar hidrocarburos (Serrano-Ángel et al., 2020; Blancas et al., 2023). El sistema Csr es un regulador global de diversos procesos celulares (Vakulskas et al., 2015), en varias especies de bacterias Gramnegativas (Lawhon et al., 2003), es un complejo de unión al ARN que se encarga de regular la expresión génica a nivel postranscripcional, afectando la unión al ribosoma y/o a la estabilidad de los ARNm blancos (Yakhnin et al., 2007; Edwards et al., 2011). El sistema Csr está conformado por dos componentes, CsrA y CsrB (Leng et al. 2015; Vakulskas et al., 2015); CsrA es el componente clave del sistema Csr, es una proteína de 61 aminoácidos (Romeo, 1998), en dímero se une al ARNm blanco (Pourciau, et al., 2020). Por otro lado, CsrB es una pequeña molécula de ARN no codificante de 360 pares de bases, dentro de su estructura contiene 18 sitios o secuencias consenso que reconoce CsrA (Romeo, 1998). El sistema Csr no ha sido tan estudiado en bacterias Gram positivas, en *Bacillus subtilis*, el gen *csrA* está ubicado en el operón de la biosíntesis flagelar y antes del gen *hag*; el cual es responsable de codificar la proteína flagelina. CsrA tiene la función de unirse a dos sitios de la región 5' de *hag* para reprimir la expresión de la proteína (Yakhnin et al., 2007), funcionando como control morfogénico en el ensamblaje flagelar (Babitzke & Romeo, 2007). CsrA afecta positivamente a la motilidad pese a tener un efecto inhibitorio sobre la expresión de *hag* (Yakhnin et al., 2007). Para demostrar la función del gen *csrA* en *Bacillus licheniformis* M2-7, se diseñó y construyó la cepa mutante LYA-5, que presenta el bloqueo de *csrA* por medio de la inserción de un cassette de resistencia a espectinomicina (Serrano-Ángel et al., 2020). Se demostró que el gen *csrA* juega un papel fundamental en la degradación de gasolina, observando



que la expresión relativa de este gen aumenta 2 veces a las 6 horas y hasta 29 veces a las 12 horas de incubación con gasolina al 0.2% con respecto a la cepa silvestre. Además, se reportó que el gen *csrA* regula la expresión del gen *hag* que codifica para la síntesis de flagelina y está relacionado con movilidad de la bacteria, al igual que ocurre en *B. subtilis* (Serrano-Ángel et al., 2020). En la actualidad los hidrocarburos forman parte de la vida cotidiana de miles de personas alrededor del mundo, por lo que la diseminación de estos en diferentes ecosistemas ha ido incrementando, contaminando severamente al agua, aire y suelo (Patel et al., 2020). Para atenuar el problema se ha implementado el uso de técnicas físicas, químicas y biológicas, estas últimas involucran el uso de microorganismos en procesos de biorremediación (Elenga-Wilson et al., 2021). Uno de los géneros utilizados en la aplicación biotecnológica ha sido *Bacillus*, en ese sentido, *B. licheniformis* M2-7 es un importante microorganismo que ha demostrado utilizar diferentes hidrocarburos como única fuente de carbono, y se ha comprobado que el sistema Csr tiene una participación importante en la regulación del consumo de esta fuente de carbono. La cepa LYA-5, se ha considerado como candidata para aplicar en procesos de degradación de hidrocarburos, sin embargo, es importante confirmar que el efecto de este proceso se debe a la inactivación del gen *csrA*, por ello el objetivo de esta investigación es realizar el diseño y la construcción del plásmido pAmeA2, el cual lleva el gen *csrA* y podrá ser utilizado, en un futuro, para la expresión heteróloga del gen *csrA* en la cepa mutante de *B. licheniformis* LYA-5, restaurando el fenotipo de la cepa silvestre. Esto contribuirá a comprender la degradación de hidrocarburos y permitirá involucrar al sistema Csr para el diseño de nuevos microorganismos o estrategias de biorremediación.

METODOLOGÍA

Se realizó un estudio de tipo experimental en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, perteneciente a la Universidad Autónoma de Guerrero; se utilizó como criterio de selección al plásmido pJET1.2/Blunt, la cepa de *Bacillus licheniformis* M2-7 para la extracción del gen *csrA* y la cepa de *Escherichia coli* MC1061. Para este trabajo se tuvo como variable de exposición el diseño y construcción del plásmido, así como la transformación de la cepa *E. coli*; como variable de



respuesta se tuvo la presencia del plásmido pAmeA en el citoplasma de *E.coli*, y el crecimiento de las células transformantes en medio suplementado con ampicilina. Además, se trabajó bajo las normas NOM-052-SEMARNAT-2005 y NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

Condiciones de cultivo de las cepas utilizadas durante el proyecto

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron *Bacillus licheniformis* M2-7 y *Escherichia coli* MC1061 las cuales se cultivaron en medio nutritivo Luria Bertani (LB), composición en g/L: peptona de caseína 10, extracto de levadura 5, cloruro de sodio 10, para medio líquido (suplementado con 15 de agar bacteriológico para medio sólido) y se mantuvieron a 37 °C por 16-24 h. Las cepas de *E. coli* AmeA, se cultivaron en medio LB, suplementado con ampicilina a una concentración de 200 ug/ml.

Análisis in silico de la secuencia del gen *csrA* y diseño del plásmido

El análisis de la secuencia del gen *csrA* se realizó a partir de la plataforma bioinformática Gene & Genome del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se analizó la secuencia nucleotídica de la cepa de referencia de *Bacillus licheniformis* DSM13=ATCC 14580. Para el análisis de la proteína y la búsqueda de dominios conservados, se utilizaron los repositorios y bases de datos como: Conserved Domain, de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Uniprot (<https://www.uniprot.org>), Pfam-InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) y Ensembl Bacteria (<https://bacteria.ensembl.org/index.html>). Para la generación de los oligonucleótidos se utilizó el programa Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>), aquí se tomaron en cuenta las condiciones y buen funcionamiento de estos. A partir de este análisis, se logró realizar el diseño del programa de Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polimerase Chain Reacción, PCR) considerando la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos y el tiempo de elongación del gen *csrA*. El diseño del plásmido se realizó mediante el Software SnapGene (<https://www.snapgene.com/>).

Amplificación del gen *csrA* de *Bacillus licheniformis* M2-7

Se extrajo el ADN genómico de un cultivo de 16 h de *Bacillus licheniformis* M2-7 mediante el kit Quick-DNA fungal/bacterial miniprep (Zymo research), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó el ADN extraído mediante NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), se analizó en gel de agarosa al 1 % (SIGMA) y se visualizó su integridad en transiluminador. El



ADN genómico sirvió para poder realizar la amplificación por PCR de la región codificante del gen *csrA*, utilizando los oligonucleótidos CsrAMFw 5'CTAGTCTTATCCCGCAAG3' y CsrAMRw 5'CTTTTTTTGTGAGGATAA3'. Para la reacción se utilizaron 50 ng de ADN genómico, 2.5 uL buffer 10X, 2 uL de MgCl₂ 20 mM, 2 uM de cada dNTP, 1 U de ADN Taq-polimerasa y agua libre de nucleasas en un volumen final de 25 uL. Las condiciones usadas fueron: desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C; 30 ciclos de: desnaturalización por 30 s a 95 °C, alineamiento de 30 s a 51 °C, extensión de 30 s a 72 °C; y un ciclo final a 72 °C por 10 min. El producto de PCR se analizó en un gel de agarosa al 1% utilizando tampón TAE (Tris-Ácido-EDTA) con 10 ng/mL de bromuro de etidio y se visualizó bajo luz ultravioleta (UV).

Ligación del producto de PCR al plásmido pJET1.2/Blunt

Para la obtención del plásmido pAmeA, el producto de PCR se clonó en el plásmido pJET1.2/Blunt bajo el protocolo establecido por el kit comercial CloneJET PCR Cloning. Para la clonación del plásmido pAmeA, se realizó la transformación de células competentes de *E. coli* MC1061, utilizando la técnica de choque térmico (Sambrook J. & Russell W., 2001). Para ello se adicionaron 20 uL de la reacción de ligación en 100 uL de las células competentes de *E. coli* MC1061 y la selección de transformantes se realizó utilizando 100 uL de la reacción en placas de LB suplementadas con 200 ug/mL de ampicilina. Las células transformantes se colocaron en incubación por 16 h a 37 °C.

Extracción de ADN plasmídico y confirmación del plásmido pAmeA

De las células transformantes candidatas se realizó la extracción de los ADN plasmídico, utilizando el kit GeneJET Plasmid Miniprep kit siguiendo el protocolo del fabricante (Thermo Scientific). Los plásmidos se analizaron en un gel de agarosa al 1%, se visualizaron en transiluminador y se cuantificaron. Se realizó la confirmación de los plásmidos mediante una PCR punto final del gen *csrA* directamente de colonia y utilizando ADN plasmídico.

Secuenciación del gen *csrA* en el plásmido pAmeA

Una vez confirmados los plásmidos por PCR, se realizó la secuenciación del gen *csrA* para corroborar la inserción de este en el plásmido de clonación y su orientación, para ello, se preparó en un microtubo de 0.6 uL, un volumen final de 16 µL, con una concentración de 10 µM



(pmol/ μ L) de oligonucleótidos utilizados (CsrAMFw y CsrAMw) y 100 ng/uL de producto de plásmido pAmeA. La secuencia fue analizada con el programa DNA Baser Assembler, mientras que para el alineamiento de la secuencia se utilizó la herramienta Blast-NCBI usando como genoma de referencia a *B. licheniformis* ATCC DSM 13 = ATCC 14580.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis in silico y arreglo genético del gen *csrA*

Se seleccionó y utilizó el genoma de referencia de *B. licheniformis* ATCC DSM 13 = ATCC 14580, determinando que este posee un total de 4,27832 Mb, 4382 genes y 4219 proteínas. Posteriormente se realizó el análisis bioinformático del gen *csrA*, el cual arrojó su arreglo genético, indicando que se ubica entre los genes *fliW* y *hag* (Fig. 1), los cuales tienen una importancia en el metabolismo celular, para la obtención de diferentes fuentes de carbono. Este proceso celular es semejante al estudiado en *B. subtilis* (Mukherjee, et al., 2011; Yakhnin et al., 2007). Cabe mencionar que otro de los procesos regulado por estos genes es la biosíntesis flagelar, teniendo en cuenta que el gen *hag*, es el responsable de codificar la producción de la proteína flagelina (Babitzke & Romeo, 2007).

La secuencia de aminoácidos de la proteína CsrA se muestra en la figura 2, además se puede observar la estructura aproximada de la proteína. De acuerdo con Müller, et al. (2019), CsrA es una proteína la cual es altamente conservada y afecta la traducción o la estabilidad de transcritos blancos, ha sido ampliamente estudiada en la subfamilia de las proteobacterias, pero muy poco en el género *Bacillus* (Yakhnin, H. et al. 2007). Esta proteína ya ha sido estudiada en la bacteria *B. licheniformis* M2-7, donde se pudo observar que está asociada a la degradación de gasolina, ya que cuando la bacteria fue sometida a medio suplementado con este hidrocarburo, su expresión relativa aumento dos veces más que en el control (Serrano-Ángel et al., 2020).

Diseño y construcción de los plásmidos pAmeA

Para el diseño del plásmido se utilizó el programa SnapGene, utilizando como referencia el plásmido de clonación pJET1.2/Blunt (Fig. 3A), y la región codificante del gen *csrA* (Fig. 3B) generando así, el plásmido pAmeA con un total de 3,199 pb (Fig. 3C). Aquí se puede observar diferentes componentes de importancia para el análisis, como el sitio múltiple de clonación



(SMC) donde se insertó el gen *csrA*, el gen de resistencia a ampicilina que se utilizó para confirmar a las transformantes y diversos sitios de restricción que podrán ser utilizados durante la confirmación de la construcción.

Construcción del plásmido pAmeA

La extracción permitió obtener ADN genómico de *B. licheniformis* M2-7, logrando una concentración de 44 y 58 ng/uL y un rango de pureza de 1.8 (280/260 nm), lo que indica que no hay presencia de contaminantes como proteínas o fenol, que se absorben a 280 nm (Thermo Fisher, Nanodrop). Se confirmó también, que el gen *csrA* tiene un tamaño de 225 pb (Fig. 4A), se purificó el fragmento obteniendo una concentración de 400 ng/ul y finalmente se ligó a pJET1/2.Blunt.

Confirmación del plásmido pAmeA.

Se obtuvo un banco de 63 transformantes las cuales presentaron resistencia al antibiótico de selección, confirmando así la inserción del plásmido de interés. Este hecho se confirmó a partir de una PCR de colonia, donde se obtuvo un total de 16 cepas positivas para la amplificación del gen *csrA*, cuya banda fue de 225 pb, esta metodología se utilizó con la intención de agilizar y optimizar el proceso de confirmación del plásmido pAmeA (Yakhnin H., et al., 2011). Una vez confirmada la presencia de los plásmidos en citoplasma de las cepas candidatas, se realizó la extracción de ADN plasmídico (Fig. 4B), obteniendo una integridad y concentración adecuada, confirmando una muestra libre de contaminantes. Kodackattumannil, P., et al; (2023), argumentan que la extracción por kit comercial añade elementos como las RNAsas, que permiten la obtención de muestras de alta calidad y pureza, por el contrario, los métodos caseros arrojan muestras de ADN contaminadas con residuos que pueden alterar los procesos posteriores a la clonación.

Una de las premisas para la confirmación de la inserción de fragmentos en plásmidos de clonación es la secuenciación de estos, por lo cual el gen *csrA* insertado en el plásmido pAmeA fue secuenciado. Se obtuvo un porcentaje de similitud del gen *csrA* por arriba del 97% de homología con el gen de la cepa de referencia *B. licheniformis* ATCC DSM 13 = ATCC 14580 (B14_00691 NCBI) permitiendo la confirmación de la correcta construcción del plásmido. Cabe mencionar que el porcentaje de homología no cumplió el 100% debido a que durante el proceso de



secuenciación normalmente ocurren errores por acción de la polimerasa o del secuenciador al etiquetar incorrectamente nucleótidos de la secuencia (Bautista et al., 2015). Otro aspecto que permite la secuenciación es determinar la orientación del gen insertado, debido a que se utilizan el par de oligonucleótidos que permiten determinar por complementariedad de bases de la orientación del gen estudiado. Además, esta metodología se caracteriza por permitir mostrar de manera específica mutaciones en las diferentes bases nucleotídicas del gen estudiado, cuando es alineada con los diferentes genomas de referencia del NCBI.

Perspectivas del proyecto

Con este trabajo se pretende realizar un plásmido de expresión del gen *csrA* y que en un futuro se obtenga la cepa complementaria de LYA5, para que así la expresión heteróloga del gen permita que la cepa recupere su fenotipo original y posteriormente cuantificar la expresión relativa del gen *csrA*. Por otra parte, se espera evaluar el crecimiento de la cepa de *B. licheniformis* LYA5 en otras fuentes de carbono para confirmar la interacción de CsrA con la degradación de los hidrocarburos.

FIGURAS

Figura 1. Tamaño y distribución de los genes *fliW*, *hag* y *csrA* pertenecientes a *B. licheniformis* DMS 13=ATCC 14580. Marcado en rojo se muestra el gen de interés *csrA* y en línea punteada se muestra el inicio y final de la región codificante con un tamaño de 225 pb

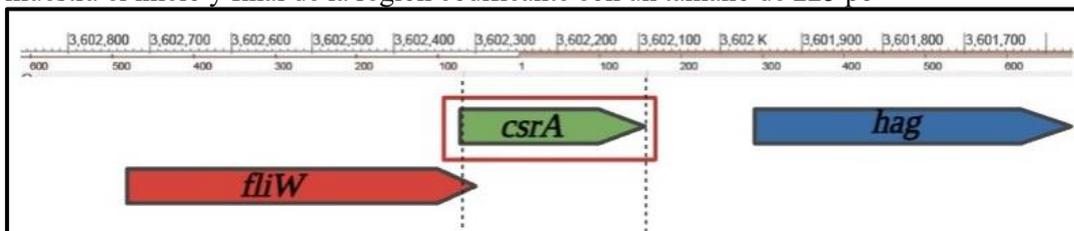


Figura 2. Modelo hipotético de la proteína CsrA y su secuencia de 74 aminoácidos. Se logran diferenciar colores dentro de la gamma del azul que determinan su estructura proteica.

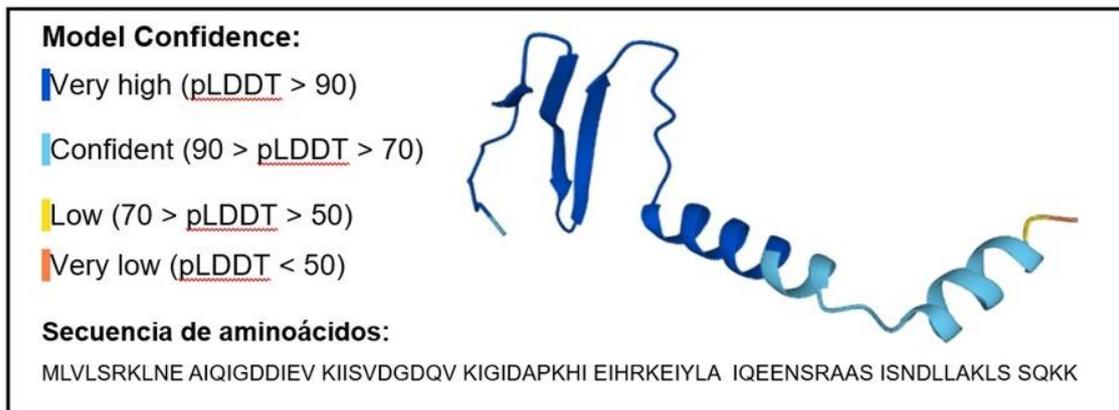


Figura 3. Diseño de plásmido pAmeA. **A)** Plásmido pJET1.2/Blunt linealizado; **B)** inserción de *csrA* en el vector de clonación pJET1.2/Blunt; **C)** plásmido pAmeA que contiene el gene *csrA*.

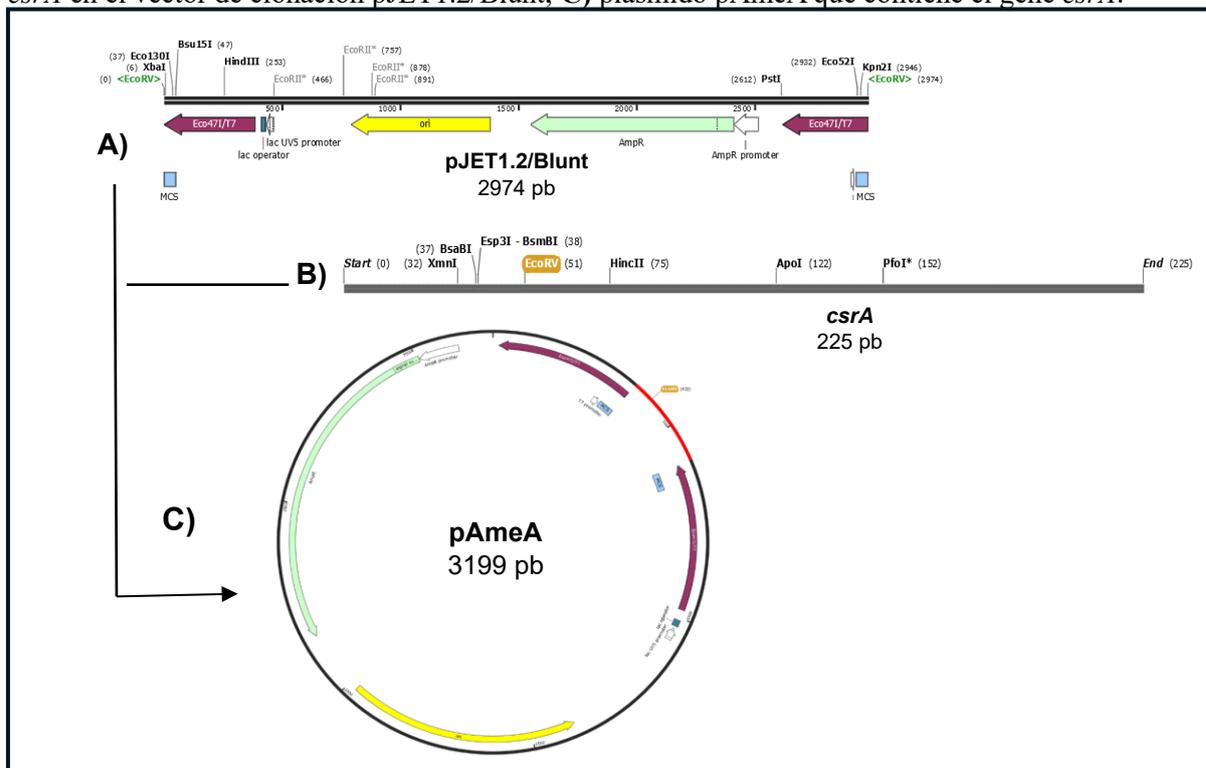
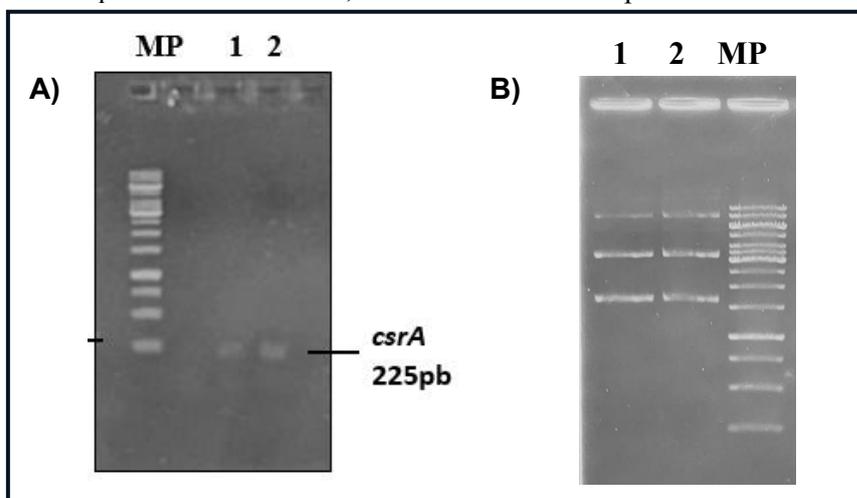


Figura 4. A) Amplificación del gen *csrA*. Gel de agarosa al 1% donde se utilizó una temperatura de alineamiento de 51 °C. Carril MP: Marcador de peso molecular de 1Kb. Carril 1 y 2: Fragmento de 225 pb correspondiente a *csrA*. **B) Extracción de ADN plasmídico.** Gel agarosa al 1%. Carril 1: plásmido pAmeA obtenido de la cepa candidata AmeA2; Carril 2: plásmido pAmeA obtenido de la cepa candidata AmeA3; Carril 3: Marcador de peso molecular 1Kb.



CONCLUSIÓN

En este trabajo se lograron cumplir los objetivos postulados, se confirmó que el gen *csrA* pertenece al operón de la síntesis flagelar de *Bacillus licheniformis*. Se obtuvo la construcción y confirmación del plásmido pAmeA conteniendo el gen *csrA* de *Bacillus licheniformis* M2-7, también se obtuvo la construcción de la cepa de *E. coli* AmeA. Descartando mutaciones en el plásmido por medio de la secuenciación.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Eugenia Flores Alfaro, Gerardo Huerta Beristain, Sebastián Lorenzo Benito y Erubiel Toledo Hernández por la asesoría y corrección del proyecto desarrollado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Guavara-Luna, J., Serrano-Ángel, L. I., Rodríguez-Barrera, M. Ángel, Hernández-Flores, G., Toribio-Jiménez, J., Toledo-Hernández, E., & Romero-Ramírez, Y. (2022). Isolated bacteria from hot springs able to use hydrocarbons as carbon source. *Revista Internacional De Contaminación Ambiental*, 38, 68–77. <https://doi.org/10.20937/RICA.54234>
- Guevara-Luna, J., Alvarez-Fitz, P., Ríos-Leal, E., Acevedo-Quiroz, M., Encarnación-Guevara, S., Moreno-Godinez, et al., (2018). Biotransformation of benzo[a]pyrene by the thermophilic

- bacterium *Bacillus licheniformis* M2-7. *World journal of microbiology & biotechnology*, 34(7), 88. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2469-9>
- Rojas-Aparicio, A., Toribio-Jim, J., Rodríguez-Barrera, M. A., Castellanos-Escamilla, M., & Romero-Ramírez, Y. (2018). Expresión genética de *pobA* y *fabHB* en *Bacillus licheniformis* M2-7 en presencia de benzo [a] pireno. *Genética e Investigación Molecular*, 17 (2). <https://doi.org/10.4238/gmr16039916>
- Da Silva Santos , F., & López Vargas , R. (2020). Efecto del Estrés en la Función Inmune en Pacientes con Enfermedades Autoinmunes: una Revisión de Estudios Latinoamericanos. *Revista Científica De Salud Y Desarrollo Humano*, 1(1), 46–59. <https://doi.org/10.61368/r.s.d.h.v1i1.9>
- Serrano Ángel, L.I., Segura, D., Toribio Jiménez, J., Rodríguez Barrera, M.A., Ortuño Pineda, C. and Romero Ramírez Y. (2020). Carbon storage regulator A (*csrA*) gene regulates motility and growth of *Bacillus licheniformis* in the presence of hydrocarbons. *Microbiology and Biotechnology Letters*. 48(2), 185–192. <https://doi.org/10.4014/mbl.1909.09014>
- Blancas, Y. M., Terán, J. D. R., Eligio, J. A. H., Pineda, C. O., Jiménez, J. T., Barrera, M. Á. R., & Ramírez, Y. R. (2023). The *catE* gene of *Bacillus licheniformis* M2-7 is essential for growth in Benzopyrene and its expression is regulated by the Csr system. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2507976/v1>
- Vakulskas, C. A., Potts, A. H., Babitzke, P., Ahmer, B. M., & Romeo, T. (2015). Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 79(2), 193–224. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00052-14>
- Lawhon, S. D., Frye, J. G., Suyemoto, M., Porwollik, S., McClelland, M., & Altier, C. (2003). Global regulation by CsrA in *Salmonella typhimurium*. *Molecular microbiology*, 48(6), 1633–1645. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03535.x>
- Yakhnin, H., Pandit, P., Petty, T. J., Baker, C. S., Romeo, T., & Babitzke, P. (2007). CsrA of *Bacillus subtilis* regulates translation initiation of the gene encoding the flagellin protein (*hag*) by blocking ribosome binding. *Molecular microbiology*, 64(6), 1605–1620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05765.x>



- Edwards, A. N., Patterson-Fortin, L. M., Vakulskas, C. A., Mercante, J. W., Potrykus, K., Vinella, D., Camacho, M. I., Fields, J. A., Thompson, S. A., Georgellis, D., Cashel, M., Babitzke, P., & Romeo, T. (2011). Circuitry linking the Csr and stringent response global regulatory systems. *Molecular microbiology*, 80(6), 1561–1580. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07663.x>
- Leng, Y., Vakulskas, C. A., Zere, T. R., Pickering, B. S., Watnick, P. I., Babitzke, P., & Romeo, T. (2016). Regulation of CsrB/C sRNA decay by EIIA(Glc) of the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Molecular microbiology*, 99(4), 627–639. <https://doi.org/10.1111/mmi.13259>
- Romeo T. (1998). Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Molecular microbiology*, 29(6), 1321–1330. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01021.x>
- Vilela Pincay, W. E. (2024). Análisis de Gestión Territorial, Social, Ambiental, Urbanístico del Gad del Cantón Arenillas. *Estudios Y Perspectivas Revista Científica Y Académica* , 4(1), 33–52. <https://doi.org/10.61384/r.c.a.v4i1.73>
- Vilela Pincay, W. E. (2024). Análisis de Gestión Territorial, Social, Ambiental, Urbanístico del Gad del Cantón Arenillas. *Estudios Y Perspectivas Revista Científica Y Académica* , 4(1), 33–52. <https://doi.org/10.61384/r.c.a.v4i1.74>
- Pourciau, C., Lai, Y. J., Gorelik, M., Babitzke, P., & Romeo, T. (2020). Diverse Mechanisms and Circuitry for Global Regulation by the RNA-Binding Protein CsrA. *Frontiers in microbiology*, 11, 601352. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.601352>
- Elenga-Wilson, P. S., Kayath, C. A., Mokemiabeka, N. S., Nzaou, S. A. E., Nguimbi, E., & Ahombo, G. (2021). Profiling of Indigenous Biosurfactant-Producing Bacillus Isolates in the Bioremediation of Soil Contaminated by Petroleum Products and Olive Oil. *International Journal of Microbiology*, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2021/9565930>
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition, Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York



- Mukherjee, S., Yakhnin, H., Kysela, D., Sokoloski, J., Babitzke, P., & Kearns, D. B. (2011). CsrA-FliW interaction governs flagellin homeostasis and a checkpoint on flagellar morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 82(2), 447–461. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07822.x>
- Babitzke, P., & Romeo, T. (2007). CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Current opinion in microbiology*, 10(2), 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.03.007>
- Yakhnin, H., Yakhnin, A. V., Baker, C. S., Sineva, E., Berezin, I., Romeo, T., & Babitzke, P. (2011). Complex regulation of the global regulatory gene *csrA*: CsrA-mediated translational repression, transcription from five promoters by $E\sigma^{70}$ and $E\sigma(S)$, and indirect transcriptional activation by CsrA. *Molecular microbiology*, 81(3), 689–704. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07723.x>
- Müller, P., Gimpel, M., Wildenhain, T., & Brantl, S. (2019). A new role for CsrA: promotion of complex formation between an sRNA and its mRNA target in *Bacillus subtilis*. *RNA Biology*, 16(7), 972–987. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1605811>
- Manzano Vela, M. P. (2024). Prevalencia y epidemiología de la hepatitis A en niños menores de 6 años: Una revisión sistemática de la literatura. *Revista Científica De Salud Y Desarrollo Humano*, 5(2), 69–100. <https://doi.org/10.61368/r.s.d.h.v5i2.122>
- Kodackattumannil, P., Sasi, S., Krishnan, S., Lekshmi, G., Kottackal, M., & Amiri, K. M. A. (2023). Protocol for the High-quality Plasmid Isolation from Different Recalcitrant Bacterial Species: *Agrobacterium* spp., *Rhizobium* sp., and *Bacillus thuringiensis*. *Bio-protocol*, 13(15), e4788. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4788>
- Bautista, D. P., Pérez, M. G., & Algreto-Badillo, I. (2015). From sequencing to hardware acceleration of DNA alignment software: A integral review. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 36(3), 257–275. <https://doi.org/10.17488/rmib.36.3.6>

