

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE EXPRESIÓN DE LOS GENES *nprR*-*nprX*, *spo0A*, *nprA* Y *cry1Ac* EN *Bacillus thuringiensis* VARIEDAD *kurstaki* HD-73.

Tesis

Para obtener el grado de:

Doctor en Biotecnología

Presenta:

Humberto Rafael Bravo Delgado

Directora de tesis:

Dra. Ana Karin Navarro Martinez

Co-director de tesis:

Dr. Julián Mario Peña Castro

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México

2018



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2016/139
ASUNTO	Jurado asignado para examen de grado DB

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 25 de Octubre de 2016

C. HUMBERTO RAFAEL BRAVO DELGADO
ESTUDIANTE DEL DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Doctor en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dra. Jacqueline Capataz Tafur	UNPA	Presidente
Dr. Edgar García López	UNPA	Vocal
Dr. Adolfo López Torres	UNPA	Vocal
Dra. Alma Xochil Ávila Alejandre	UNPA	Vocal
Dr. Miguel Ángel Peña Rico	UNPA	Secretario
Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia	UNPA	1er Suplente
Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa	UNPA	2º Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji jú



MARIO VALERA ZARAGOZA
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado



M. EN C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA
Vice-rector Académico
Vo. Bo. VICE-RECTORIA
ACADEMICA

C.c.p. Dra. Ana Karin Navarro Martínez – Directora de tesis.
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo.

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2018/024
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 22 de mayo de 2018

L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Doctor en Biotecnología del **C. Humberto Rafael Bravo Delgado**, matrícula 10160001, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Estudio de la cinética de expresión de los genes *nprR-nprX*, *spo0A*, *nprA* y *cry1Ac* en *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki* HD-73**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

Sin otro asunto en particular, me despido quedando atenta ante cualquier duda y deseándole suerte en todas sus actividades.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji jú

Dra. Sandra T. del Moral Ventura
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. C. Humberto Rafael Bravo Delgado.
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

Dedico esta tesis a mi Dios, mi hijo Samuel, mi hija Saraluz, mi mamá y a esa mujer que fué mi apoyo incondicional e incomparable, Luz.

AGRADECIMIENTOS

Mis palabras se quedan cortas al decir GRACIAS a todas y todos aquellos que me ayudaron, pero de corazón agradezco a mi madre, mi familia y mis hijos por ser mi apoyo incondicional.

Agradezco a mis amigos por darme la fuerza de seguir adelante, al club PCCH, al Dr. Andrés, Dra. Jacqueline, Dra. Sandra, Dr. Abad, Dra. Blanca, Dr. Victor y a la QFB. Lety, por ayudarme y prestarme sus equipos amablemente. Expreso mis más sinceros agradecimientos a mis directores de tesis la Dra. Ana Karin y al Dr. Julian Peña, por soportarme y darme la confianza de haber sido su tesista doctoral. Gracias al Dr. Fermin del CINVESTAV-IPN de la unidad Zacatenco, por abrirme las puertas para la realización de mis pruebas en el fermentador.

Agradezco al AI Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mediante el proyecto No. 105057-CB-2018 y al Programa de Mejoramiento del Profesorado mediante el proyecto No. 103.5/10/0246, por haber financiado esta tesis doctoral.

Para todos y todas las personas que fueron parte de mi crecimiento profesional, GRACIAS.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
1.1 ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MARCO TEÓRICO	5
3.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
3.2 Esporulación de <i>B. thuringiensis</i>	6
3.2.1 Regulación transcripcional del inicio de la esporulación	10
3.3 Toxinas Cry	11
3.4 Producción de poli- β -hidroxibutirato (PHB).....	14
3.5 Comunicación célula-célula mediada por <i>Quorum Sensing</i>	15
3.6 Efecto de la proteinasa K sobre la proteasa neutral A (NprA).....	22
3.7 Modelo de Gompertz.....	23
4. JUSTIFICACIÓN	25
5. HIPÓTESIS	27
6. OBJETIVOS.....	28
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
7.1 Microorganismo.....	29
7.2 Elaboración de discos de esporas	29
7.3 Medio de cultivo	30
7.4 Cultivo en fermentador	31
7.4.1 Inóculo.....	31
7.4.2 Fermentación	31
7.5 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	32
7.5.2 Cuantificación de glucosa	32
7.5.3 Cuantificación de poli- β -hidroxibutirato (PHB).....	33
7.5.4 Detección de proteína Cry.....	34
7.6 Modelo de crecimiento	34
7.7 Caracterización molecular de los genes <i>nprR-nprRB</i> , <i>nprA</i> , <i>cry</i> y <i>spo0A</i>	35

7.8 Análisis bioinformático del péptido señal	37
7.9 Cuantificación de los genes <i>nprR-nprRB</i> , <i>spo0A</i> , <i>nprA</i> y <i>cry1Ac</i> por PCR en tiempo real (qPCR)	37
7.9.1 Extracción de ARN.....	37
7.9.2 Síntesis de ADNc y cuantificación de los transcritos <i>nprR-nprRB</i> , <i>nprA</i> y <i>cry1Ac</i>	38
7.9.3 PCR cuantitativa	39
8. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	41
8.1 Identificación molecular de la cepa	41
8.2 Cultivo en Matraz	43
8.2.1 Modelo de estudio y cálculo del tiempo crítico (tc).....	43
8.2.2 Efecto de la adición de proteinasa K.....	45
8.2.3 Detección de proteína Cry.....	49
8.3 Cultivo en fermentador.....	51
8.3.1 Fermentaciones adicionando proteinasa K.....	56
8.4 Análisis bioinformático del péptido señal	60
8.5 Estandarización de la técnica de qPCR para la cuantificación de la transcripción de los genes <i>nprR-nprRB</i> , <i>spo0A</i> , <i>nprA</i> y <i>cry1Ac</i>	63
8.6 Cuantificación de la transcripción de los genes <i>nprR-nprRB</i> , <i>spo0A</i> , <i>nprA</i> y <i>cry1Ac</i>	65
9. CONCLUSIONES	69
10. RECOMENDACIONES.....	70
11. BIBLIOGRAFÍA	71
12. NOMENCLATURA.....	81
13. ANEXOS	82

Índice de figuras

Figura 1. Microfotografía de <i>Bacillus thuringiensis</i> en microscopio electrónico de transmisión. Se muestra el cristal proteínico romboide compuesto de toxina Cry y la espora en proceso de formación.....	6
Figura 2. Fases del cultivo de <i>B. thuringiensis</i>	7
Figura 3. Acontecimientos morfológicos de la esporulación de <i>B. subtilis</i>	8
Figura 4. Relación de la formación de poli- β -hidroxibutirato con respecto a la biomasa a cada tiempo entre la cantidad máxima de la misma (X/X_{max}).....	15
Figura 5. Modelo para dos péptidos de señalización extracelular implicados en la respuesta <i>quórum</i> en <i>B. subtilis</i>	19
Figura 6. Sistema NprR–NprX en cepas específicas.	21
Figura 7. Secuencia de aminoácidos de la proteasa neutral A.....	22
Figura 8. Modelo de Gompertz y cálculo del tiempo crítico.	24
Figura 11. Gel electroforético del 8% (SDS-PAGE).	42
Figura 12. Cinéticas de crecimiento y de esporas de <i>B. thuringiensis</i> en matraz.....	43
Figura 13. Simulación de la cinética de crecimiento y modelo de Gompertz de <i>B. thuringiensis</i>	44
Figura 14. Cinética de crecimiento en matraz de <i>B. thuringiensis</i> con proteasa K a diferentes tiempos de la fermentación.....	47
Figura 15. Cinéticas de consumo de glucosa realizadas en matraz con tratamientos donde se adicionó PK.	48
Figura 16. Gel electroforético del 8% (SDS-PAGE).	50
Figura 17. Simulación de la cinética de crecimiento de <i>B. thuringiensis</i> en fermentador usando el modelo de Gompertz.	52
Figura 18. Cinética de crecimiento de <i>B. thuringiensis</i> en fermentador (●) control (▲) adicionando proteasa K en el tiempo crítico.....	53
Figura 19. Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y formación de PHB de <i>B. thuringiensis</i> HD-73 en condiciones normarles en fermentador.	55
Figura 20. Gel electroforético del 8% (SDS-PAGE)	56
Figura 21. Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y formación de PHB de <i>B. thuringiensis</i> HD-73 adicionando PK en fermentador.....	57
Figura 22. Cinéticas de <i>B. thuringiensis</i> sin adicionar (●) y adicionando (△) PK a las cuatro horas en fermentador..	59
Figura 23. Diagrama de predicción del sitio de corte más probable del péptido de señalización excretado de acuerdo al modelo de Markov.	61
Figura 24. Alineamiento de péptidos NprX de <i>B. thuringiensis</i> . ClustaW de todas las secuencias reportadas en NCBI de <i>B. thuringiensis</i>	62
Figura 25. Gel de ARN de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes.	64

Figura 26. Curva de RFU de diferentes diluciones de ADNc usando el par de oligos 16S rANF.....	64
Figura 27. Cinética de la expresión de genes <i>nprX</i> , <i>nprA</i> , <i>spo0A</i> y <i>cry</i> de <i>B. thuringiensis</i> (●) adicionando y (△) sin adicionar proteasa K en fermentador.....	66
Figura 28. Gel electroforético del 8% (SDS-PAGE), donde se observa el efecto de la adición de PK en diferentes tiempos de la cinética de <i>B. thuringiensis</i> var. HD-73 en fermentador.....	68

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de proteínas Cry de <i>B. thuringiensis</i> de acuerdo a sus propiedades insecticidas.	12
Tabla 2. Sitios de corte de NprA producidos por la proteasa K.	23
Tabla 3. Composición del medio Gerry Rowe para cultivos de <i>B. thuringiensis</i> (Rowe, 1990).	30
Tabla 4. Condiciones de operación del fermentador	32
Tabla 5. Oligonucleótidos usados para la amplificación de los genes <i>nprR-nprX</i> , <i>nprA</i> , <i>cry1AC</i> y <i>16s</i>	36
Tabla 6. Condiciones de síntesis de ADNc.	39
Tabla 7. Oligonucleótidos usados para qPCR.	40
Tabla 8. Parámetros cinéticos de <i>B. thuringiensis</i> con proteasa K.....	46
Tabla 9. Velocidad específica de consumo de glucosa de <i>B. thuringiensis</i> en matraz adicionando PK a diferentes tiempos.	49

Esta tesis fue realizada en los laboratorios de Bioprocesos y de Biología Molecular de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, bajo la asesoría de la Dra. Ana Karin Navarro Martínez y el Dr. Julián Mario Peña Castro.

La investigación fue realizada con el financiamiento proyecto de Ciencia Básica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mediante el proyecto No. 105057-CB-2018 y al Programa de Mejoramiento del Profesorado mediante el proyecto No. 103.5/10/0246, y se contó con la beca de tesis del mismo proyecto asignada con Número de becario 105057.

1. RESUMEN

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram positiva que durante la esporulación sintetiza una δ -endotoxina cristalina llamada proteína Cry, que tiene capacidad insecticida específica para una amplia gama de larvas de insectos. La cantidad de Cry que se sintetiza depende de muchas variables como son el medio de cultivo, la variedad de la cepa, la cantidad de nutrientes y la formación de ácido poli- β -hidroxibutírico (PHB) como sustrato endógeno. En el presente trabajo, se estudió el efecto en las señales proteicas del quorum sensing y en la expresión de los genes; de esporulación *spo0A*, de la proteína *cry1Ac*, de señalización por densidad celular *nprR-nprX* y de la proteasa neutral *nprA*. Adicionalmente, la expresión de los genes se relacionó con la formación de PHB, esporas y proteína Cry formada. Para lo anterior, se hicieron fermentaciones en matraz y en biorreactor con la adición de proteasa K (un inhibidor de proteasas extracelular) en el tiempo crítico de crecimiento celular. Se realizaron cinéticas de crecimiento celular, formación de esporas, consumo de glucosa, producción de proteína Cry y de PHB, así como la cuantificación de transcripción de los genes *nprR-nprX*, *spo0A*, *nprA* y *cry1Ac*. Los resultados mostraron que la incorporación de proteasa K en el tiempo crítico de la fermentación, retrasó la liberación de esporas, incrementando la cantidad de células vegetativas e inhibiendo la formación de proteína Cry1Ac. Mientras que la transcripción de los genes *nprR-nprX* y *nprA* se retardó dos horas en las fermentaciones después de adicionar la proteasa K. La transcripción de los genes *nprA* y *spo0A*, fue hasta 5 veces y dos veces mayor en los tratamientos con proteasa K en comparación con el control, respectivamente. Por otro lado, la transcripción de *nprR-nprX* fue 0.4 veces menor en la fermentación con proteasa K con un tiempo de aparición de 2 horas después que la fermentación control. Todo lo anterior, indica que la proteasa K puede hidrolizar péptidos involucrados en la comunicación celular o recepción de señales, implicando que la principal señal para estos eventos moleculares es extracelular y de naturaleza protéica.

1.1 ABSTRACT

Bacillus thuringiensis is a Gram-positive bacteria that synthesizes a crystalline δ -endotoxin called Cry protein during sporulation. It has the capacity to be an insecticide specific to a broad range of insect larva. The amount of Cry synthesized depends on many variables, such as, the culture medium, the variety of the strain, the number of nutrients, and the formation of Poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) as the endogenous substrate. In the present work, the kinetics of the expression of the *spo0A* sporulation gene, the *cry1Ac* protein gene, the *nprR-nprX* cell density signaling gene, and the *nprA* neutral protease gene were studied. Additionally, the expression was related to the formation of PHB, spores, and Cry protein. For the above, fermentations were carried out in flask and in fermenter with (an extracellular protease inhibitor) protease K at the critical time of cell growth. Cell, spores, Cry, glucose, and PHB kinetics and quantification of transcription were performed. The results showed that the addition of protease K at the critical time of fermentation delayed the release of spores, increased the number of vegetative cells, and inhibited the formation of Cry1Ac protein. Transcription of the *nprR-nprX* and *nprA* genes were delayed for two hours and in the fermentations where protease K was added. Transcription of the *nprA* gene was up to 5-fold higher in the protease K treatments compared to the control. The transcription of the sporulation factor *spo0A* was higher in the fermentation with protease K, almost twice as compared to the control fermentation. The transcription of *nprR-nprX* was 0.4-fold lower in protease fermentation, and the time of onset was 2 hours after the fermentation control. All of the above information indicates that protease K can hydrolyze peptides involved in cellular communication or signal reception, implying that the main signal for these molecular events is extracellular and of proteic nature.

2. INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis al igual que otros bacilos del género, produce ácido poli- β -hidroxibutírico (PHB) al final de su crecimiento vegetativo (Rowe y Margaritis, 1987; Benoit *et al.*, 1990). El PHB contenido en las células alcanza su valor máximo justo antes del inicio de la esporulación y su posterior consumo está relacionado con la aparición de esporas maduras (Kominek y Halvanson, 1965; Benoit *et al.*, 1990, Kraemer y Moser, 1996). El PHB sirve como una reserva endógena de carbono y energía durante la esporulación de *B. thuringiensis* (Rowe y Margaritis, 1987, Benoit *et al.*, 1990; Kraemer and Moser, 1996). Liu y Tzeng, (2000) sugirieron que concentraciones elevadas de acetatos o PHB estimulan la producción de proteína Cry. Rowe y Margaritis (1987) y Navarro *et al.*, (2006) sugieren que el PHB es necesario como una fuente energética para la síntesis de la δ -endotoxina denominada proteína Cry.

Para regular la expresión de genes y su desarrollo, diferentes tipos de bacterias usan la comunicación célula-célula, un proceso denominado *quorum sensing*. Este proceso se lleva a cabo por intercambio de moléculas de señalización nombradas autoinductores, la cual involucra la respuesta reguladora a las señales de densidad celular (Solomon *et al.*, 1996). Mediante este sistema, las bacterias sincronizan funciones como competencia genética, bioluminiscencia, secreción de factores de virulencia, formación de biopelículas, esporulación, conjugación y producción de pigmentos (Lazazzera, 2000). *Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positiva que utiliza *quorum sensing* para regular procesos de competencia genética y de esporulación (Aronson, 2002). Debido a su cercana relación filogenética con *B. thuringiensis*, se cree que los mecanismos de regulación de esporulación de estas dos especies son muy parecidos (Aronson, 2002). Se han encontrado señales de *quorum sensing* durante la fase de transición de *B. subtilis*, por ejemplo, péptidos como CFS (factor de competencia a esporulación), PhrA y PhrE (péptidos transportadores de fosfatos), que están involucrados en la regulación de otros factores como Spo0A (factor δ^A) y Spo0F (factor δ^F) los cuales son indispensables

para la esporulación y producción de proteína Cry. Chen *et al.* (2010), reportaron que el factor de transcripción Spo0A se requiere para la acumulación de PHB y la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de PHB en *B. thuringiensis*.

En *B. thuringiensis* se han identificado oligopéptidos y proteínas como NprRB y NprR que son péptidos de señalización similares a Phr (péptidos reguladores de fosfatos) y Rap (aspartil fosfato fosfatasa) de *B. subtilis* (Pottathil y Lazazzera, 2003), lo cual impulsa a estudiar la función específica de proteínas como NprRB en la síntesis de PHB y por consiguiente en la formación de esporas y proteína Cry por *Bacillus thuringiensis*.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la cinética de la expresión de gen *cry1Ac*, de los genes de señalización por densidad celular *nprR-nprRB* y del gen de la proteasa neutral *nprA*, y su relación con la formación de PHB, esporas y proteína Cry por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73.

3. MARCO TEÓRICO

El control de insectos plaga en la agricultura, y de mosquitos vectores de enfermedades humanas como malaria y dengue, se ha realizado principalmente con la aplicación de insecticidas químicos. Estos insecticidas han generado problemas de contaminación ambiental, de toxicidad a insectos no blanco y a los agricultores que los aplican. Se estima que cada 40 segundos muere un humano por problemas de intoxicación generados por contaminación con plaguicidas (Bravo y Soberon, 2007). Una de las herramientas de la biotecnología agrícola es el control biológico que consiste de todos aquellos sistemas destinados al control de plagas y enfermedades de las plantas, en los que el principio activo es un organismo vivo (microorganismos entomopatógenos, entomófagos, parásitos o depredadores) y/o una sustancia biológicamente activa que se produce por microorganismos o plantas (Tamez *et al.*, 2001).

B. thuringiensis es el insecticida biológico que más se utiliza comercialmente y se ocupa para el control de insectos plaga en la agricultura y de mosquitos vectores de enfermedades. La bioactividad específica de este bacilo se debe a la producción de un cristal, formado por proteínas Cry (Vilas *et al.*, 2007). Una característica importante de las proteínas Cry producidas por *B. thuringiensis* es que son altamente específicas e inocuas para vertebrados y otros insectos no blanco (Bravo y Soberon, 2007).

3.1 *Bacillus thuringiensis*

El grupo de *Bacillus cereus* incluye seis especies muy relacionadas y cuyos genomas son ricos en adeninas-timinas como: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pseudomycooides*, *B. weihenstephanensis* y *B. thuringiensis* (Slamti y Lereclus, 2005). *B. thuringiensis* a diferencia de las bacterias formadoras de esporas, sintetiza a la

proteína Cry (Ko *et al.*, 2004). Muchas de sus características fenotípicas son comunes a *B. cereus*, incluyendo la movilidad, los requerimientos nutricionales, la actividad hemolítica y la resistencia a ampicilina (Vilas *et al.*, 2007). *B. thuringiensis* se considera una bacteria ubicua, ya que se ha aislado de todas partes del mundo y de muy diversos sistemas como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas y en diferentes climas (Figura 1; Bravo y Soberon, 2007).

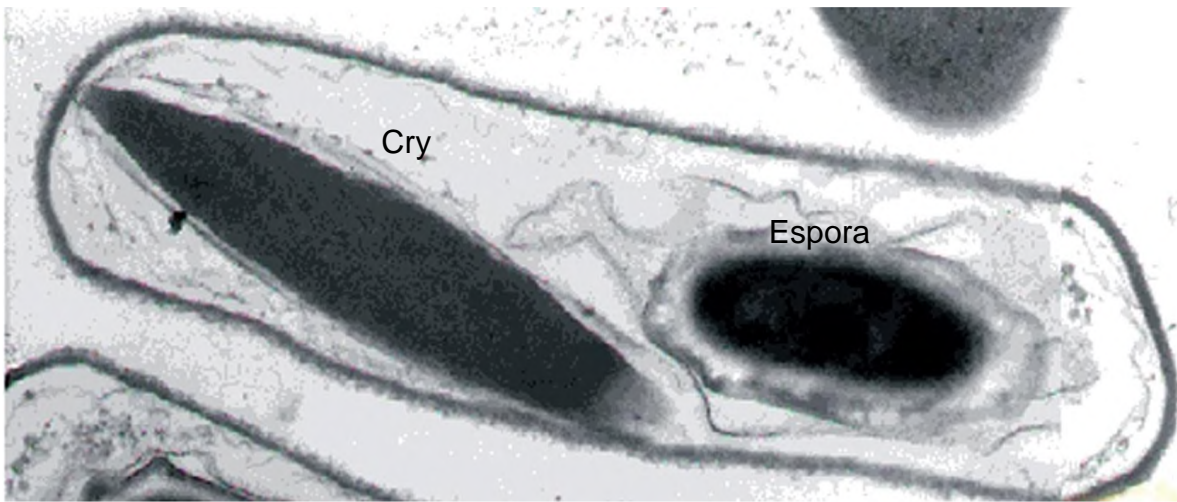


Figura 1. Microfotografía de *Bacillus thuringiensis* en microscopio electrónico de transmisión. Se muestra el cristal proteínico romboide compuesto de toxina Cry y la espora en proceso de formación (Bravo y Soberon, 2007).

En el curso del crecimiento de *B. thuringiensis* se observan en términos generales tres fases secuenciales que son: crecimiento vegetativo, transición y esporulación (Figura 2; Rowe, 1990; Navarro *et al.*, 2006). En el crecimiento vegetativo la bacteria se duplica por bipartición. En la transición no hay una diferenciación de bacteria a espora, sin embargo, es la etapa donde se transcriben muchos factores que regulan el proceso de esporulación y se forma el PHB (Navarro *et al.*, 2006). Finalmente, la fase de esporulación es un programa de diferenciación de bacteria a espora (Errington, 1993; Navarro *et al.*, 2006).

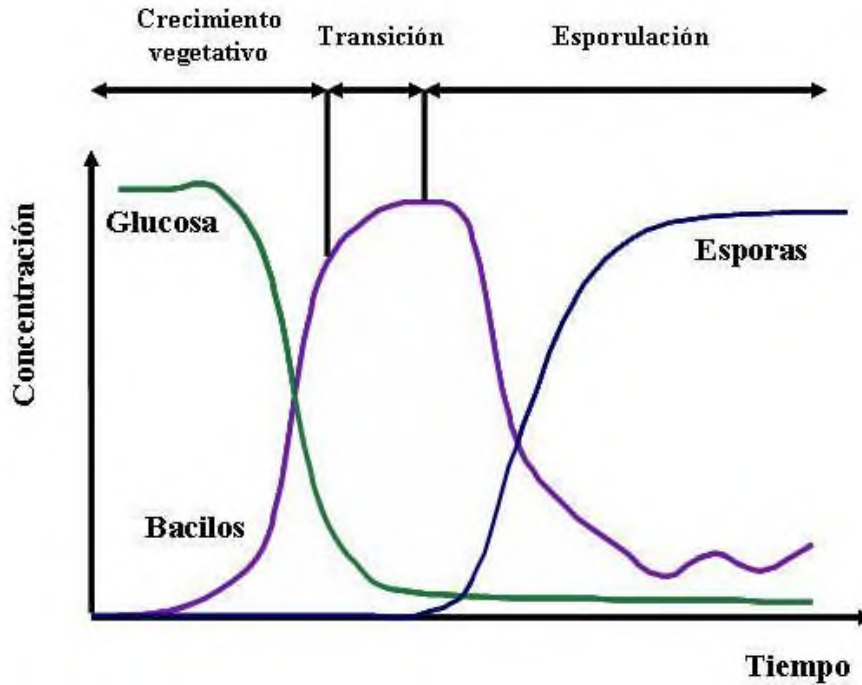


Figura 2. Fases del cultivo de *B. thuringiensis* (Navarro, 1999).

3.2 Esporulación de *B. thuringiensis*

La formación de la endospora es el proceso de adaptación de la bacteria a la inanición (Errington, 1993). La respuesta involucra la cooperación de dos células hermanas con genomas idénticos, en una serie de cambios desarrollados que culminan en el empaquetamiento de una célula en una capa dura y resistente (Figura 3). A diferencia de otras respuestas de adaptación, la esporulación toma muchas horas (más de 6 h) e incluye importantes cambios en la morfología celular, así como en la bioquímica y la fisiología. Las células se duplican en longitud y luego se dividen centralmente para producir dos células hijas y diferenciadas (Errington, 1993; Verplaetse *et al.*, 2015).

El inicio de la esporulación es complejo y, al menos tres tipos de señales se integran en la célula antes de que se inicie: nutricional, por densidad celular y del ciclo celular. La señal nutricional se da por el agotamiento de las fuentes de carbono, nitrógeno o fósforo, la glucosa reprime esta señal (Sonenshein *et al.*, 1989). Freese *et al.* (1981), mostraron que la concentración de GTP o GDP probablemente represente el efector clave de las señales nutricionales. En *B. subtilis* la proteína CodY se une al GTP y detecta la concentración de GTP intracelular como un indicador nutricional y regula la transcripción de la fase estacionaria y los genes de esporulación, permitiendo a la célula adaptarse a la limitación de nutrientes (Ratnayake *et al.*, 2001).

Otra señal es la inducida por la densidad celular. Grossman y Losick (1988) mostraron que la esporulación no se induce eficientemente en cultivos celulares que mantienen una densidad celular baja. Sin embargo, se obtiene una esporulación eficiente cuando las células se suspenden en baja densidad en medios condicionados. Las células cultivadas en densidades relativamente altas producen una sustancia que posiblemente sea un oligopéptido, que es necesario para una esporulación eficiente, al cual nombraron Factor de Eficiencia Extracelular (EDF-1). La producción de EDF-1 proviene de varios genes *spo*, principalmente de *spo0A*, *spo0B* y *spo0H* (Grossman y Losick, 1988). Por último el ciclo celular es una señal principal para iniciar el ciclo de la esporulación y puede ocurrir sólo en un punto específico en la división celular (Errington, 1993). Aunque la relación entre el ciclo celular y la iniciación se conoce bien (Clarke y Mandelstam, 1980; Dunn *et al.*, 1978; Keynan *et al.*, 1976; Mandelstam y Higgs, 1974), la forma por la cual los indicadores celulares progresan a través del ciclo celular y transmiten esta información para el complejo transcripcional se desconoce.

3.2.1 Regulación transcripcional del inicio de la esporulación

En *B. subtilis* se requieren a los reguladores transcripcionales, σ^H y Spo0A para el inicio de la esporulación (Poncet *et al.*, 1997; Errington, 1993). El gen *spo0A* se transcribe de dos promotores reconocidos por la ARN polimerasa asociados con σ^A y σ^H . En *B. subtilis* la proteína reguladora Spo0A, además de ser clave para la iniciación de la esporulación (Baldus *et al.*, 1994), controla otras funciones como formación de biopelículas (Hamon y Lazazzera, 2001), desarrollo de competencia genética (Hahn *et al.*, 1995), canibalismo (Gonzalez *et al.*, 2003), resistencia al frío y calor (Mendez *et al.*, 2004), biosíntesis de dipéptidos como la bacilisina (Karatas *et al.*, 2003) y producción de proteasas extracelulares (Kodoma *et al.*, 2007). La forma fosforilada de Spo0A interactúa con una secuencia específica de ADN llamada caja "0A" (5' TGNCGAA 3') y de ese modo reprime o estimula un conjunto de genes específicos para la esporulación (Molle *et al.*, 2003). Después de comenzar la esporulación, se activan una serie de factores sigma, los cuales se ligan al núcleo de la ARN polimerasa, permitiendo la regulación de genes específicos para la esporulación (Haldenwang, 1995; Baldus *et al.*, 1994; Errington, 1993). La regulación de genes temporales durante el proceso de esporulación en *B. thuringiensis* es muy similar al de *B. subtilis*, y las proteínas Spo0A son homólogas (Lereclus *et al.*, 1994).

Muchos genes de proteína Cry de *B. thuringiensis* están bajo el control de factores sigma específicos para la esporulación. En *B. thuringiensis* el gen *cry1Aa* se transcribe durante la fase de esporulación por dos factores de transcripción sigma específicos de esporulación σ^{35} y σ^H (Wong *et al.*, 1983; Brown y Whiteley, 1988). En *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, los genes *cry4A*, *cry4B*, *cry11A* y *cry1A* se transcriben durante la mitad de la esporulación por promotores σ^{35} reconocidos por la ARN polimerasa. Por otra parte, la transcripción de los genes *cyt1A* y *cry11A* continúan en la última fase de la esporulación por los promotores σ^{28} reconocidos por

la ARN polimerasa (Waalwijk *et al.*, 1985; Ward y Ellar, 1986; Yoshisue *et al.*, 1993; Dervyn *et al.*, 1995).

Chen *et al.* (2010), presentaron la primera evidencia genética donde mostraron que Spo0A se involucra en la acumulación y expresión de genes para la biosíntesis de PHB (poli- β -hidroxibutirato) en *B. thuringiensis*. Al mutar a *spo0A*, disminuyó significativamente la acumulación de PHB, sugiriendo así un nuevo papel para Spo0A en la regulación de procesos asociados en la fase estacionaria.

3.3 Proteínas Cry

Se define como proteína Cry a cualquier proteína paraesporal de *B. thuringiensis* que muestre un efecto tóxico hacia algún organismo, verificable por medio de bioensayos así como cualquier proteína que muestre homología con las proteínas Cry (Bravo and Soberon, 2007). Las proteínas Cry pertenecen al grupo de toxinas formadoras de poros (PFT, por sus siglas en inglés) y se conoce que su efecto tóxico se debe a la formación de poros iónicos en la membrana de las células epiteliales del intestino medio del insecto, lo que conduce a edema celular, parálisis del intestino, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte por septicemia (Fernández *et al.*, 2006). Las proteínas Cry se producen como protoxinas que requieren procesarse proteolíticamente por proteasas presentes en el intestino de insectos susceptibles. Este procesamiento proteolítico libera fragmentos tóxicos de 55 a 65 kDa que interactúan con proteínas receptoras presentes en la microvellosidad de las células intestinales de los insectos blanco (Bravo *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2008). La interacción del receptor de la toxina Cry es un paso clave que determina la especificidad de insectos (Schnepf *et al.*, 1998). Aún más, el principal mecanismo de resistencia a las toxinas Cry son mutaciones que afectan a la interacción de la toxina-receptor (Ferré y Van Rie, 2002). Diferentes proteínas como las cadherinas, aminopeptidasa-N (APN, por su siglas en inglés), y fosfatasa alcalina (ALP, por su

siglas en inglés) se han caracterizado como receptores-Cry en diferentes especies de insecto (Jurat and Adang, 2004; Knight *et al.*, 1994; Vadlamudi *et al.*, 1995).

Existe una una clasificación para las proteínas Cry (CryI, II, III y IV), con base en sus propiedades insecticidas y moleculares (Tabla 1). Las proteínas Cry a su vez se agruparon en clases y subclases (A, B, C. . . y a, b, c. . .) de acuerdo a su secuencia de aminoácidos (Hofte y Whiteley, 1989). Las inclusiones cristalinas producidas por *B. thuringiensis* se pueden también clasificar en cinco tipos generales: bipiramidal, esférica, rectangular, en punta irregular o esférica irregular (Cannon, 1996).

Tabla 1. Clasificación de proteínas Cry de *B. thuringiensis* de acuerdo a sus propiedades insecticidas.

Tipo de proteína Cry	Insectos de importancia comercial
CryI	Lepidóptera
CryII	Lepidóptera y díptera
CryIII	Coleóptera
CryIV	Díptera

Fuente: Hofte y Whiteley, (1989).

Los cristales bipiramidales generalmente son más tóxicos que los otros y tienen efecto insecticida principalmente en lepidópteros. Los cristales esféricos irregulares pueden ser mosquitocidas, mientras que los romboides afectan a ciertas especies de coleópteros. Por último, los de punta irregular presentan actividad toxicológica no identificada (Cannon, 1996).

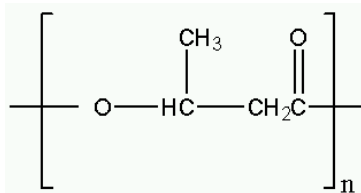
A la fecha, las proteínas Cry se distribuyen en 50 grupos y varios subgrupos. Cada grupo es altamente específico para ciertos tipos de insectos. Esta información se actualiza constantemente y se consulta en la siguiente dirección URL: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html.

B. thuringiensis var. *kurstaki* HD-73 se conoce por tener un único gen *cry*, *cry1Ac*. El gen *cry1Ac* es un típico gen *cry* dependiente de la esporulación, cuyo promotor es reconocido por factores σ^E y σ^K durante la esporulación (Wilcks *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 1983). Schnepf *et al.*, (1987) realizaron un análisis transcripcional de genes *cry1Ac* clonados en cepas de *Escherichia coli*, y concluyeron que el sitio de iniciación de la transcripción del gen *cry1Ac* es reconocido por el promotor σ^A , aunque su regulación transcripcional se da durante las fases exponenciales y de transición de *B. thuringiensis*.

Yang *et al.* (2012), analizaron la transcripción del gen *cry1Ac* durante las fases exponenciales y de transición en diferentes cepas de *B. thuringiensis*, con la técnica del sistema reportero de proteína verde fluorescente (GFP), y demostraron que el gen *cry1Ac* se transcribe en células mutantes de *B. thuringiensis* no esporuladas llamadas HD Δ *spo0A* (P-*cry1Ac-gfp*), lo cual indica que no necesariamente debe haber esporulación para la transcripción del gen *cry1Ac*. Estos resultados también demostraron que el promotor *cry1Ac* tuvo actividad de transcripción independiente de la esporulación y se reguló por otros factores en las células no esporuladas.

3.4 Producción de poli- β -hidroxibutirato (PHB)

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son poliésteres de hidroxiácidos sintetizados naturalmente por bacterias (Adwitiya *et al.*, 2009). Los PHAs son acumulados como inclusiones citoplasmáticas en ciertas bacterias durante condiciones de crecimiento desequilibrado (suministro en exceso o por la falta de uno o más nutrientes esenciales). El poli- β -hidroxibutirato (PHB) es el PHA más conocido (Adwitiya *et al.*, 2009). El PHB es un poliéster alifático de cadena lineal cuyo peso molecular varía de 60,000 a 250,000 Da y el punto de fusión varía de 157 a 188 °C. Es soluble en cloroformo, dicloroetileno y trifluoroetanol, y es sintetizado por un gran número de microorganismos como fuente de reserva de carbono y energía. Su fórmula es:



Como muchos bacilos, *B. thuringiensis* produce poli- β -hidroxibutirato (PHB) al final del crecimiento vegetativo (Rowe y Margaritis, 1987, 1994 Benoit *et al.*, 1990, Kraemer y Moser, 1996). Se observó que en cultivos de *B. thuringiensis*, así como de otras bacterias, la máxima acumulación de PHB se da en la fase de transición (cerca del 10% de peso seco) y desaparece en curso de la esporulación (Benoit *et al.*, 1990; Navarro *et al.*, 2006). El PHB celular alcanza su valor máximo justo antes del inicio de la esporulación, su posterior consumo se relaciona con la aparición de esporas maduras (Kominek y Halvanson, 1965, Benoit *et al.*, 1990, Kraemer y Moser 1996). Liu y Tzeng, (2000) sugirieron que altas concentraciones de acetatos o PHB estimulan la producción de δ -endotoxina. Rowe y Margaritis, (1987) y Navarro *et al.*, (2006) propusieron que el PHB es necesario como una fuente energética para la síntesis de la δ -endotoxina.

Navarro *et al.* (2006) establecieron una relación de proporcionalidad entre la cantidad de PHB acumulado y la cantidad de Cry producida, concluyendo que el PHB es una fuente de carbono y energía importante para el proceso de esporulación. Además, se observó que para la producción de proteína Cry es necesaria una concentración mínima de PHB acumulada de aproximadamente 0.52 mg/L (Navarro, *et al.*, 2006). Mediante gráficas de estado de la formación de PHB en función de la relación X/X_{\max} observaron que alrededor de 0.76 ± 0.11 g/g de X/X_{\max} , se inicia la producción del PHB (Figura 4). Esto coincide con la cinética experimental de formación de PHB (6 ± 1 horas). Es decir, que al llegar al 76% del crecimiento máximo aparentemente se da una señal por densidad celular y da inicio a la producción del PHB que antecede la esporulación (Navarro *et al.*, 2006).

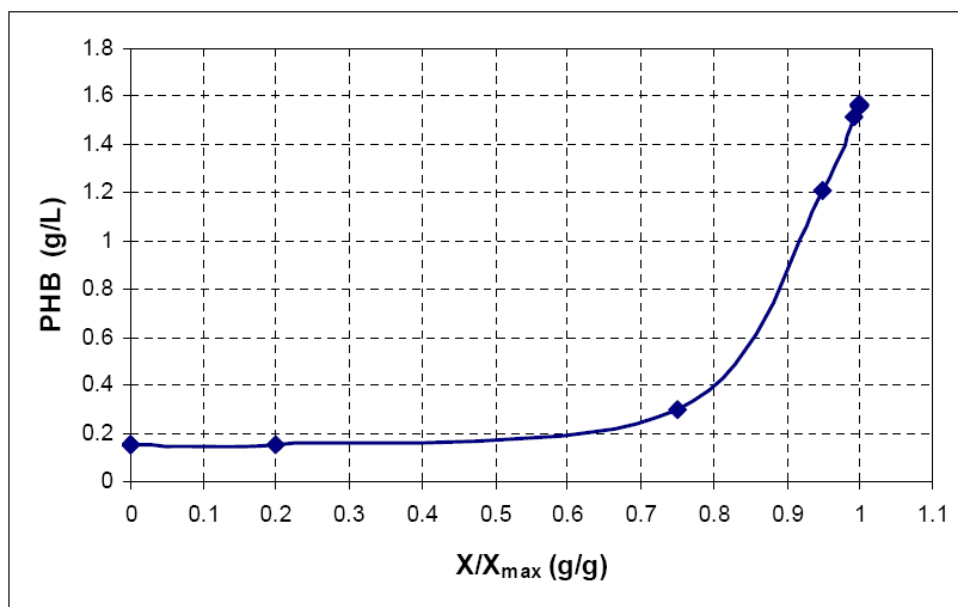


Figura 4. Relación de la formación de poli-β-hidroxibutirato con respecto a la biomasa a cada tiempo entre la cantidad máxima de la misma (X/X_{max}) (Navarro, 1999).

3.5 Comunicación célula-célula mediada por *Quorum Sensing*

La señalización célula-célula es una actividad fundamental llevada a cabo por muchos tipos de bacterias (Winans y Dunny, 1999). La comunicación célula-célula o *quorum sensing* (QS), es un proceso biológico que comúnmente se refiere a la habilidad de las bacterias a responder a moléculas químicas que se nombran autoinductores (Reading y Sperandio, 2006; Slamti *et al.*, 2014). Estos autoinductores incrementan su concentración externa en respuesta a un aumento en la densidad celular (Waters y Bassler, 2005). Estas moléculas autoinductoras incluyen el N-acilhomoserina lactonas (AHLs) (Greenberg y Fuqua, 1998), utilizado por bacterias Gram-negativas, y péptidos pequeños, usados por las bacterias Gram-positivas (Dunny y Leonard, 1997). En bacterias Gram-positivas la comunicación celular depende principalmente de la regulación de sensores citoplasmáticos por péptidos de señalización que son excretados y reintroducidos (Slamti *et al.*, 2014). En diversas bacterias, los procesos celulares se regulan por *quorum sensing* van desde el desarrollo de competencia genética (es decir, la capacidad natural para

tomar ADN exógeno) en *B. subtilis* y *Streptococcus pneumoniae* (Solomon y Grossman, 1996); la virulencia de *B. thuringiensis* y la formación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* (Dunny y Leonard, 1997; Greenberg y Fuqua, 1998; Agaisse *et al.*, 199); necrotrofismo de *B. thuringiensis* (Dubois *et al.*, 2013; Perchat *et al.*, 2016); hasta la bioluminiscencia en *Vibrio fischeri* y *V. harveyi* (Fuqua *et al.*, 1996).

Al comenzar la fase estacionaria del cultivo de *B. thuringiensis*, se alteran los patrones de expresión genética para permitir ampliar la supervivencia celular en la ausencia de nutrientes. Así, la necesidad de nutrientes es la principal señal de regulación para entrar a la fase estacionaria (Fuqua *et al.*, 1996). Para las bacterias no esporuladas, como *E. coli*, resulta que la fase estacionaria incrementa la resistencia a una serie de tensiones ambientales, tales como alta osmolaridad, agentes oxidantes y altas temperaturas (Fuqua *et al.*, 1996, Zambrano y Kolter, 1996). En *B. thuringiensis* la transición a la fase estacionaria está dirigida por factores de transcripción claves, la actividad o producción de las cuales es estimulada por la necesidad de nutrientes (Lazazzera, 2000).

En *B. subtilis*, hay dos péptidos pequeños extracelulares de señalización, la feromona ComX y el CSF (factor de competencia y esporulación) que regulan la actividad del factor de transcripción ComA (Figura 5; Solomon *et al.*, 1996). ComA activa la expresión de varios genes, incluyendo uno para el desarrollo de la competencia genética, constituyendo la respuesta por *quórum* (Lazazzera, *et al.*, 1999). La feromona ComX está formada por diez aminoácidos (ADPITRQWGD), los cuales provienen de la hidrólisis de un péptido maduro de 55 aminoácidos, y contiene una modificación hidrofóbica en un residuo triptófano el cual se convierte en alanina al momento de ser exportado extracelular para la actividad de señalización (Miller y Bassler, 2001; Schneider *et al.*, 2002). Una vez que se procesa, se secreta por ComQ y su acumulación extracelular hace que se active la cascada de fosforilación de dos componentes ComP/ComA (Schauder y Bassler, 2001). El péptido ComX maduro es detectado por el sensor histidina cinasa (ComP) que se encuentra unido a

la membrana y estimula la autofosforilación y transferencia del fosfato al regulador de respuesta ComA unido al ADN (Waters y Bassler, 2005). El péptido ComA fosforilado activa la expresión del gen *comS* y ComS inhibe la degradación proteolítica de la proteína ComK. Con ello, se incrementan los niveles de este activador transcripcional encargado de controlar la expresión de genes estructurales requeridos para el desarrollo de la competencia genética (Waters y Bassler, 2005). En este proceso la bacteria receptora se convierte en competente con el fin de adquirir moléculas de ADN exógeno (Miller y Bassler, 2001).

El segundo péptido autoinductor en *B. subtilis*, es el pentapéptido CSF. El CSF es un pentapéptido proveniente del péptido precursor de 35 aminoácidos PhrC, que sufre un corte de cinco aminoácidos del C-terminal para formar la molécula señal (ERGMT) (Miller y Bassler, 2001). En contraste con otros autoinductores, CSF tiene una función de señalización intracelular que origina su importación a *B. subtilis* mediante el péptido transportador tipo ABC llamado Opp (Schauder y Bassler, 2001). CSF incrementa su concentración en el ambiente extracelular como regulador de la densidad celular. A bajas concentraciones, CSF inhibe a la fosfatasa de ComA llamada RapC causando un incremento en los niveles de ComA-P, y de esta manera, se promueve el desarrollo de la competencia (Miller y Bassler, 2001). En niveles altos, CSF disminuye el desarrollo de la competencia y favorece a la esporulación (Waters y Bassler, 2005). Esto sucede al inhibir la expresión de *comS*, que resulta en un incremento de la proteólisis para ComK (proteína para competencia). CSF inhibe también a la fosfatasa RapB que defosforila al regulador de respuesta (Spo0A) e incrementa los niveles de Spo0A-P y enciende la vía de esporulación (Figura 5; Miller y Bassler, 2001).

Según Anderson, (2005), el proceso de esporulación en *B. thuringiensis* es probablemente muy similar al ya caracterizado en *B. subtilis*. Esto se debe a que la mayoría de los puntos de regulación y genes estructurales de *B. subtilis* se encuentran muy conservados en *B. thuringiensis* (más del 50% de identidad en la secuencia de aminoácidos), tales como genes *spo0*, factores sigma y genes que

codifican para cinasas. Además, también existen regiones conservadas en las secuencias involucradas en la fosforilación. Hay al menos cinco genes en bacterias Gram positivas formadoras de esporas que codifican proteínas similares a las fosfatasas Rap de *B. subtilis*. De igual manera, presentan un gen *phr* inmediatamente corriente abajo. Dos de estos genes se encuentran en *Clostridium acetobutylicum* y uno en *B. anthracis*, *B. stearothermophilus* y *B. thuringiensis*. En ésta última, el gen codifica para una proteína nombrada NprR formada por 42 aminoácidos (~46 kDa), de acuerdo a los resultados reportados por un análisis bioinformático (Pottathil y Lazizzera, 2003). En *B. subtilis* NprR se describió como un regulador de la expresión del gen estructural *nprE*, el cual codifica para una proteasa neutra (Uehara *et al.*, 1979).

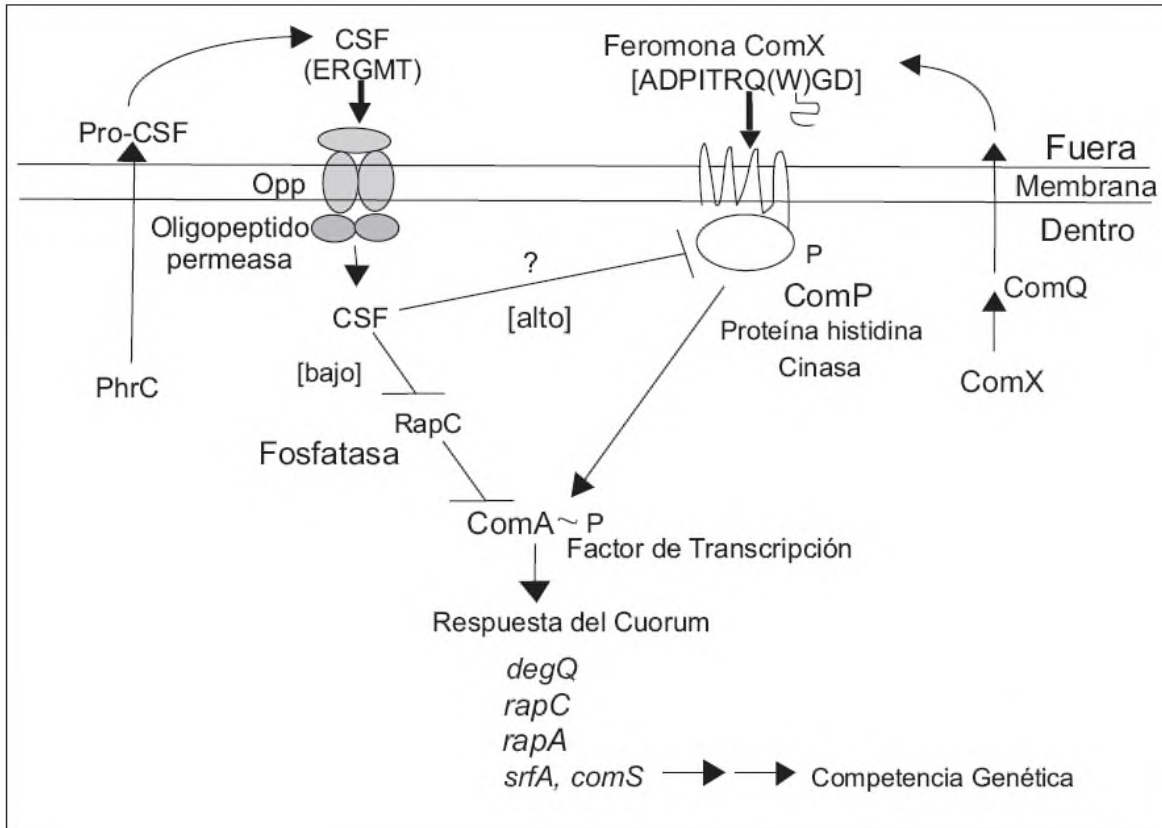


Figura 5. Modelo para dos péptidos de señalización extracelular implicados en la respuesta *quórum* en *B. subtilis*. CSF se codifica por PhrC y expulsada como una pro-proteína (Pro-CSF). ComX se expulsa de la célula, y requiere a ComQ para la producción. Se indica la secuencia de aminoácidos de los péptidos de señalización CSF y de feromonas ComX. La línea ondulada debajo de la feromona ComX indica una modificación desconocida en un triptófano (W). Ambos péptidos ComX y CSF, estimulan la actividad del factor de transcripción ComA, a través de la fosforilación (ComA~P), se activan varios genes que constituyen la respuesta de *quórum*. La feromona ComX estimula la fosforilación de ComA al interactuar con la membrana asociada a la proteína histidina quinasa, ComP. CSF se importa por una permeasa oligopéptica (Opp), e interactúa con dos objetivos intracelulares. Para aumentar el nivel de ComA~P, CSF, en bajas concentraciones, inhibe la actividad de una fosfato aspartil fosfatasa, RapC, que desfosforila a ComA~P. Al disminuir el nivel de ComA~P, CSF, a altas concentraciones, se especula que inhiben la actividad quinasa de ComP. Los genes que han demostrado ser regulados por el comA~P se enlistan. *degQ* codifica un regulador de producción de enzimas degradativas. *rapA* y *rapC* codifican fosfatasas que regulan negativamente la esporulación y a ComA~P, respectivamente. *srfA* y *comS* codifican enzimas surfactina biosintéticas y a un regulador de desarrollo de competencias, respectivamente. Lazazzera, 2000.

Para *B. subtilis* se reportó que CFS controla la esporulación por *quórum sensing* (Pottathil y Lazazzera, 2003). En *B. thuringiensis* var. *kurstaki* se observó durante la fase de transición que el péptido SKPDT proviene de NprX (MKKALAGILAVAVVLTIVGGVQYTSKPDTYGLDSSVSQTV NN), y es un péptido de señalización (Aceves *et al.*, 2007). Acevez *et al.* (2007) observaron que la adición de los péptidos sintéticos SKPDT y CSF (ERGMT) durante la fase de transición, no

afecta la cinética de crecimiento de *B. thuringiensis* var. *Kurstaki*. Sin embargo, observaron que el SKPDT estimuló la esporulación, la liberación de esporas y la transcripción de *cry1Aa* mientras que ERGMT no estimuló ni el crecimiento ni la esporulación. Los autores concluyen que el péptido de señalización SKPDT probablemente sea un agente del *quorum sensing* de la familia de los péptidos de señalización Phr en *B. thuringiensis*.

Perchat *et al.* (2011), estudiaron el papel que juega cada regulador de NprR, en el grupo de *Bacillus cereus*, donde se encuentra *B. thuringiensis*. Los autores mostraron que NprR es un regulador transcripcional y que su actividad depende de un péptido de señalización llamado NprX o NprRB. Además de que el fragmento mínimo requerido de NprX para iniciar la transcripción completa de NprA es de siete aminoácidos, que corresponde a una región interna del carboxilo terminal. En conjunto NprX-NprR activan la transcripción del gen de la proteasa neutral (*nprA*) durante la primera fase del proceso de esporulación. Mediante un análisis bioinformático ClustalX y la construcción de un árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de NprR, Perchat *et al.* (2011) dividieron en 7 grupos los heptapéptidos con especies de *Bacillus* no específicas: por ejemplo el grupo 1 contiene NprR de *B. anthracis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis*, y el grupo 6 contiene NprR de *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* (Figura 6)

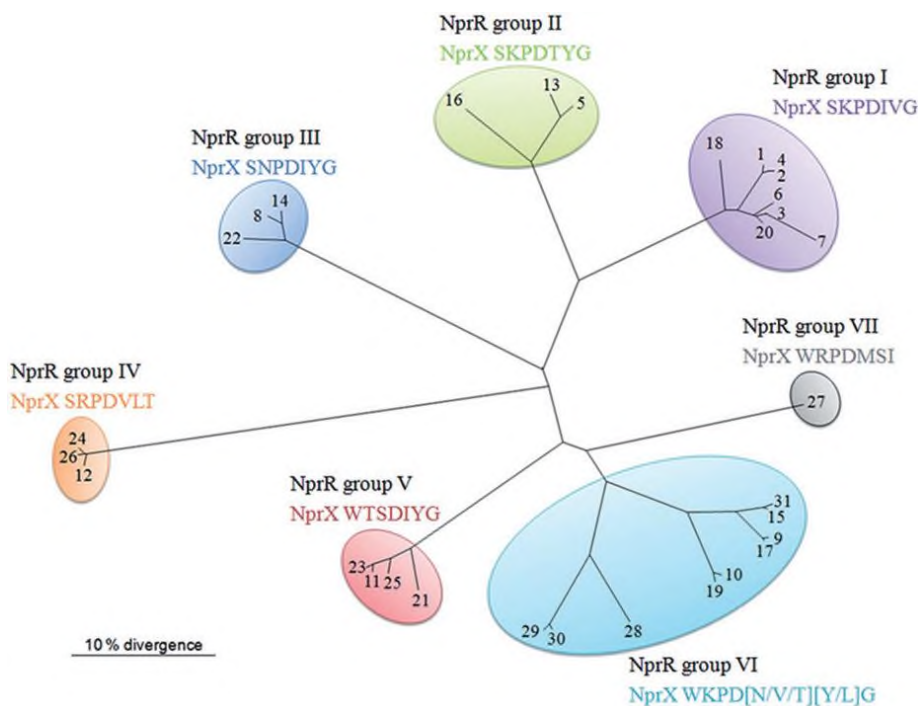


Figura 6. Sistema NprR–NprX en cepas específicas. Las secuencias peptídicas de NprR se dividen en 7 grupos los cuales corresponden a siete clases de NprX. Este árbol filogenético se construyó sobre las bases de las secuencias del péptido NprR de cepas que pertenecen al grupo de *B. cereus*, se usó el programa ClustalX y Treeview. Los números 1 y 2 se refieren a cepas *B. anthracis*, número 3-12 refieren cepas de *B. thuringiensis*, números 13-28 refieren a cepas de *B. cereus*, número 20 refiere a *B. mycooides*, número 30 refiere a *B. pseudomycooides* y 31 refiere a cepas de *B. weihenstephanensis*. Los colores designan al clúster individual de NprR con el cual se asocia a un NprX: morado indica el NprX SKPIVG, verde indica el NprX SKPDIYG, azul indica el NprX SNPDIYG, naranja el NprX SRPDVLT, rojo indica el NprX WTSDIYG, turquesa indica el NprX WKPD[N/V/T][Y/L]G y gris indica el NprX WRPDMSI (Perchat *et al.*, 2011).

El gen *nprA* codifica para una proteasa neutral A (NprA) en *B. thuringiensis* que está formada por 566 aminoácidos y tiene un tamaño de 60,982 Da (Figura 7; Donovan *et al.*, 1997). La actividad proteolítica de NprA puede procesar o degradar extracelularmente la proteína Cry (Andrews *et al.*, 1985; Bibilos y Andrews, 1988; Carroll y Ellar, 1989; Chestukhina *et al.*, 1980; Kunitate *et al.*, 1989). Donovan *et al.* (1997) comprobaron con una cepa de *B. thuringiensis* donde el gen *nprA* fue mutado, que se produce cierta cantidad de proteína Cry, sin embargo era muy poca comparada con la cepa nativa, sugiriendo que sólo cierto porcentaje de proteína Cry es susceptible al procesamiento por la proteasa neutral A. Los estudios donde se utilizaron inhibidores de la proteasa neutral A encontraron actividades de tipo cisteín,

métalo y serínproteasas en *B. thuringiensis* (Li y Yousteh, 1975; Chestukhina *et al.*, 1980; Pfannenstiel *et al.*, 1984; Andrews *et al.*, 1985; Thurley *et al.*, 1985; Bibilos y Andrews, 1988;). La estabilidad de la proteína Cry en *B. thuringiensis* se maximiza cuando las proteasas AprA (proteasa alcalina A) y NpRA (proteasa neutra A) se desactivan (Tan y Donovan *et al.*, 2000).

3.6 Efecto de la proteasa K sobre la proteasa neutral A (NprA)

La proteasa neutral A (NprA) se puede hidrolizar por proteasas que no son propias de *B. thuringiensis* como la proteasa K, que reconoce sitios específicos en diferentes proteínas (Petrotchenko *et al.*, 2012).

```

      10           20           30           40           50           60
MKKKSLALVL  ATGMAVTTFG  GTGSAFADSK  NVLSTKKYNE  TVQSPEFISG  DLTEATGKKA
      70           80           90          100          110          120
ESVVF DYLN A  AKGDYKLG EK  SAQDSFKVKQ  VKKDAVTDST  VVRMQQVYEG  VPVWGSTQVA
     130          140          150          160          170          180
HVSKD GSLKV  LSGTVAPDLD  KKEKLNKKNK  IEGAKAIEIA  QQDLGVTPKY  EVEPKADLYV
     190          200          210          220          230          240
YQNGEETTYA  YVVNLNFLDP  SPGNYYYYFIE  ADSGKVLNKF  NTIDHVTNDD  KSPVKQEAPK
     250          260          270          280          290          300
QDAKAVVKPV  TGTNKVGTGK  GVLGDTKSLN  TTLSGSSYYL  QDNTRGATIF  TYDAKNRSTL
     310          320          330          340          350          360
PGTLWADADN  VFNAAYDAAA  VDAHYYAGIT  YDYKNTFNR  NSINDAGAPL  KSTVHYGSNY
     370          380          390          400          410          420
NNAFWNGSQM  VYGDGDGVTF  TSLSGGIDVI  GHETHAVTE  NSSNLIYQNE  SGALNEAID
     430          440          450          460          470          480
IFGTLVEFYD  NRNPDWEIGE  DIYTPGKAGD  ALRMSDPTK  YGDPDHYSKR  YTGSSDNGGV
     490          500          510          520          530          540
HTNSGIINKQ  AYLLANGGTH  YGVTVNGIGK  DKLGAIIYRA  NTQYFTQSTT  FSQARAGAVQ
     550
AAADLYGANS  AEVAVKQSF  SAVGIN
    
```

Figura 7. Secuencia de aminoácidos de la proteasa neutral A.

Tabla 2. Sitios de corte de NprA producidos por la proteasa K.

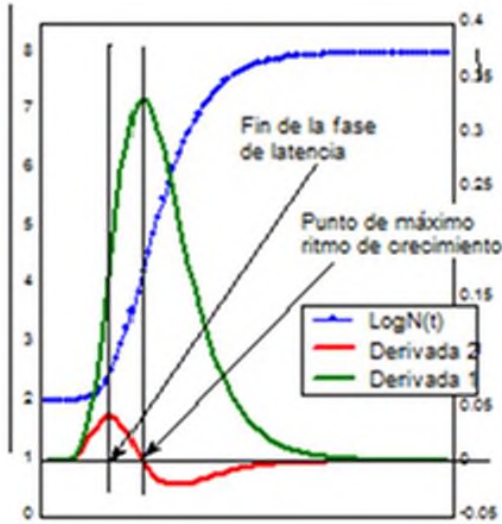
Enzima	Número de cortes	Posiciones de los sitios de corte
Proteasa K	283	6 7 8 9 10 11 12 15 16 17 18 19 22 25 26 27 32 33 35 38 40 41
		42 46 47 48 52 53 54 55 56 60 61 63 64 65 67 68 70 71 75 77
		79 82 86 88 91 95 96 97 100 101 102 107 108 109 111 113 114
		117 119 120 122 128 130 131 134 135 136 139 143 145 151
		152 154 156 157 158 159 160 164 166 167 170 171 172 173
		176 178 179 180 181 185 186 187 188 189 190 191 192 193
		195 197 198 205 206 207 208 209 210 211 216 217 220 222
		223 226 227 234 237 238 243 245 246 247 250 251 253 256
		258 262 263 266 269 271 272 273 278 279 280 284 287 288
		289 290 291 292 294 299 300 303 304 305 306 308 311 312
		314 315 316 318 319 320 321 323 325 326 327 329 330 331
		333 334 337 338 343 346 348 350 353 354 356 360 363 364
		365 371 372 378 379 380 381 383 387 389 390 393 394 395
		397 398 399 400 405 406 407 410 413 414 416 417 418 421
		422 424 425 426 427 428 429 436 437 438 440 442 443 444
		448 451 452 459 461 467 471 472 480 482 486 487 491 492
		493 494 495 499 501 503 504 505 508 513 515 516 517 518
		520 522 524 525 526 529 530 531 534 536 538 539 541 542
		543 545 546 548 551 552 553 554 555 556 560 562 563 565

Con este análisis se puede observar de manera putativa, que la proteasa NprA (Figura 7) se hidroliza por la proteasa K, lo cual probablemente tendría un efecto significativo en la producción de proteína Cry y en la transcripción de algunos genes implicados en la comunicación celular como *nprX-nprR*.

3.7 Modelo de Gompertz

El modelo de Gompertz es una ecuación sigmoideal de tres parámetros que representa el número de células en función del tiempo. A través del teorema de la segunda derivada del modelo de Gompertz se puede evaluar el punto crítico de la curva de crecimiento. Este punto crítico representa el tiempo crítico en crecimiento de

B. thuringiensis, que se puede definir como; el tiempo en el que se desacelera el crecimiento de células en la fase exponencial (Navarro, 1999; Figura 8).



$$X = X_{max} e^{-\lambda e^{-\mu_{max} t}}$$

$$X'' = 0 = -\mu_{max} e^{-\mu_{max} t} e^{-\lambda e^{-\mu_{max} t}} + \mu_{max} \lambda e^{-2\mu_{max} t} e^{-\lambda e^{-\mu_{max} t}}$$

$$0 = e^{\lambda - \mu_{max} t}$$

$$t_c = \frac{\ln \lambda}{\mu_{max}}$$

Figura 8. Modelo de Gompertz y cálculo del tiempo crítico.

4. JUSTIFICACIÓN

La biotecnología agrícola está enfocada a dar solución a problemas de baja producción y pérdidas económicas de cultivos provocadas por factores bióticos y abióticos para lograr una agricultura sustentable. Uno de los objetivos de la biotecnología agrícola es reducir la dependencia del uso intensivo de insecticidas químicos sin afectar la productividad del campo, teniendo como consecuencia la reducción tanto en el costo de insumos como de los problemas ambientales. Una de las herramientas de la biotecnología agrícola es el control biológico constituido por todos aquellos sistemas destinados al control de plagas y enfermedades de las diferentes plantas, en los que el principio activo es un organismo vivo (microorganismos entomopatógenos, entomófagos, parásitos o depredadores) y/o una sustancia biológicamente activa (producidos por organismos o extractos de plantas) (Tamez *et al.*, 2001). Los organismos entomopatógenos infectan al insecto y se reproducen en él hasta causarle la muerte y pueden ser: hongos, virus, bacterias, protozoarios y nemátodos (Tamez *et al.*, 2001). Uno de los patógenos más utilizados es *Bacillus thuringiensis*, capaz de producir una δ -endotoxina altamente tóxica y específica, utilizada para formular bioinsecticidas. México ocupa el lugar número 16 a nivel mundial aplicando bioinsecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*, con una superficie de 0.2 millones de has (Clive, 2014).

Debido a que la esporulación es un proceso que consume grandes cantidades de energía, la célula debe de tomar la decisión de esporular basado en la cantidad, naturaleza y disponibilidad de los nutrientes, así como del monitoreo de la densidad celular local (Aceves *et al.*, 2007). Además de que una vez que la bacteria ha iniciado la etapa de transición esta predestinada a esporular (Phillips y Strauch, 2002). Aparentemente dicho momento esta relacionado con la acumulación de PHB, que será utilizado como fuente de carbono y energía para el proceso de esporulación (Navarro *et al.*, 2006), y con el conjunto NprX-NprR que activan la transcripción del gen de la proteasa neutral NprA (Perchat *et al.*, 2011).

Por lo tanto en el presente trabajo se estableció el efecto de la adición de proteasa K en las señales proteicas del *quorum sensing* y su efecto en la expresión de los genes *cry1Ac*, *nprA*, *nprR* y *nprX*, así como la formación del PHB y en consecuencia a la producción de proteína Cry.

5. HIPÓTESIS

La adición de proteasa K modificará las señales de *quorum sensing* de naturaleza proteica en *B. thuringiensis* y afectará la expresión de los genes *cry1Ac*, *nprA*, *nprR* y *nprX*, así como la la formación del PHB y en consecuencia a la producción de proteína Cry.

6. OBJETIVOS

General

Estudiar el efecto de proteasa K en la expresión de los genes *nprR-nprX*, *spo0A*, *nprX* y *cry1Ac* en *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki* HD-73, así como en la producción de proteína Cry y PHB.

Objetivos Particulares:

- a. Identificar la cepa y establecer el modelo de estudio para la obtención del tiempo crítico.
- b. Aislar los genes *nprR-nprX*, *nprA*, *spo0A* y *cry1Ac* de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-73.
- c. Determinar el efecto de la proteasa K en la formación de PHB, esporas y proteína Cry.
- d. Determinar el efecto de la proteasa K en la expresión de los genes *nprR-nprX*, *nprA*, *spo0A* y *cry1Ac*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Microorganismo

Se utilizó *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki* cepa HD-73 (ATCC-35866), tipo de cristal K-73 y productora de proteína Cry1A(c). Esta cepa fue una donación del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Estudios Avanzados del IPN. A su vez, se adquirió del Insect Pathology Research Unit de United States Department of Agriculture, Brownsville, Texas.

7.2 Elaboración de discos de esporas

La conservación de la cepa se realizó mediante discos de esporas. La cepa se cultivó en dos matraces de 500 mL con 250 mL de medio cultivo Gerry Rowe (Rowe, 1990; Tabla 3) durante 20 horas aproximadamente a 30 °C y 180 rpm en una agitadora Megafuge 16R (Thermo Scientific, USA). Posteriormente, con este cultivo se sembraron cajas petri con agar nutritivo por estría cruzada por triplicado. Se incubaron a 30 °C durante 56 h, hasta alcanzar un 90% de esporulación de acuerdo al conteo de esporas en cámara de Neubauer a 40X. De las cajas sembradas, se tomó con un asa bacteriológica la mayor cantidad posible de células y se colocaron en un frasco con 20 mL de solución salina previamente esterilizado. En discos de papel filtro se adicionaron 20 µL de solución salina con aproximadamente 10^8 células, y se dejaron secar en condiciones axénicas a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, los discos de esporas se guardaron en congelación a -20 °C.

Tabla 3. Composición del medio Gerry Rowe para cultivos de *B. thuringiensis* (Rowe, 1990).

Componente	Cantidad para 1 L
Glucosa	10 g
Peptona de caseína	3.2 g
Extracto de levadura	3.2 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.106 g
KCl	0.5 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.3 g
MgSO ₄	0.05 g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.0075 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.0045 g
Fe(C ₆ H ₅ O ₇)	0.075 g
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	1.153 g
Na ₂ HPO ₄	1.856 g

7.3 Cultivo en matraz

El inóculo se preparó partiendo de los discos de esporas previamente elaborados. La primera etapa se realizó en un matraz Erlenmeyer de 1 L con 250 mL de medio Gerry Rowe (Tabla 3) con un disco de esporas como inóculo. Se cultivó durante 12 h a 30 °C en una agitadora a 180 rpm.

Los cultivos se realizaron en matraces de 1 L con 250 mL de medio Gerry Rowe con 5 % (v/v) del inóculo, al cual se le adicionó proteasa K (PK) a 100 nM para hidrolizar péptidos extracelulares, entre los que estuvieran el péptido NprA que forma *B. thuringiensis*. La PK se incorporo al inicio de la fase de transición, para ello se calculó el tiempo crítico (tc) mediante el modelo de Gompertz (Ec 1). Los cultivos controles sólo contuvieron medio Gerry Rowe sin PK. Todos los experimentos se hicieron por triplicado. El muestro se hizo cada dos horas durante 30 h, y se

determinaron las cinéticas de crecimiento celular, formación de esporas, consumo de glucosa, producción de proteína Cry y de PHB, así como la cuantificación de transcripción de los genes *nprR-nprX*, *spo0A*, *nprA* y *cry1Ac*

7.4 Cultivo en fermentador

7.4.1 Inóculo

El inóculo fue hecho en un matraz Erlenmeyer de 1 L con 300 mL de medio Gerry Rowe (Tabla 3) inoculado con un disco de esporas. Se cultivó durante 12 h a 30 °C en una agitadora a 180 rpm.

7.4.2 Fermentación

Las fermentaciones se desarrollaron en un fermentador BIOFLO 3000 (New Brunswick Scientific, USA) con 3 L de medio Gerry Rowe, con un vaso modelo SG de 5 L de capacidad nominal, con instrumentación completa. Las condiciones de operación se presentan en la Tabla 4.

Se hicieron dos fermentaciones con su réplica; la primera fermentación fue como control y se usó para determinar el tiempo crítico en el cual se adicionaría la proteasa K. La segunda fermentación se le adicionó 100 nM de proteasa K.

El fermentador se inoculó con el 5% del cultivo inóculo (v/v). Durante la cinética de crecimiento se extrajeron cada dos horas 50 mL de mosto para la cuantificación de biomasa, glucosa, PHB, Cry, formación de esporas y ARNm para el seguimiento de la transcripción de los genes *nprA*, *cry1AC*, *nprR-nprX* y *spo0A*. La cinética se siguió por 24 horas.

Tabla 4. Condiciones de operación del fermentador

Volumen	3 L
Agitación	600 rpm
Temperatura	30°C±1
Aireación	1 vvm
pH	7.4 ± 2 (controlado con NaOH 2M y H ₃ PO ₄ 0.67M)
Oxígeno disuelto	Mayor 20 %

7.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

7.5.1 Cuantificación de bacilos y esporas

La cuantificación se realizó por cuenta directa en una cámara de Neubauer usando un microscopio de contraste de fase marca Nikon modelo eclipse 55i (Japón), con aumento de 400X (40X en el objetivo por 10X en el ocular). Las muestras del mosto se sometieron a diluciones seriales por duplicado hasta 10⁻². La concentración celular se calculó considerando que el peso de la célula de *B. thuringiensis* es de 2.3 pg (Rodríguez y de la Torre, 1996).

7.5.2 Cuantificación de glucosa

La cuantificación de la glucosa se calculó mediante la técnica de DNS para azúcares reductores (Miller, 1959). Para ello se centrifugaron 5 mL de mosto fermentado en tubos Corning a 10,000 rpm durante 20 min y 5°C en una termocentrífuga marca Thermo Scientific, USA. Luego se tomó 1 mL del sobrenadante que se diluyó 1/10 con agua destilada estéril y finalmente se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL. La lectura se realizó a 540 nm en un espectrofotómetro

UV-Vis modelo Lambda UV-125 marca Perkin Elmer y se utilizó glucosa como estándar.

7.5.3 Cuantificación de poli- β -hidroxibutirato (PHB)

La determinación de PHB (intracelular) se realizó mediante la técnica de Braunegg *et al.* (1978) en un cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer modelo 900. Las condiciones fueron las siguientes: Columna empacada AT-1000 al 10%, temperatura de columna de 160 °C, temperatura del inyector 240°C, temperatura del detector 280°C y nitrógeno como fase móvil con flujo de 30 mL/min.

Para la preparación de la muestra se centrifugaron 5 mL del mosto de fermentación a 1500 g durante 20 min a 5 °C en una centrifuga refrigerada (Eppendorf). Se desechó el sobrenadante y la pastilla o “pellet” se resuspendió en 1 mL de propanol acidificado (3% v/v H₂SO₄). Posteriormente se rompió la pared celular con 3 mL de cloroformo y se calentó a 100°C en un termobloque modelo HI 839800, marca HANNA INSTRUMENTS durante 4 h. Se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después, se adicionó 1 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente en vortex. Se separó la fase orgánica en viales de 1.5 mL de tapa con septo para cromatografía de gases y se conservó en congelación hasta su inyección en el cromatógrafo. Se realizaron tres replicas de cada muestra y se inyectaron por duplicado cada muestra en el cromatógrafo de gases.

El estándar se preparó con sal sódica de ácido DL- β -hidroxibutirico al 98% de pureza (29435-48, Sigma), con el mismo procedimiento que las muestras.

7.5.4 Detección de proteína Cry

La detección de proteína Cry1AC de 133.3 kDa, se realizó por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE). Se tomaron 10 mL del mosto del cultivo en matraz y 5 mL del fermentador, y se centrifugaron a 5500 rpm por 20 min, la pastilla se disolvió en 2 mL de agua destilada y estéril. Posteriormente se tomó 1 mL y se colocaron en tubos Eppendorf. Los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min y la pastilla se lavó 2 veces con solución isotónica (NaOH al 0.5 N), para reducir la actividad proteolítica, se lavó con agua acidificada con HCl (pH < 2.5) y por último con agua destilada estéril. La pastilla se resuspendió en 1 mL de agua destilada y estéril. Se tomaron 500 µL de la muestra diluída y se agregaron 500 µL de solución Laemmli (Laemmli, 1970) para su solubilización a ebullición por 5 min exactos. La proteína soluble se detectó con una cámara electroforesis Mini-PROTEAN 4 Cell, marca Biorad. El gel concentrador se preparó al 12% (pH 6.8) y el gel separador al 8% (pH 8.8). Se utilizó albumina de suero bovino (BSA) como estándar y el marcador de peso molecular page ruler prestained ladder marca Fermentas de 60 a 200 kDa teñido con azul de comassie al 0.1%.

7.6 Modelo de crecimiento

El modelo de Gompertz es un modelo no lineal que tiene la capacidad de representar curvas con fase lag no simétricas con respecto al punto de inflexión. La ecuación del modelo de Gompertz que se usó en este trabajo fue:

$$X = X_{max} e^{(-\lambda * e^{-\mu_{max} * t})} \quad \text{ec (1)}$$

Los parámetros cinéticos X_{\max} (células g/L), λ y μ_{\max} (h^{-1}) representan el máximo crecimiento, indirectamente la fase lag y la velocidad máxima específica de crecimiento, respectivamente (Navarro, 1999).

Los parámetros del modelo de Gompertz (Ec 1), μ_{\max} , X_{\max} y λ fueron evaluados usando un análisis numérico iterativo Runge Kutta de 4^{to} orden con el programa iterativo MicroMath Scientist para Windows (versión 1.05) MicroMath Inc., con los siguientes parámetros: objetivo de la suma de cuadrados 1 E-12, tamaño de paso mínimo 0.0001, tamaño de paso máximo 10. Se buscó minimizar la diferencia entre el número real de células en función del tiempo y los valores de número de células calculados con el modelo de Gompertz.

7.7 Caracterización molecular de los genes *nprR-nprX*, *nprA*, *cry* y *spo0A*

Los oligonucleótidos usados en este estudio se diseñaron usando el software bioinformático PrimerQuest tool de la empresa Integrated DNA Technologies USA. La secuencia de los genes *cry1AC*, *nprA* y *spo0A* se extrajeron del GenBank con número de acceso GU322939.1, L77763.1 y X80639.1 respectivamente.

Para la caracterización molecular, la cepa se inoculó en 250 mL de medio Gerry Rowe, (Rowe, 1990) y se incubó en una agitadora (Thermo Scientific, USA) a 30 °C y 200 rpm por 16 h. Se centrifugaron 5 mL del mosto fermentado a 10,000 rpm por 15 min a 4 °C y se extrajo el ADN genómico utilizando el kit comercial Ultra Clean microbial DNA isolation (MOBIO, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ADN extraído se cuantificó mediante un espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). Posteriormente, se amplificó el gen 16S DNA, el cassette *nprR-nprX*, *npRA*, *Cry1AC* y *spo0A* mediante la reacción en cadena de la polimerasa

(PCR, por sus siglas en inglés), se usaron 100 ng de ADN genómico, 10 pM de cada oligonucleótido (Tabla 5) en 50 µL de reacción del kit DreamTaq™ Green PCR Master Mix 2X (Fermentas). La PCR se realizó en el termociclador modelo MAXYGENE marca AXYGEN Scientific siguiendo las condiciones reacción: 1 ciclo 95 °C 5 min; 35 ciclos de 95 °C por 1 min, Ta de 56 °C por 1 min y 72 °C durante 1 min; finalmente 1 ciclo de 72 °C por 10 min. Los productos de PCR se sometieron a un análisis de electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X. Se usaron 10 µL de producto de PCR para cada una de las muestras. La electroforesis se realizó a 80 V por 40 min. Las amplificaciones se observaron en el sistema de fotodocumentación INGENIUS SYNGENNE®. El producto de PCR fue purificado por el kit GeneJET PCR Purification (K0701, Thermo Scientific,) y secuenciado en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, México. Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el programa bioinformático BLAST (National Center for Biotechnology Information, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) en la base de datos de NCBI para conocer su identidad.

Tabla 5. Oligonucleótidos usados para la amplificación de los genes *nprR-nprX*, *nprA*, *cry1Ac* y *16s*.

Iniciadores	Gen	Ta °C	Amplificación (pb)	Secuencia del iniciador (5'-3')	Referencia
16 S	16 S	55	1500	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGA TCCTGGCTCAG CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGA TCCAGCC	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
NprR-NprRB	<i>nprR-nprRB</i>	56.1	1500	GGGCATTTGTTCTGTCTC GCTAACACTAACGCTAAAC	Rocha <i>et al.</i> , 2012
LCry	<i>cry1Ac</i>	55	1700	ATCTTCACCTCAGCTGCT GGCACATTGTTGTTCTGTGG	Este estudio
NprA	<i>nprA</i>	56.1	566	ACAATGAGACGGTGCAGTCA TACCGCTGTCTGCCTCAATG	Este estudio
Spo0A	<i>Spo0A</i>	55	841	GGAATGTGTTGCGAAAGGGAA ATTCCCACGGCTCCAAGCTA	Este estudio

7.8 Análisis bioinformático del péptido señal

Después de la amplificación y secuenciación del gen *nprX* se hizo un análisis bioinformático en el software de SignalP 3 (Emanuelsson *et al.*, 2007) para predecir los sitios de corte y detectar al péptido señal/péptido no señal, con base en una combinación de varias redes neuronales artificiales y modelos ocultos de Markov.

La alineación de la región secretada se realizó mediante ClustalW con la ayuda del software BioEdit versión 7.2.5 (Hall, 1999). Para identificar el heptapéptido de señalización putativo, se usó la secuencia SKPDT que se reportó por Pothathil y Lazzizzera, (2003) y los criterios basados en la secuencia de aminoácidos de NprR de Perchat *et al.* (2011).

7.9 Cuantificación de los transcritos *nprR-nprX*, *spo0A*, *nprA* y *cry1AC* por PCR en tiempo real (qPCR)

7.9.1 Extracción de ARN

Se centrifugaron 3 mL del mosto de fermentación en tubos Corning a 9000 rpm por 15 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, y la pastilla se procesó con el kit de extracción de ARN ZR-Fungal/Bacterial RNA Microprep marca Zymo Research, USA, de acuerdo a las condiciones del fabricante (Anexo 1). El ARN extraído se cuantificó mediante espectrofotometría (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) y posteriormente se limpió mediante digestión con la enzima DNase 1, RNase-free con número de catálogo EN0521 marca Thermo Scientific, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Anexo 2).

Se determinó la calidad del ARN purificado, por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes con formaldehído en buffer MOPS 1X con un pH 7.0 (Anexo 3). Las muestras de ARN se prepararon mezclando 4 μL de buffer de carga ARN 2X (fermentas) y 4 μL de ARN, calentándolas a 70 °C por 10 min y se enfriaron en hielo por 5 min, el ARN se separó a 80 V por 40 min. Posteriormente el gel se visualizó en el sistema de fotodocumentación modelo INGENIUS marca SYNGENNE®.

7.9.2 Síntesis de ADNc y cuantificación de los transcritos *nprR-nprX*, *nprA* y *cry1AC*

La síntesis del ADN complementario (ADNc) se realizó mediante el kit comercial RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis con número de catálogo K1631 marca Thermo Scientific, de acuerdo a las condiciones del fabricante (Tabla 6). Para la síntesis se usaron primers de Random hexamers y se calentaron junto con la muestra de ARN a 65 °C por 5 min en un termociclador MAXYGENE (MAXYGEN Scientific®) y se enfriaron en hielo.

Al finalizar la síntesis del ADNc, se colocaron los tubos en hielo y se guardaron a -80 °C hasta su uso para PCR y qPCR; a la par se realizó una muestra de síntesis de ADNc sin la adición de la enzima transcriptasa reversa, la cual se usó como control negativo.

Al usar el kit de extracción de ARN, se obtuvieron 6 μL de muestra, con una concentración de ARN de 0.746 a 1.158 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ por cada muestra. Las muestras fueron homogenizadas a un volumen total de 12 μL en dH_2O con DEPC y una concentración final de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Para observar la calidad de las muestras se preparó un gel al 1% de agarosa en condiciones desnaturalizantes con formaldehído en

buffer MOPS (Figura 26). Cada carril en el gel corresponde a una muestra extraída del mosto de fermento cada dos horas. Una vez que se comprobó la calidad de los ARN, se procedió a la síntesis del ADN complementario (ADNc).

Tabla 6. Condiciones de síntesis de ADNc.

Reacción	Concentración final	Volumen μL
ARN total	3.5 μg	7 μL
Random primer	0.1 μM	1 μL
Agua libre de nucleasas*		4 μL
Buffer de reacción 5X	1X	4 μL
Inhibidor de RNase	1 $\text{u}/\mu\text{L}$	1 μL
Ribolock (20 $\text{u}/\mu\text{L}$)		
Mezcla de dNTP 10 mM	0.1 mM	2 μL
Transcriptasa reversa H minus (200 $\text{u}/\mu\text{L}$)	10 $\text{u}/\mu\text{L}$	1 μL

* Calentar la muestra a 65 °C por 5 min y colocar en hielo.

7.9.3 PCR cuantitativa

La cuantificación por PCR en tiempo real (qPCR), se realizó usando 1 μL de ADNc diluido en agua libre de nucleasas en relación 1:5, 3 μmol de cada oligonucleótido y 10 μL de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X. La qPCR se realizó en el termociclador modelo PIKOREAL 96 marca Thermo Scientific, con las siguientes condiciones de reacción: 1 ciclo 95 °C 10 min; 40 ciclos de 95 °C por 15 s, T_a °C por 30 s y 72 °C durante 30 s. Los oligos usados para la detección de los transcritos *cry1AC*, *nprR-nprX*, *nprA*, *spo0A* y *16S* se muestran en la Tabla 7.

Los oligos para qPCR *nprR-nprRB*, *nprA* y *spo0A* se diseñaron mediante el software bioinformático Oligo Analyzer 3.1 de Integrated DNA Technologies, USA, usando las secuencias amplificadas anteriormente por PCR en este trabajo.

Tabla 7. Oligonucleótidos usados para qPCR.

Gen que reconoce	Ta (°C)	Amplicón (pb)	Secuencia del iniciador (5´-3´)	Referencia
<i>nprA</i>	60	144	AGCATTAGTGTTAGCGACAGG ACTGCACCGTCTCATTGTAC	Este estudio
<i>cry1AC</i>	55	180	GTTAGATTAATAGTAGTGG TG TAGCTGGTACTGTATTG	Hernández <i>et al.</i> , 1997
16S rDNA	55/60	180	GGTCTTGCAGCTCTTTGTACCGT ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC	Yang <i>et al.</i> , 2012
<i>nprX-nprR</i>	60	140	ATGGTATTTGGAGTA TTGGCGT GCTAACACTAACGCTAAAC	Este estudio
<i>Spo0A</i>	60	110	GTGAGTGGTAAAGCAAACGC TCCTTTAATATGAGCGGGTACAC	Este estudio

La expresión relativa de todos los genes se obtuvo mediante el método comparativo C_T (Schmittgen y Livak, 2008), usando el 16S rRNA como gen constitutivo (Ec 2).

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = [(C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ control interno})_{\text{muestra A}} - (C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ control interno})_{\text{muestra B}}] \quad \text{ec. 2}$$

Se realizó la cinética de la cuantificación de la expresión relativa a lo largo de la fermentación por cada muestra. Los resultados de la expresión relativa de la muestra control (sin proteasa K) se normalizó a 1, es decir el valor máximo de cada gen se igualó a uno.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Identificación molecular de la cepa

Con el objetivo de conocer si la cepa de *B. thuringiensis* (ATCC 358666) presenta los genes 16S rDNA y NprR-NprX, requeridos para este trabajo, se amplificaron por PCR regiones de estos genes. En la figura 9 se muestra la integridad el ADN genómico de *B. thuringiensis*, teniendo una concentración de 39.7 ng μL^{-1} . Las bandas de ADN se muestran íntegras, por lo tanto se procedió a su uso para la amplificación de los genes 16S rDNA y NprR-NprX (Figura 10).

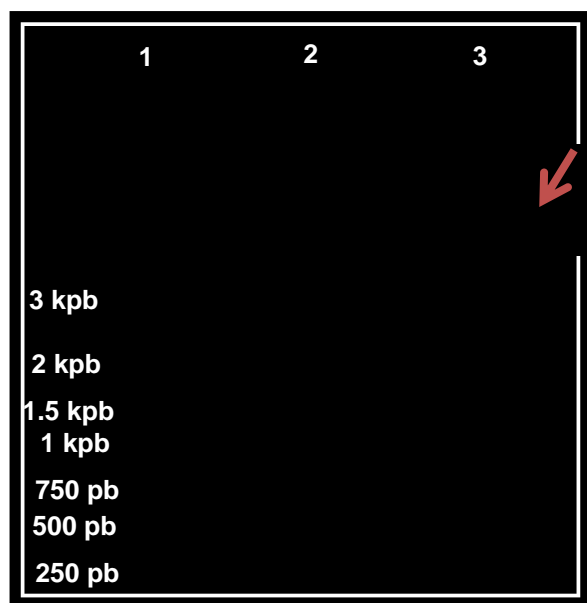


Figura 9. Observación de bandas de ADN genómico de *B. thuringiensis* en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. Carril 1; marcador de peso molecular, carril 2 y 3: bandas de ADN.

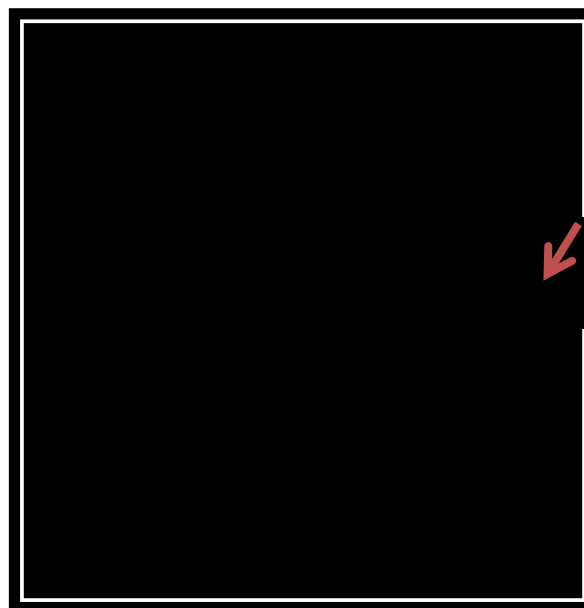


Figura 10. Observación de la amplificación de la región ARNr 16S y el cassette NprR-NprX en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, obteniéndose un producto de aproximadamente 1.5 kb. Carriles 1 y 2: producto de PCR de 16S. Carriles 3 y 4: producto de PCR de NprR-NprX.

Las secuencias del gen 16S ARNr ensambladas mediante el software BioEdit Sequence Alignment Edit mostraron una identidad de 100 % a *B. thuringiensis* ATCC 35866 que confirmó la identidad de la cepa usada.

La secuencia ensamblada del cassette NprR-NprX, mostró una identidad del 100% a las reportadas. Las distintas especies de *Bacillus* se han clasificado en siete grupos de acuerdo a la secuencia del gen NprX (SKPDIVG) (Perchat *et al.*, 2011) entre los cuales, la cepa de *B. thuringiensis var kurstaki* HD-73 pertenece al grupo 1 junto con *B. thuringiensis* 407, *B. thuringiensis* serovar *pondicheriensis* BGSC 4BA1, *B. thuringiensis* serovar *israelensis* ATCC 35646, y *B. thuringiensis* serovar *berliner* ATCC 10792. De acuerdo a lo reportado por Perchat *et al.*, 2011 el fragmento peptídico mínimo requerido para activar al factor transcripcional de *nprA* es de 7 aminoácidos.

Con los resultados de las secuenciaciones de los genes *16s ADNr* y *nprR-nrpX* se confirmó que la cepa es *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* HD-73. También se corroboró mediante un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS, que *B. thuringiensis var. kurstaki* HD-73 produce la proteína Cry y que es de 133 kDa aproximadamente (Figura 11), coincidiendo con lo reportado por Cerón *et al.*, (1994).

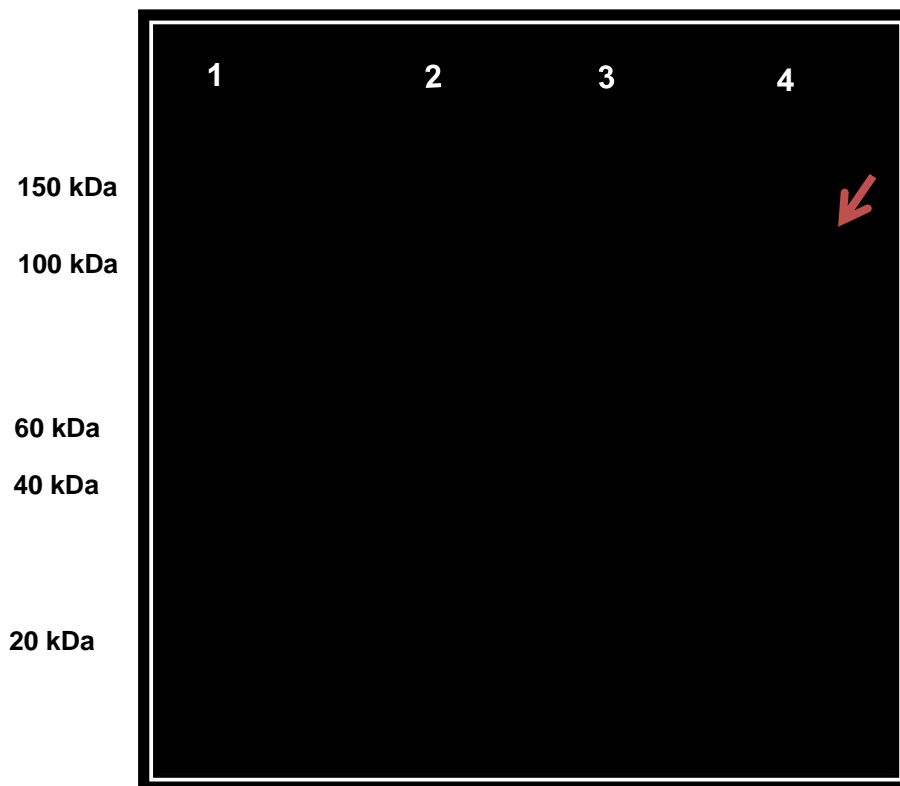


Figura 9. Gel electroforético del 8% (SDS-PAGE). Carril1: marcador de peso molecular; carril 2: BSA (60 kDa); 3 y 4: proteína Cry de *B. thuringiensis* (133 kDa). Tinción azul de Comassie.

8.2 Cultivo en Matraz

8.2.1 Modelo de estudio y cálculo del tiempo crítico (t_c)

La Figura 12 se muestra el promedio de los resultados de la cuantificación de células y esporas de tres cinéticas de *B. thuringiensis*. No se observó una diferencia estadísticamente significativa entre cinéticas en cuanto a cantidad de bacilos y esporas con $\alpha=0.05$ y $n= 3$.

Estos resultados permitieron estandarizar y obtener fermentaciones estadísticamente iguales, que aseguraron la reproducibilidad de futuras fermentaciones y métodos de cuantificación.

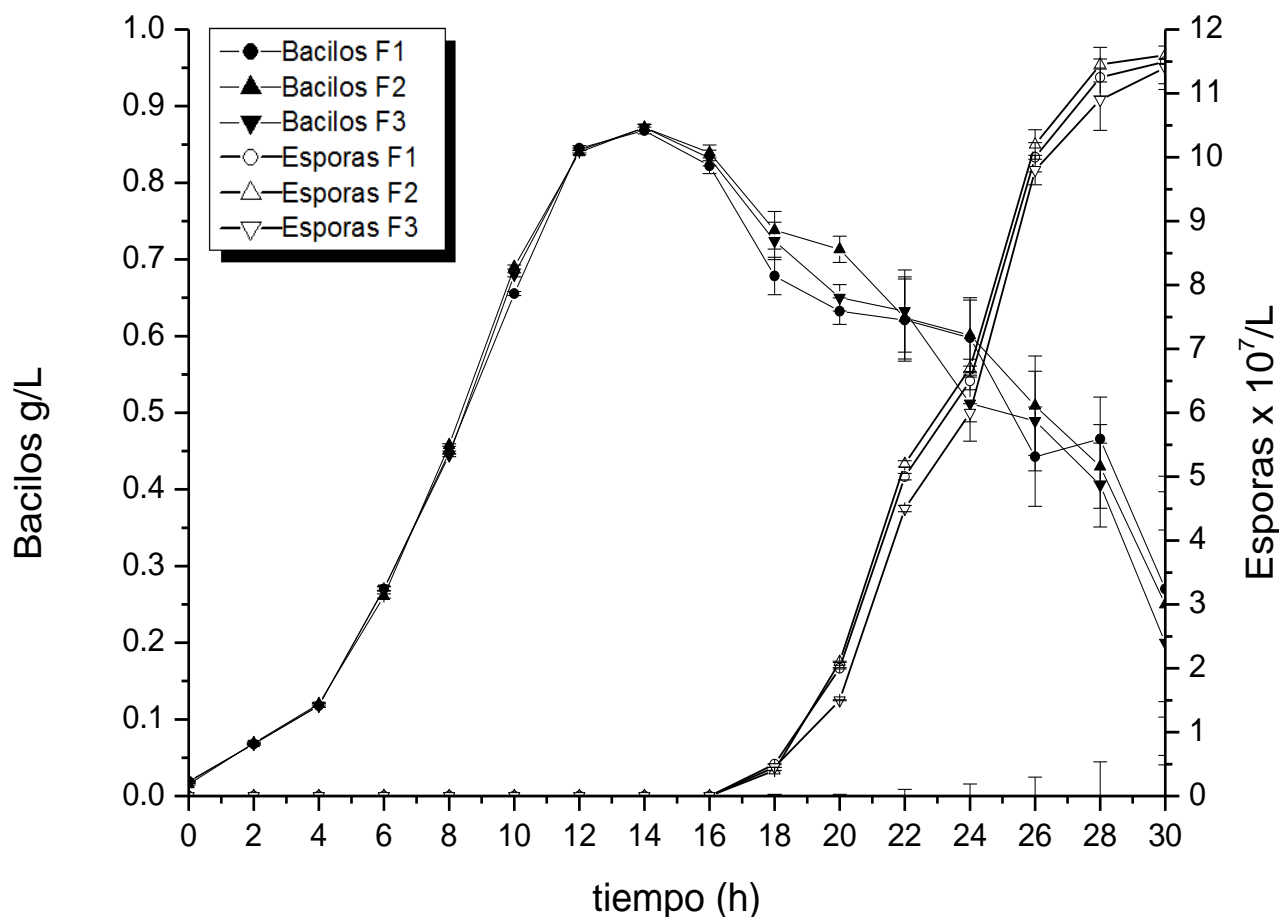


Figura 10. Cinéticas de crecimiento y de esporas de *B. thuringiensis* en matraz. F1; fermentación del matraz 1, F2; fermentación del matraz 2 y F3; fermentación del matraz 3. Los datos son expresados como el promedio de las observaciones \pm su desviación estándar.

En la Figura 13 se muestran los resultados de la simulación de la cinética de crecimiento de *B. thuringiensis* con el modelo de Gompertz. La duración de la fase Lag (λ) es de 9.1114 h y la velocidad específica máxima de crecimiento μ_{max} es de 0.2708 h^{-1} , por lo tanto el tiempo crítico (t_c) en condiciones de fermentación en matraz es a las 8.2 ± 0.4 horas de acuerdo al siguiente cálculo:

$$t_c = \frac{\ln \lambda}{\mu_{max}} = \frac{\ln 9.1114}{0.2708} = 8.2 \text{ Horas}$$

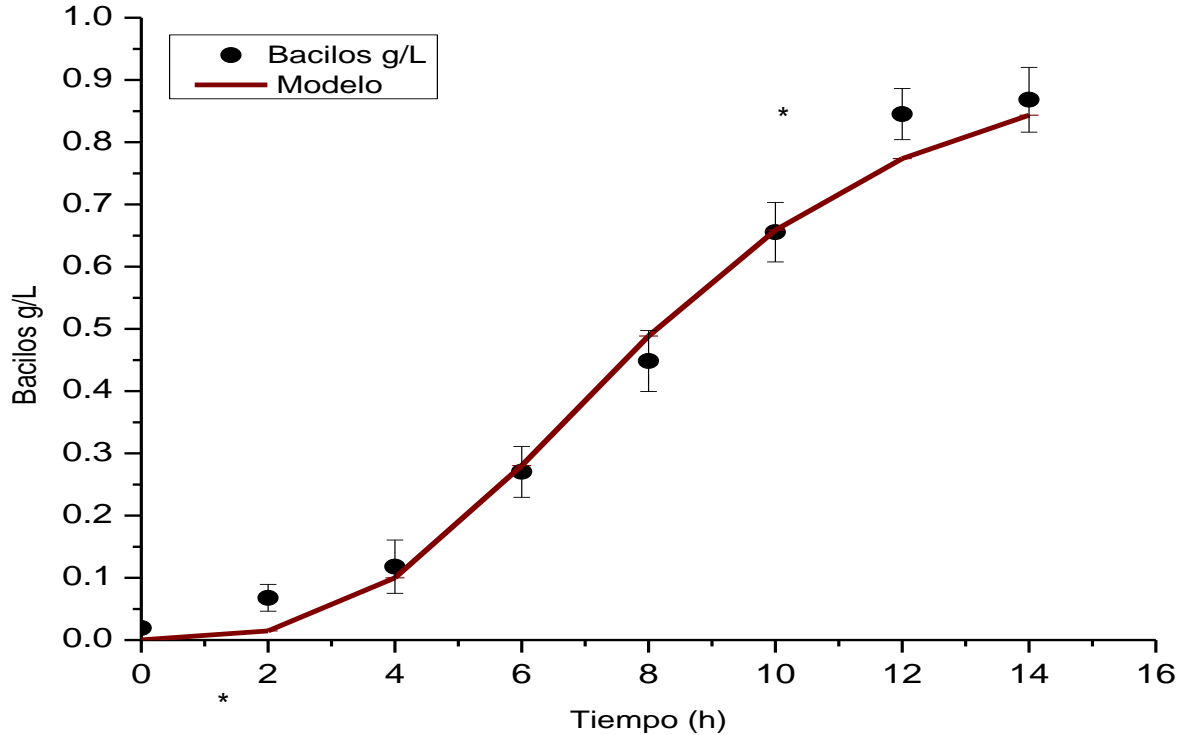


Figura 11. Simulación de la cinética de crecimiento y modelo de Gompertz de *B. thuringiensis*. Los datos son expresados como el promedio de las observaciones \pm su desviación estándar. Los puntos representan las observaciones experimentales y la línea continua al modelo. * indican diferencia significativa mediante análisis de Variación con $\alpha=0.05$ y $n= 3$.

El tiempo crítico de 8.2 ± 0.4 h demostró el momento en el cual *B. thuringiensis* desacelera el crecimiento celular y está entrando a la etapa de transición, que es donde sucede de acuerdo a Yang *et al.* (2012), la mayor actividad transcripcional para posteriormente iniciar la esporulación.

8.2.2 Efecto de la adición de proteasa K

Con la finalidad de inhibir a la proteasa neutral A y otros señalizadores de naturaleza protéica como el péptido NprX, se agregó proteasa K (PK) en diferentes tiempos durante la fase de transición.

En la Tabla 8 se resumen los valores máximos de crecimiento del bacilo y de producción de esporas. Se puede observar que la cantidad de biomasa fue mayor en todos los tratamientos con la PK en comparación al cultivo control, siendo el tratamiento con PK, a las 8 h, el que presenta mayor producción de biomasa. La Figura 14 muestra el efecto de la adición de PK en los cultivos de *B. thuringiensis* con adición de PK a diferentes tiempos y sus controles. En todos los tratamientos con PK hay un retraso en la aparición de esporas de hasta 4 h, y la fase de crecimiento se prolongó hasta por más de 4 h. Se observa que para el tratamiento con PK a las 8 y 10 h del cultivo (Figura 14), la fase exponencial se prolonga más de dos horas. Mientras que para el tratamiento con proteasa K a las 8, 10 y 12 h de la fermentación, la fase exponencial se alarga más de 4 horas comparado con el matraz usado como control. Para el mismo tratamiento la aparición de las esporas se atrasó más de 6 horas (Tabla 8), lo que sugiere que la PK está inhibiendo o retrasando alguna posible señal de *quórum sensing*. La inhibición de la señal de *quórum*, se puede deber a la proteólisis extracelular del péptido de señalización NprX y/o a la proteólisis de la proteasa neutral A. Tan y Donovan, (2000) reportaron que la proteasa neutral A se produce en altas concentraciones por densidad celular y entra a otra bacteria a través de receptores de histidina quinasa, activando a los factores de esporulación Spo0A, a través de factores transcripcionales sigma (σ). Probablemente la hidrólisis de esta proteasa afecte en el retardo de aparición de esporas que se observó en los tratamientos con PK a 8-10 h y PK a 8-10-12 h y por ende se ve reflejado en la producción mayor de células.

Tabla 8. Parámetros cinéticos de *B. thuringiensis* con proteasa K.

Tratamientos	Crecimiento máximo de esporas [Exp07/mL]	Crecimiento máximo de Bacilos [g/L]	Tiempo de máximo crecimiento de Bacilos (h)	Tiempo de aparición de Esporas (h)
Control	11.75 ± 0.024 ^a	0.868 ± 0.008 ^a	14 ± 1 ^a	16 ± 0 ^a
PK a 8 h	11.5 ± 0.032 ^a	1.144 ± 0.008 ^b	16 ± 1 ^b	18 ± 1 ^b
PK a 8 y 10 h	12.5 ± 0.065 ^b	1.098 ± 0.057 ^b	14 ± 1 ^a	18 ± 1 ^b
PK a 10 h	11.5 ± 0.01 ^a	0.995 ± 0.073 ^b	16 ± 1 ^b	18 ± 1 ^b
PK a 8, 10 y 12 h	10.75 ± 0.008 ^c	1.087 ± 0.024 ^b	18 ± 2 ^{b,c}	20 ± 2 ^{b,c}

*letras a, b y c indican diferencia significativa mediante análisis de Variación con $\alpha=0.05$ y $n= 3$. Los datos son expresados como el promedio de las observaciones \pm su desviación estándar.

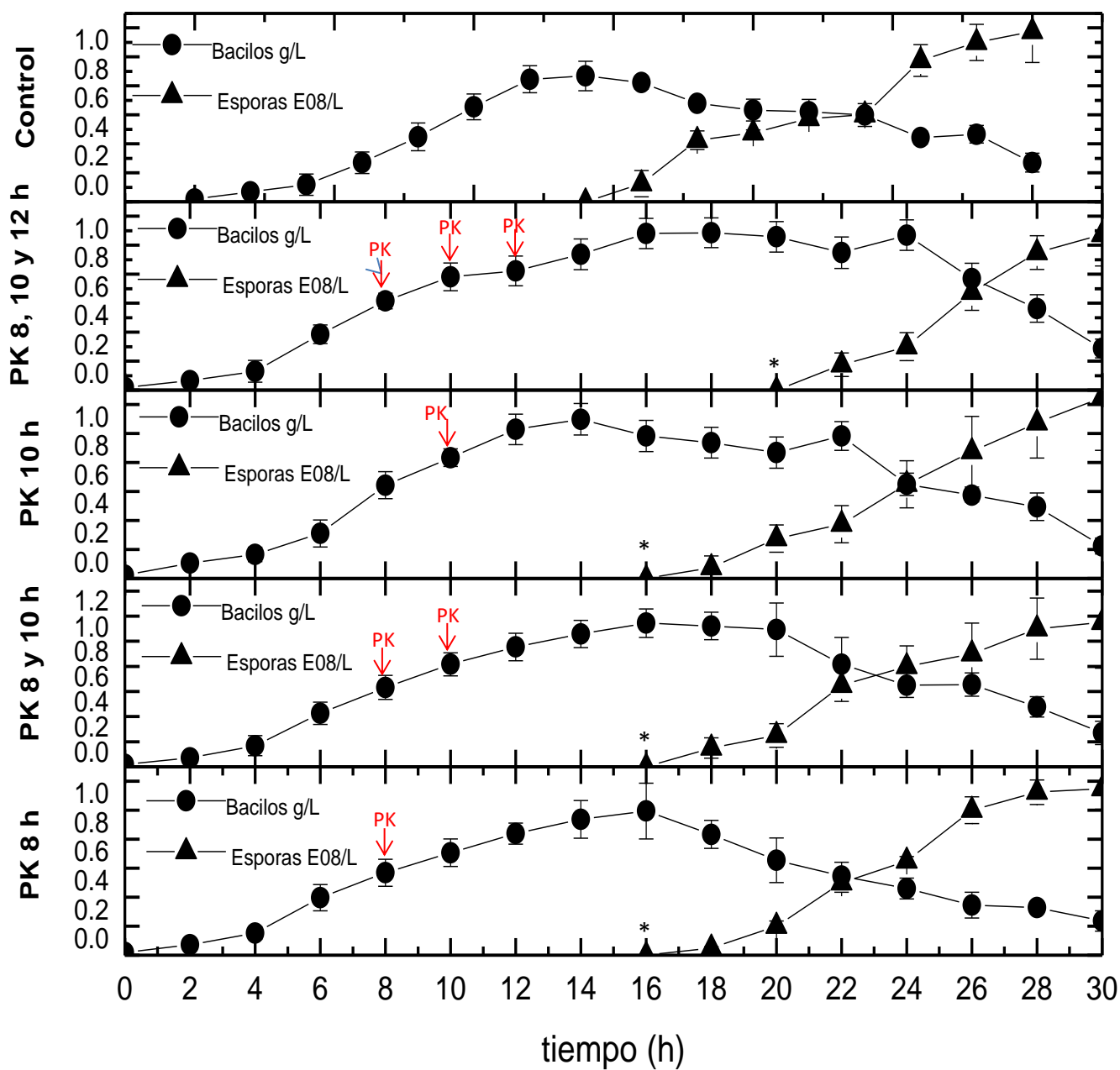


Figura 12. Cinética de crecimiento en matraz de *B. thuringiensis* con proteasa K a diferentes tiempos de la fermentación. Las flechas rojas indican el momento donde se adicionó PK. Los asteriscos (*) indican diferencia significativa en el tiempo de la aparición de esporas mediante análisis de Varianza con $\alpha=0.05$ y $n= 3$. Los datos son expresados como el promedio de las observaciones \pm su desviación estándar.

La Figura 15 muestra la cinética de consumo de glucosa como fuente de carbono para los diferentes tratamientos. En la tabla 9 se muestran las velocidades específicas de consumo de glucosa de las fermentaciones en matraz. Se observó

que la velocidad específica de consumo de glucosa en el matraz control fue de 0.38 ± 0.05 $\text{gs/g}_{\text{DWC}} \text{ h}$. El consumo de glucosa del matraz control fué significativamente más lento en comparación con los tratamientos donde se adicionó PK. Esto se pudo deber a la prolongación de la fase de crecimiento exponencial que provoca la adición de PK, teniendo un efecto significativo en el aumento de la cantidad de bacilos, y por consiguiente es más rápido el consumo de glucosa.

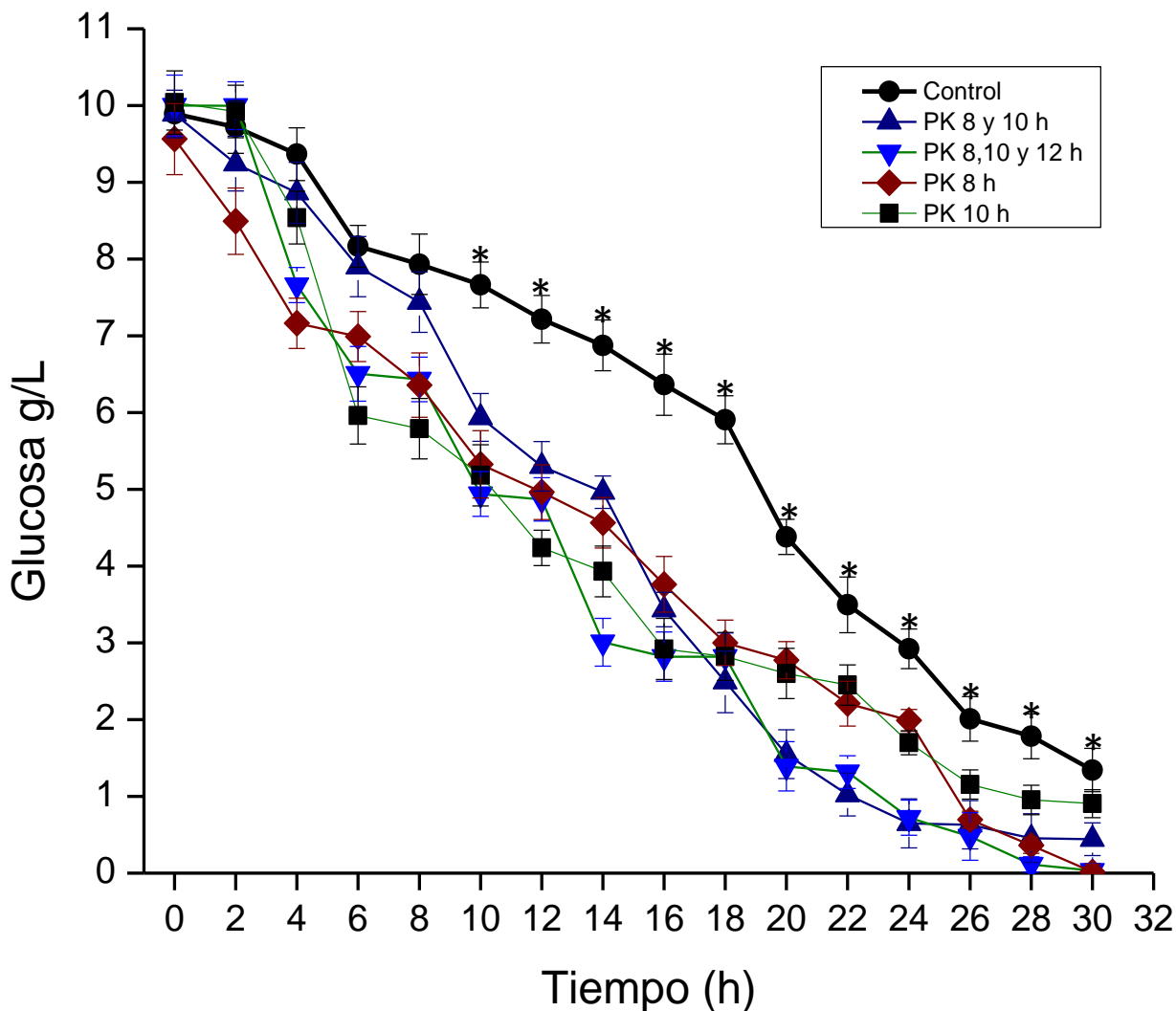


Figura 13. Cinéticas de consumo de glucosa realizadas en matraz con tratamientos donde se adicionó PK. Los asteriscos (*) indican diferencia significativa en la concentración de glucosa mediante análisis de Varianza con $\alpha=0.05$ y $n= 3$. Los datos son expresados como el promedio de las observaciones \pm su desviación estándar.

Tabla 9. Velocidad específica de consumo de glucosa de *B. thuringiensis* en matraz adicionando PK a diferentes tiempos.

Tratamientos	Glucosa inicial (g/L)	Glucosa residual (g/L)	Velocidad específica de consumo de glucosa (g _s /g _{DWC} h)
Control	9.90 ± 0.4 ^a	1.35 ± 0.3 ^a	0.38 ± 0.05 ^a
PK a 8, 10 y 12 h	10 ± 0.3 ^a	0.03 ± 0.3 ^b	0.50 ± 0.02 ^b
PK a 8 y 10 h	9.89 ± 0.5 ^a	0.44 ± 0.2 ^b	0.50 ± 0.03 ^b
PK a 10 h	10.04 ± 0.3 ^a	0.90 ± 0.5 ^a	0.50 ± 0.02 ^b
PK a 8 h	9.56 ± 0.6 ^a	0.016 ± 0.4 ^b	0.49 ± 0.04 ^b

*letras diferentes indican diferencia significativa mediante análisis de Variación con $\alpha=0.05$ y $n= 3$. Los datos son expresados como el promedio de las observaciones \pm su desviación estándar.

8.2.3 Detección de proteína Cry

La Figura 16 muestra los resultados de la producción de proteína Cry de los diferentes tratamientos con PK y sin adicionarla. El carril 9 y 10 del gel de electroforesis muestran las bandas de proteína Cry1AC producida por *B. thuringiensis* con un peso molecular de 133 kDa a las 48 h de cultivo. En los tratamientos donde se adicionó proteasa K (carril 3-8), no se pudo detectar proteína Cry después de las 48 horas de iniciado el cultivo. Poncet *et al.* (1997), reportan que la formación de la espora y la proteína Cry son paralelas en la fase de esporulación, pero son reguladas en forma diferente. Los resultados indican que la adición de PK podría inhibir alguna señal de naturaleza protéica de densidad celular necesaria para la producción de proteína Cry, o esté degradando directamente el cristal sin permitir observarlo en geles de electroforesis.

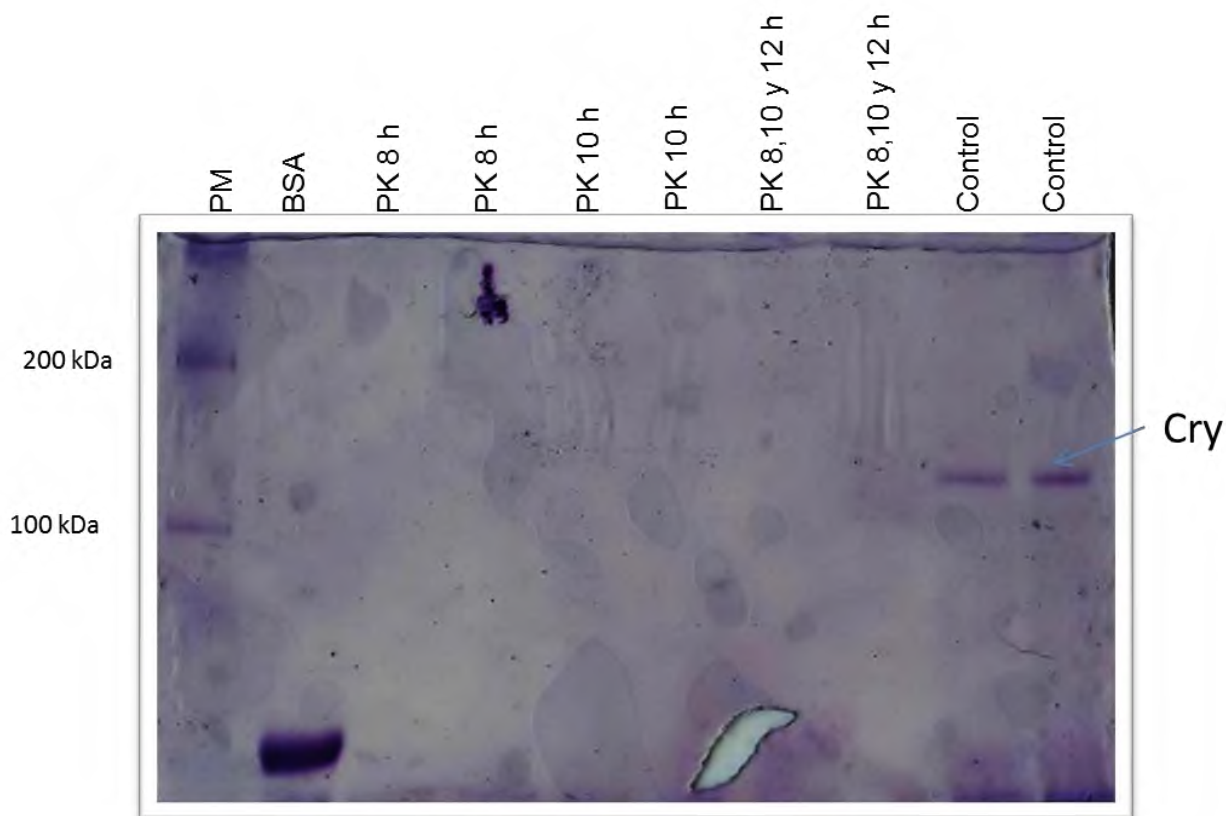


Figura 14. Gel electroforético del 8% (SDS-PAGE), donde se observa el efecto de la adición de PK en diferentes tiempos de la cinética de *B. thuringiensis* var. HD-73. Carril1: marcador de peso molecular; carril 2: BSA (60 kDa); 3 y 4: adición de PK a las 8 h; 5 y 6: PK a a las 10 h; 7 y 8: PK a las 8, 10 y 12 h de la fermentación; 9 y 10: control con proteína Cry de *B. thuringiensis* (133 kDa). Tinción azul de Coomassie.

Las señales por densidad celular regulan todo el proceso de esporulación, sin embargo, en la bibliografía actual no está reportado que en *B. thuringiensis* controlen únicamente la producción de proteína Cry. Lazazzera y Patathil, (2000) reportaron en *B. subtilis* que los péptidos de señalización CSF, PhrA y PhrE, estimulan la esporulación al inhibir a las fosfatasa RapA, RapB y RapE, respectivamente. Al inhibir las fosfatasa, Spo0F se fosforila por una cinasa, para posteriormente donar un fosfato a Spo0A a través de la fosfotransferasa Spo0B y tener la forma activa del factor de esporulación Spo0F~P. Por otro lado Poncet *et al.* (1997) reportaron que muchos genes *cry* están bajo el control de factores sigma específicos de esporulación como Factor δ^A (Spo0A) y Factor δ^F (Spo0F), y que Spo0A~P en altas concentraciones reprime la transcripción de genes *cry* en *Bacillus thuringiensis*.

Probablemente los factores de esporulación Factor δ^A (Spo0A) y Factor δ^F (Spo0F), se inhiban temporalmente en la fase de esporulación.

8.3 Cultivo en fermentador

La Figura 17 muestra la simulación de la cinética de crecimiento de *B. thuringiensis* en fermentador. Los parámetros cinéticos λ y μ_{max} son de 5.4 h^{-1} y 0.41 h^{-1} respectivamente, por lo tanto el tiempo crítico (t_c) calculado con el modelo de Gompertz para el cultivo control en fermentador a las 4.11 h. Mediante un análisis de varianza con $\alpha=0.05$ y $n=3$, se compararon las velocidades específicas de crecimiento μ_{max} y los resultados obtenidos en matraz y fermentador son de 0.27 ± 0.04 y $0.41 \pm 0.1 \text{ h}^{-1}$ respectivamente, lo que indica que estadísticamente es más rápido el crecimiento en fermentador que en el matraz. Se ha reportado a la velocidad máxima específica de crecimiento (μ_{max}) como uno de los parámetros que afecta la producción de proteína Cry (de la Torre y Ferrera, 1997).

De la Torre y Ferrera, argumentan que altas velocidades de duplicación de las células vegetativas es contraproducente debido a que disminuye la producción de Cry, posiblemente porque acentúa la pérdida de plásmidos. De manera alterna puede ser que altas velocidades de duplicación se llegue a una condición fisiológica de la célula en que el esfuerzo metabólico se centra en la reproducción y no en la acumulación de materiales de reserva, especialmente PHB, que aparentemente son la fuente de energía para la esporulación y síntesis de Cry (de la Torre and Ferrera, 1997). Navarro, (1999) concluyó que la velocidad máxima específica de crecimiento no afecta proporcionalmente la cantidad de proteína Cry formada por *B. thuringiensis*, al no encontrar una tendencia definida entre ambas variables, aún restringiéndose a una relación Carbono:Nitrógeno de 7:1. Aunque observó que los valores altos de μ_{max} parecían implicar una baja producción de proteína Cry.

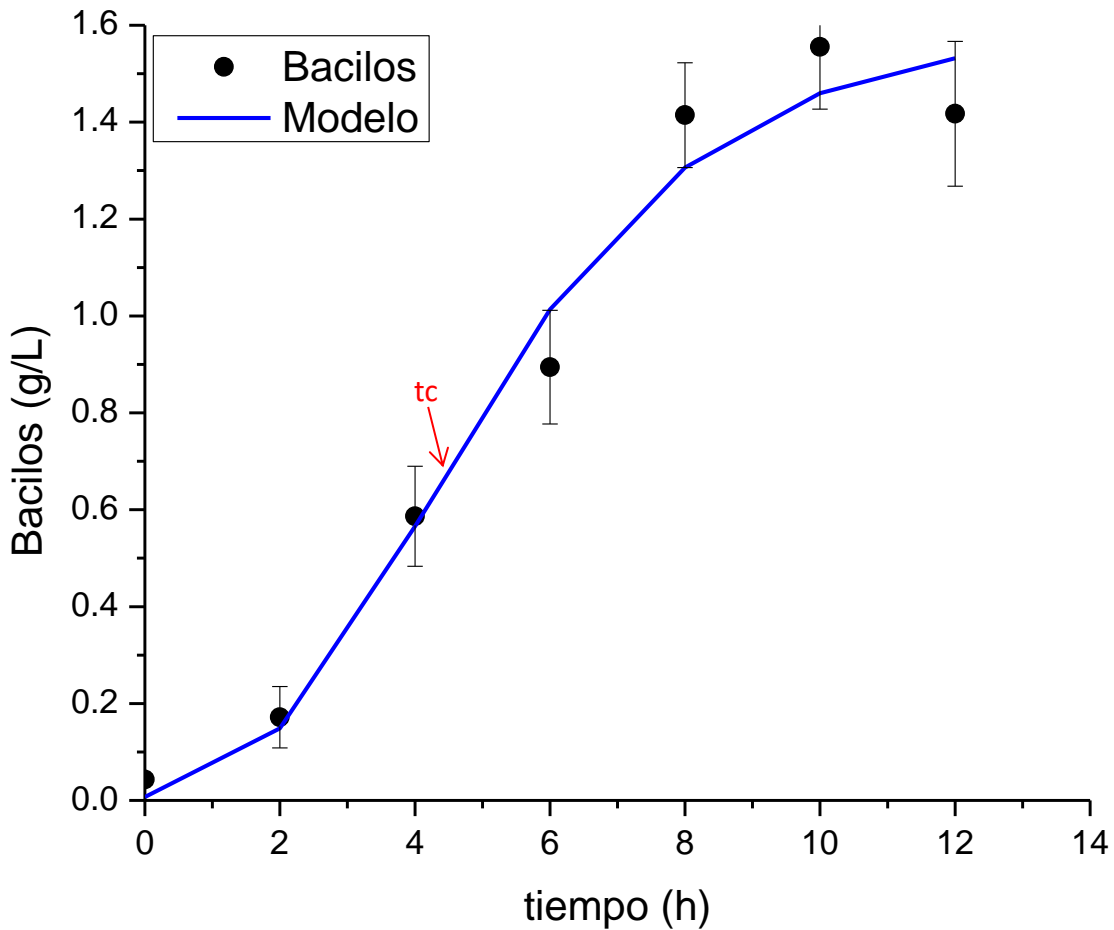


Figura 15. Simulación de la cinética de crecimiento de *B. thuringiensis* en fermentador usando el modelo de Gompertz. Los datos son expresados como el promedio de las observaciones \pm su desviación estándar. La flecha roja indica el tiempo crítico de crecimiento.

En la Figura 18 se observa la cinética de crecimiento y de formación de esporas de la fermentación control. La cinética de crecimiento muestra el comportamiento típico, con una fase lag de 2 h, de crecimiento exponencial de las 2 a las 8 h, de transición de las 8 a las 10 h y de esporulación de las 12 a las 24 h. La máxima concentración de bacilos se alcanza a las 10 h, y 4 h después se detectan las primeras esporas.

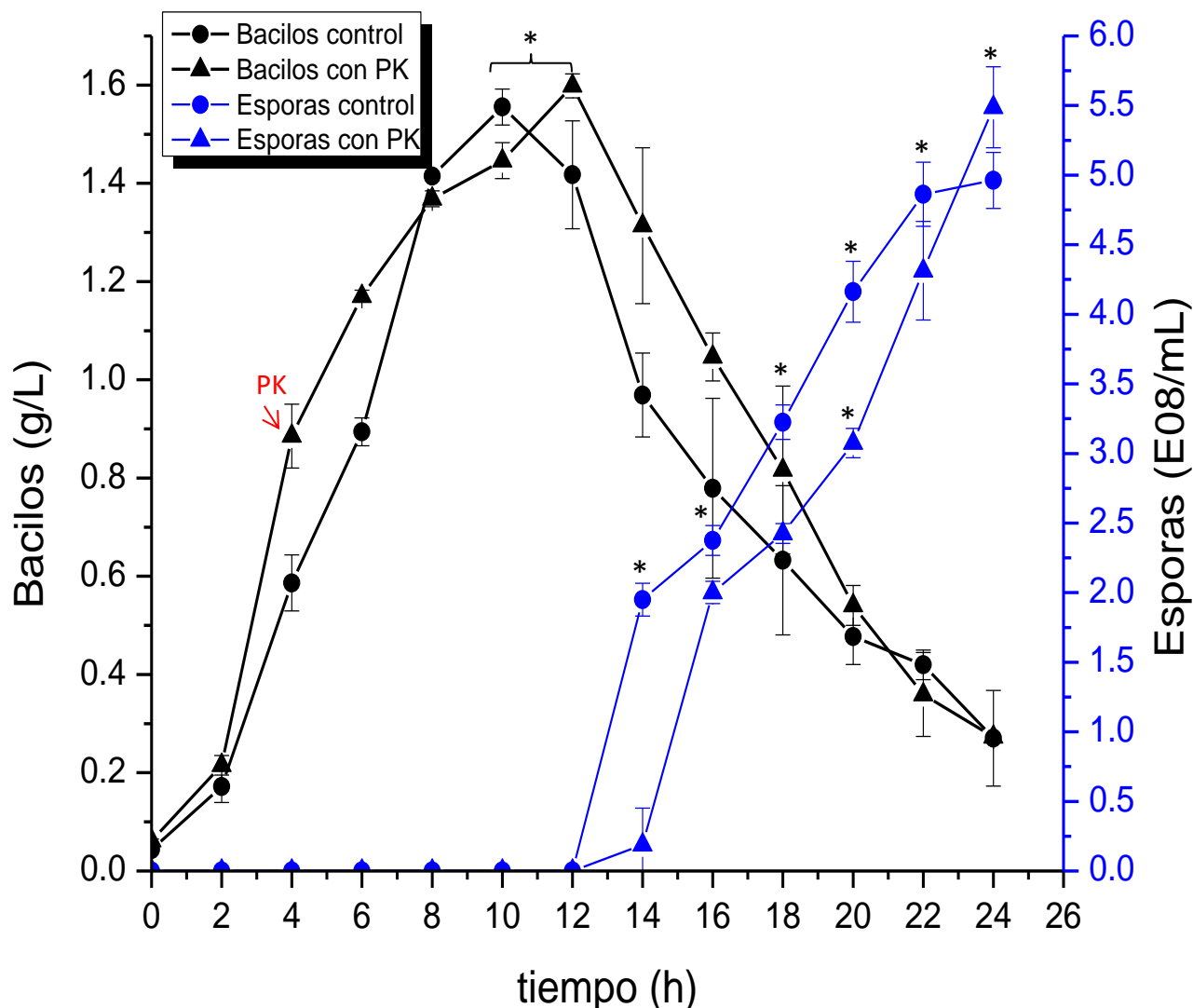


Figura 16. Cinética de crecimiento de *B. thuringiensis* en fermentador (●) control (▲) adicionando proteasa K en el tiempo crítico. La flecha roja indica el momento donde se adicionó PK. Los asteriscos (*) indican diferencia significativa en la concentración de glucosa mediante análisis de Varianza con $\alpha=0.05$ y $n=3$. Las barras indican desviación estándar. Los datos son expresados como el promedio de las observaciones \pm su desviación estándar.

La Figura 19 muestra el consumo de glucosa y la producción de PHB para el cultivo control en fermentador, teniendo una producción máxima de PHB de 1.53 ± 0.21 mg/L. En general el PHB se detectó 4 horas después del inicio de la fermentación, durante la fase de crecimiento exponencial, llega a un máximo en la

fase de transición (10 h) y posteriormente disminuye. Se observa que el punto máximo de PHB acumulado ocurre 4 h antes del tiempo en el que se detectan las primeras esporas, consumiéndose durante la fase de esporulación. Este comportamiento coincide con lo reportado previamente (Kominek and Halvorson, 1965; Slepecky y Law, 1961; Navarro *et al.*, 2006). Kominek y Halvorson, (1965), observaron en *B. cereus* que el máximo de PHB se alcanzó al aparecer las primeras esporas y posteriormente la cantidad de PHB disminuyó al aumentar la concentración de esporas en el medio. Este comportamiento también lo reportaron Slepecky y Law, (1961) para *B. megaterium*.

Pal *et al.* (2009), observaron en *B. thuringiensis* IAM 12077 un incremento en la acumulación de PHB de 43.37% (1.2 g/L) respecto a la cantidad máxima de células (2.8 g/L), con un tiempo de acumulación máximo de 24 h en un medio deficiente en nitrógeno. Mientras que para *B. thuringiensis* HD-73 tuvo un comportamiento muy diferente en el tiempo de máximo de acumulación de PHB, el cual fue a las 12 h. Sin embargo, la cantidad acumulada de PHB fue de 1.2 ± 0.4 g/L muy similar a lo reportado por los autores en *B. thuringiensis* IAM 12077.

La formación de proteína Cry1AC de 133 kDa comienza a ser visible en SDS-PAGE, a partir de las 18 horas del cultivo control en fermentador, es decir cuando hay más del 50% de esporulación. La máxima concentración de PHB acumulado fue de 1.54 mg/mL (Figura 20). Este valor coincide a lo reportado por Navarro *et al.*, (2006), donde se concluye que es necesario una acumulación mínima de 0.56 mg/mL de PHB para la formación de proteína Cry. Sin embargo, existe diferencia entre la máxima concentración de PHB acumulado y la reportada previamente. Esta diferencia se puede deber al tipo de medio de cultivo, Navarro *et al.* (2006), utilizaron un medio enriquecido de nutrientes (medio a base de glucosa, harina de soya, extracto de levadura, sólidos de cocimiento de maíz y sales minerales), mientras en este trabajo se utilizó un medio más definido (medio de Gerry Rowe; Rowe, 1990).

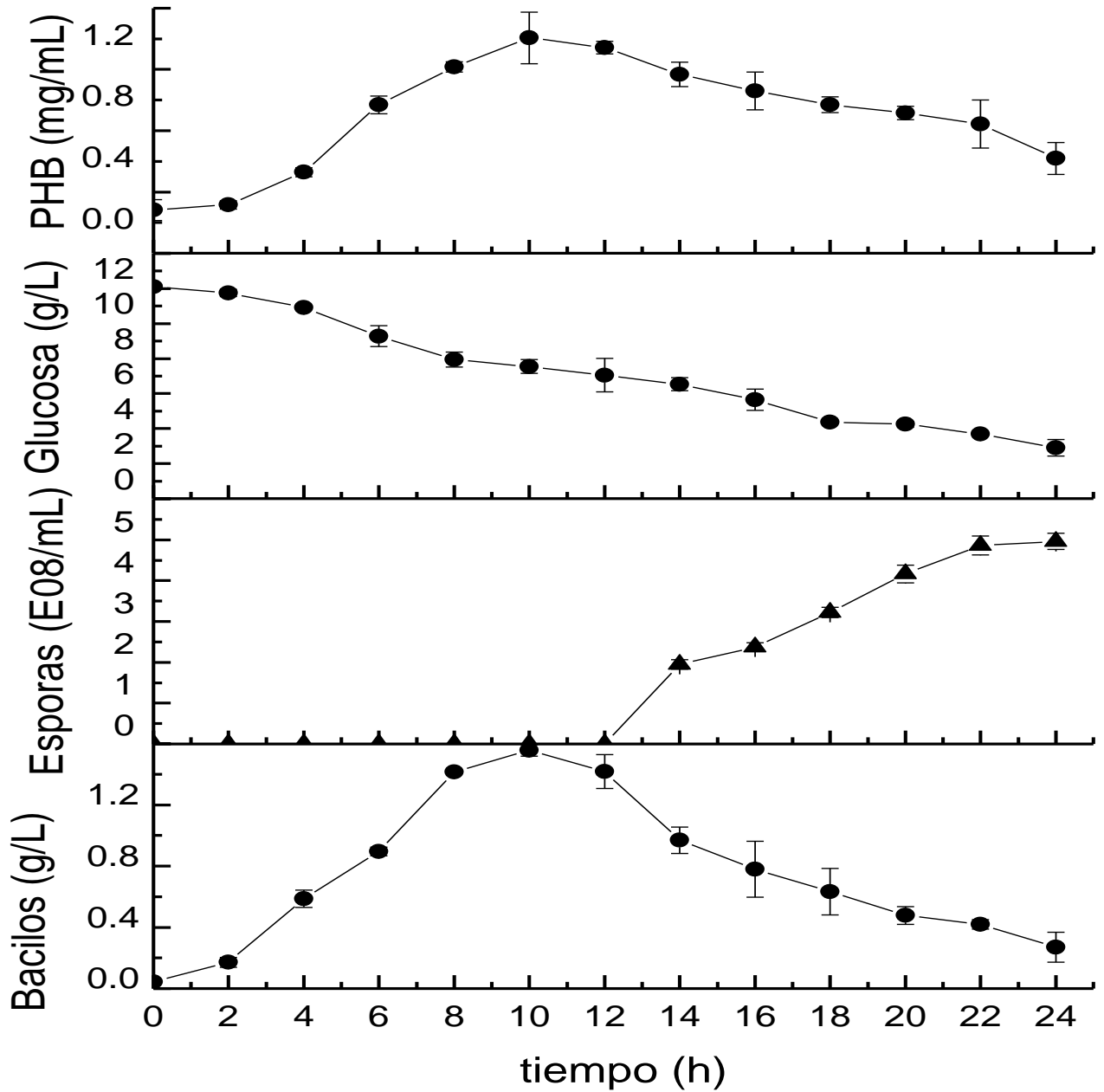


Figura 17. Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y formación de PHB de *B. thuringiensis* HD-73 en condiciones normales en fermentador. Los datos son expresados como el promedio de las observaciones \pm su desviación estándar con $n=3$.

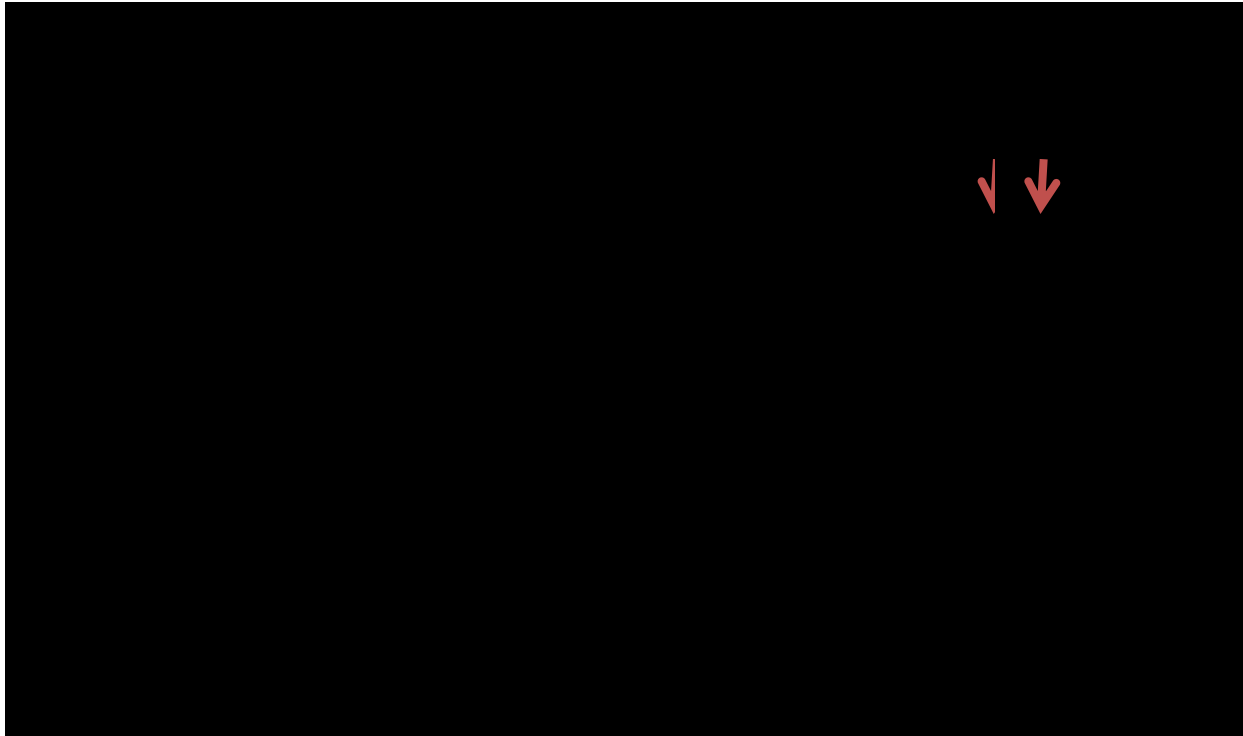


Figura 18. Gel electroforético del 8% (SDS-PAGE), donde se observa la proteína Cry en diferentes tiempos de la cinética de *B. thuringiensis* var. HD-73 en fermentador). En la parte superior se indican las horas en las cuales se midió la proteína Cry de 133.3 kDa. Tinción azul de Comassie.

8.3.1 Fermentaciones adicionando proteasa K

La Figura 21 muestra el consumo de glucosa y la producción de PHB para el cultivo control en fermentador adicionando PK en el tiempo crítico (4 h), teniendo una producción máxima de PHB de 1.39 ± 0.12 mg/mL. En general el PHB se detecta horas después del inicio de la fermentación, durante la fase de crecimiento exponencial (4 h), llega a un máximo en la fase de transición (10 h) y se mantiene casi constante hasta las 24 h. Se observa que el punto máximo de PHB acumulado ocurre 4 horas antes del tiempo en el que se detectan las primeras esporas, sin disminuir durante la fase de esporulación.

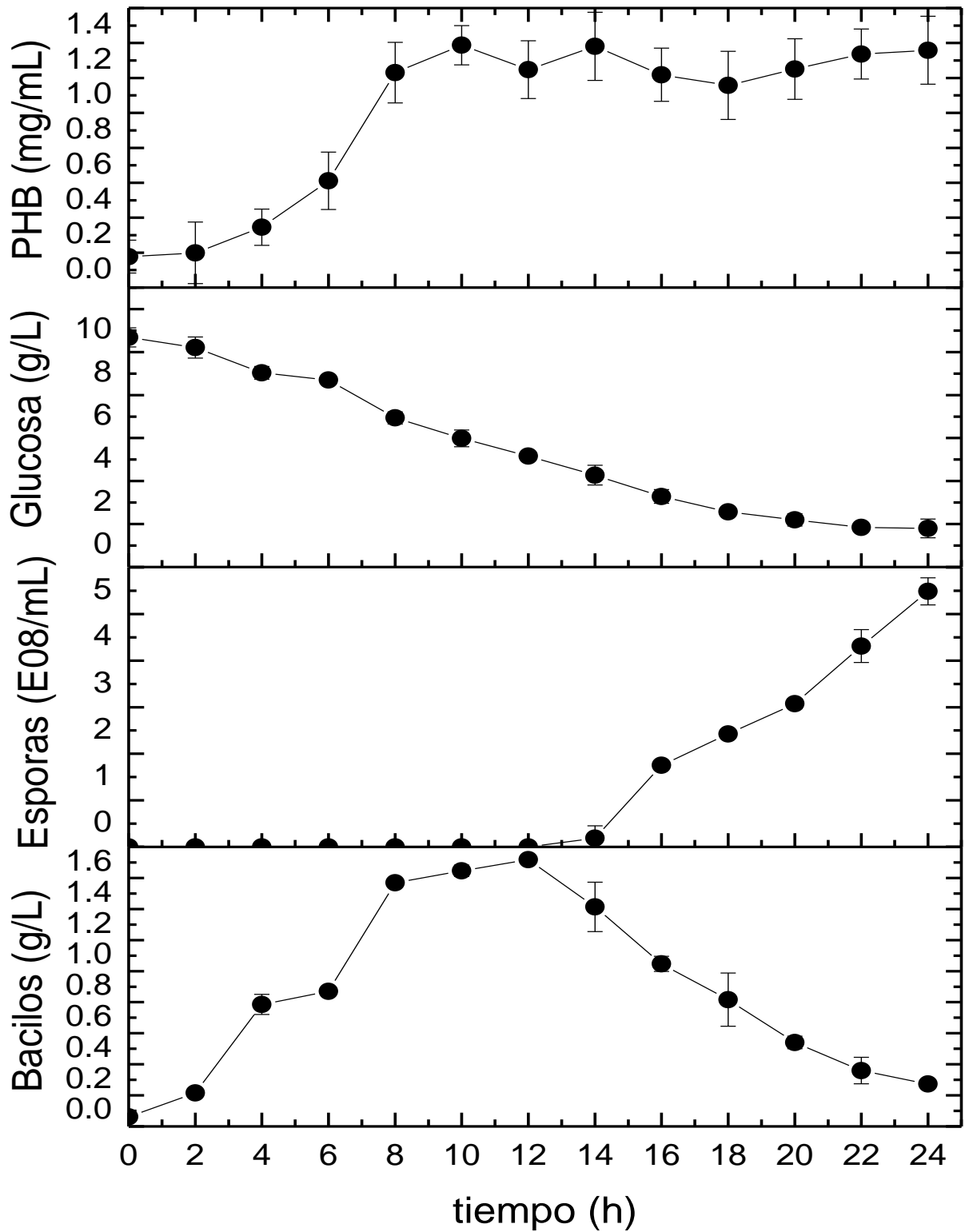


Figura 19. Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y formación de PHB de *B. thuringiensis* HD-73 adicionando PK en fermentador. Los datos son expresados como el promedio de las observaciones \pm su desviación estándar con $n=3$.

La Figura 21 muestra la cinética de crecimiento y de formación de esporas de la fermentación adicionando PK. En la cinética de crecimiento se observa un comportamiento típico, una fase lag de 2 h, la fase de crecimiento exponencial de las 2 a las 8 h, la fase de transición de las 8 a las 12 h y la fase de esporulación de las 14 a las 24 h. La máxima concentración de bacilos se alcanza a las 12 h de la fermentación y después de 4 h se detectan las primeras esporas.

En la figura 22 se muestra la comparación de las cinéticas obtenidas con y sin adición de PK. Se observa que al adicionar proteasa K a las 4 horas de la fermentación, la aparición de esporas se retrasaron por 3 ± 1 h, al igual que se muestra que el crecimiento máximo de células vegetativas se desfasó significativamente. El mismo comportamiento se observó en los cultivos realizados en matraz (Figura 21).

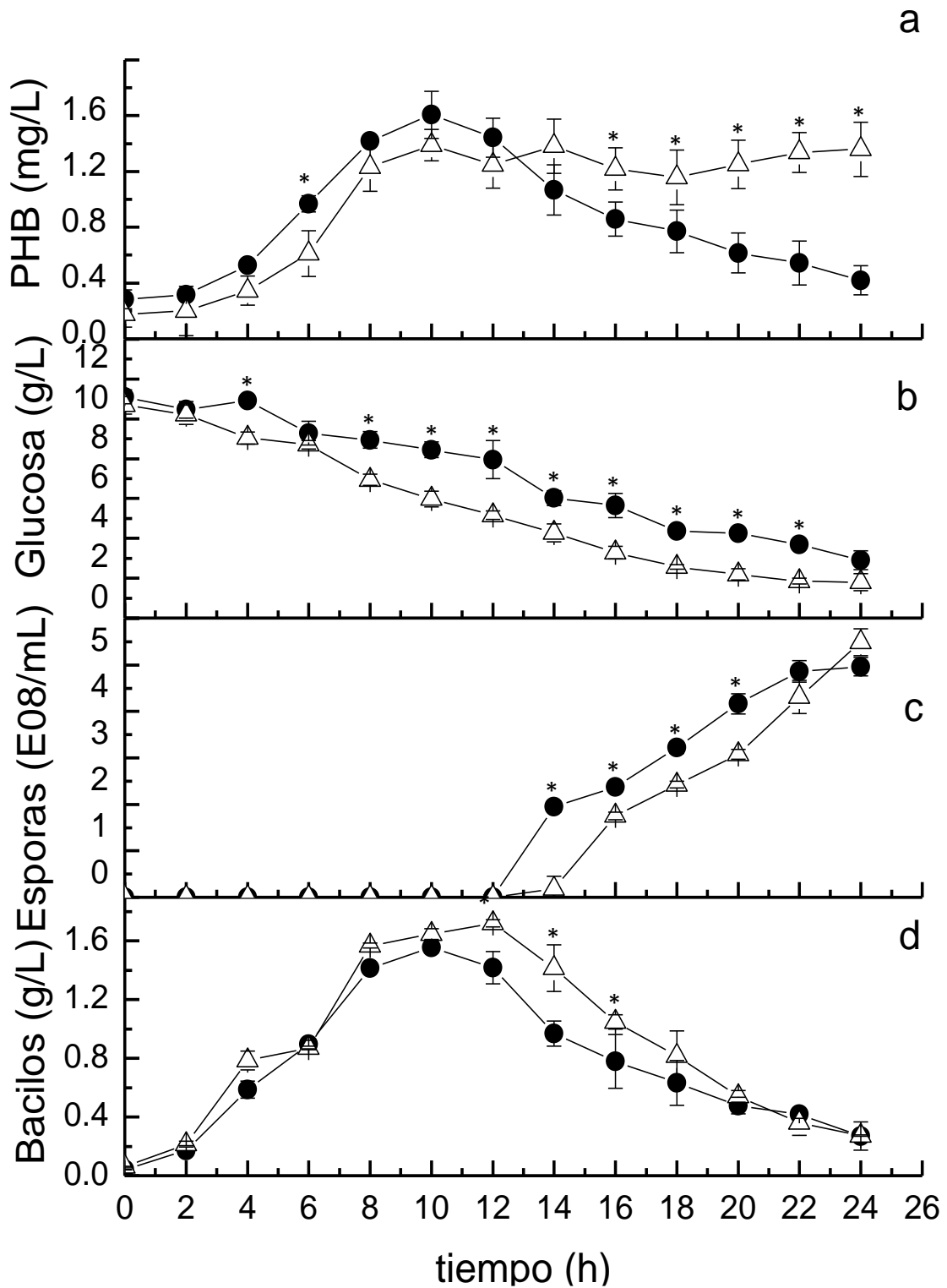


Figura 20. Cinéticas de *B. thuringiensis* sin adicionar (●) y adicionando (△) PK a las cuatro horas en fermentador. A; producción de PHB, B; consumo de glucosa, C; producción de esporas y D; cinética de crecimiento. Los asteriscos (*) indican diferencia significativa mediante análisis de Varianza con $\alpha=0.05$ y $n= 3$. Los datos son expresados como el promedio de las observaciones \pm su desviación estándar.

La producción de PHB máximo acumulado en la fermentación control es de 1.2 ± 0.2 g/L, el cual no mostró diferencia estadísticamente significativa durante las primeras 12 h comparado con la fermentación donde se adicionó PK, sin embargo el PHB en la fermentación con PK se mantiene con una acumulación casi constante hasta las 24 h, a diferencia con la fermentación control donde el PHB disminuye después de las 12 h de la fermentación hasta llegar a 0.38 ± 0.2 g/L a las 24 h. Este fenómeno pudo suceder por el retardo de la aparición de esporas o puede estar relacionado al descontrol de la esporulación.

En la fermentación control al igual que Benoit *et al.* (1990), se observó el máximo de PHB al final de la fase exponencial y antes del inicio de la esporulación, posteriormente el PHB disminuye. Por otra parte Martínez, (1994) midió PHB, lactato y acetato, observó que el PHB se acumula durante la fase de transición y se consume durante la fase de esporulación. Benoit, (1990) y Navarro *et al.*, (2006) reportan que el PHB es una fuente de energía para el proceso de esporulación, ya que, de acuerdo sus resultados el intermediario que más se produce es el PHB, acetato, lactato, piruvato y acetoína. Este fenómeno puede explicar el retardo en la aparición de esporas y podría estar relacionado con la probable inhibición de péptidos de señalización celular, como lo es el NprX y la proteasa neutra NpRA por la adición de la proteasa K.

8.4 Análisis bioinformático del péptido señal

Se realizó un análisis bioinformático para predecir sitios de corte y detectar al péptido señal/péptido no señal de la proteína madura NprX, única de *Bacillus thuringiensis* var HD-73.

En la Figura 23 la línea roja (C-score) indica la señal del sitio más probable de corte de todo el péptido maduro (NprX), el pico más alto muestra la posición que corta y libera el primer residuo. La línea verde (S-score) es la posición del péptido señal en todo el péptido maduro NprX y reconoce la posición de la proteína sin el

péptido señal, es decir, el péptido señal termina donde disminuye la línea color verde que es la posición 32 de NprX. La línea azul (Y-score) es la combinación de la media de la línea C-score y la pendiente de S-score, y se obtiene una mejor predicción del sitio de corte, es decir el valor o pico más alto, resalta con mayor precisión la posición del sitio de corte.

La predicción del péptido de señalización secretado al exterior de la célula es a partir del aminoácido de la posición 25 de acuerdo a los criterios de Markov, el cual corresponde a una Serina (S), dando como resultado al SKPDIVG como el probable péptido responsable de la señalización en *B. thuringiensis var kurstaki* HD-73 (Figura 23).

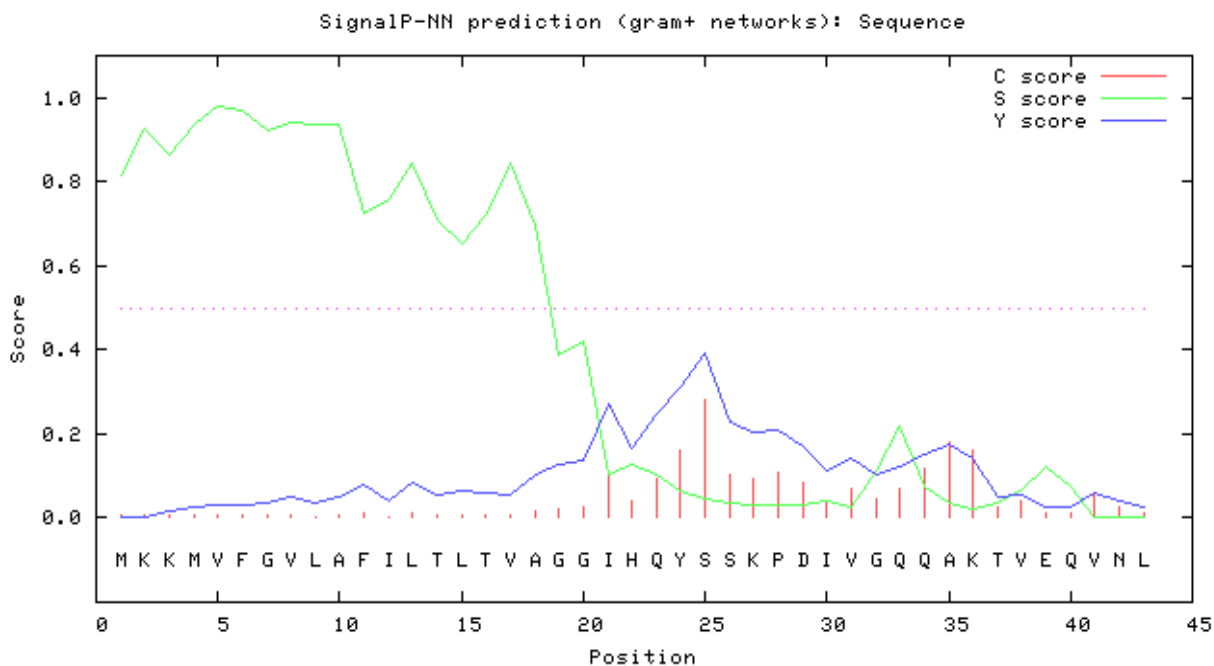


Figura 21. Diagrama de predicción del sitio de corte más probable del péptido de señalización excretado de acuerdo al modelo de Markov. C score (---) indica el sitio más probable de corte, S score (---) señala el péptido señal exportado y Y score (---) indica el promedio de la combinación del sitio de corte y el péptido exportado.

La alineación de la región secretada de NprR-NpRX se realizó mediante ClustalW con el software BioEdit versión 7.2.5 (Hall, 1999). Para identificar el heptapéptido de señalización putativo, se consideró la secuencia SKPDT identificada

por Pothathil y Lazzizzera (2003), usando las secuencias peptídicas de NprR de acuerdo a Perchat *et al.* (2011) comparándolas con todas las cepas reportadas de *B. thuringiensis* (Figura 24). La alineación se realizó con la finalidad de asegurar que la secuencia del heptapéptido de *B. thuringiensis* HD-73 fuera igual a los reportados por Pothathil y Lazzizzera (2003) o perteneciera a una de las siete clases reportadas por Perchat *et al.* (2011).

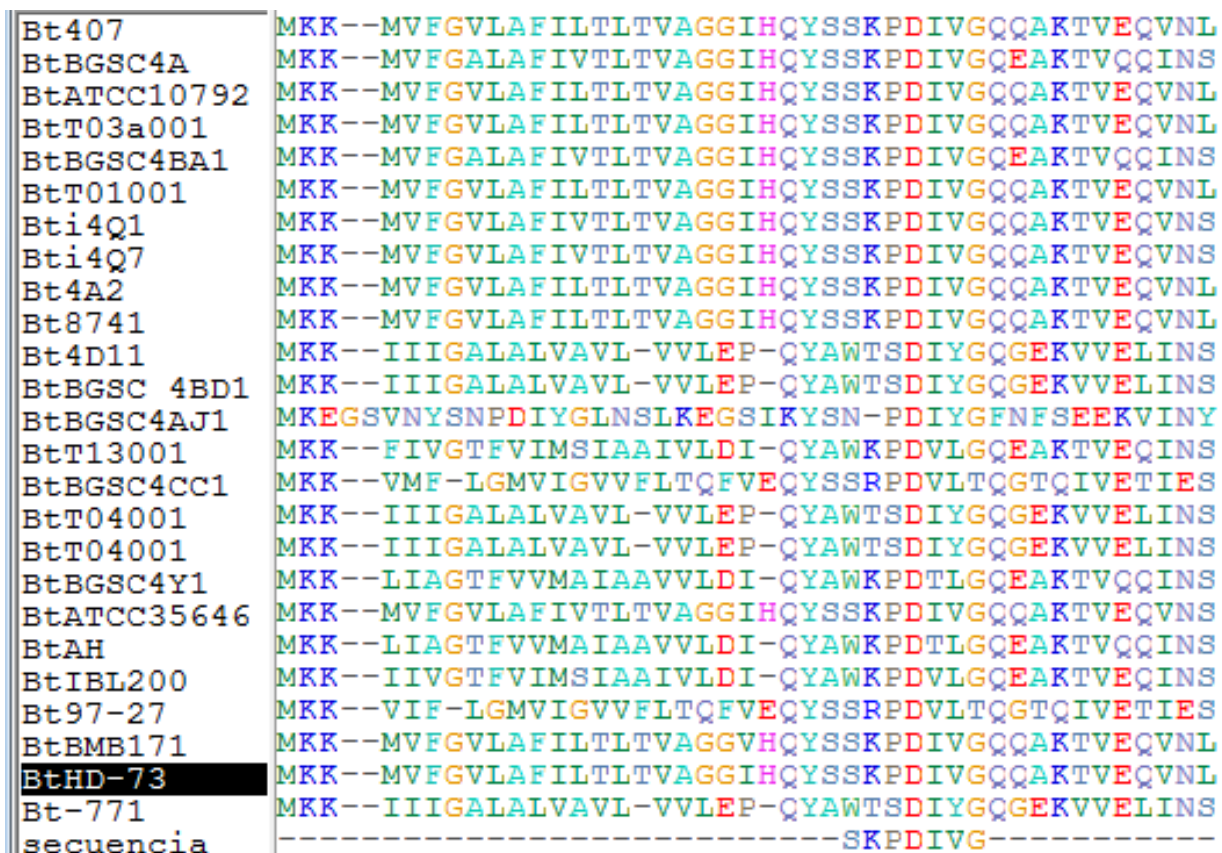


Figura 22. Alineamiento de péptidos NprX de *B. thuringiensis*. ClustaW de todas las secuencias reportadas en NCBI de *B. thuringiensis*. A la izquierda se encuentra el nombre de la cepa. El color azul indica las regiones conservadas y los colores morado, verde, rojo, gris y amarillo indican las regiones repetitivas. Los números genómicos de las cepas se encuentran en el anexo 4.

Los resultados mostraron que la secuencia del péptido maduro NprX de *B. thuringiensis* HD-73 es idéntica a las reportadas en *Bt* 407, *Bt* ATCC 10792, *Bt* T03a001, *Bt* 4a2, *Bt* 8741 y *Bt* BMB171.

8.5 Estandarización de la técnica de qPCR para la cuantificación de la transcripción de los genes *nprR-nprX*, *spo0A*, *nprA* y *cry1AC*

Los análisis de qPCR se realizaron con la finalidad de conocer los tiempos exactos de la expresión máxima de algunos genes de interés implicados en el quórum-sensing de *B. thuringiensis*. En la figura 25 se encuentran los resultados de la calidad de los ARN's extraídos y purificados, donde se puede observar la integridad de las dos bandas de ARN ribosomal que indican que no están degradados. Se llevó a cabo una prueba preliminar de PCR en tiempo real usando el ADNc a diferentes diluciones (1:0, 1:1, 1:5 y 1:10) con dH₂O DEPC, para obtener la mejor curva de unidades relativas de fluorescencia (RFU). La PCR se realizó usando los oligos 16S rANF, los cuales se usaron como control interno para la cuantificación de la expresión. La dilución 1:10 obtuvo un CT de 16.5 ± 0.2 , siendo esta la mejor dilución, debido a que mostraba RFU altos en comparación con las otras diluciones (Figura 26). Gao *et al.*, (2011) usaron muestras diluídas hasta 1:1000, sugiriendo tomar la mayor dilución que tenga RFU similares a la muestra control (sin diluir).

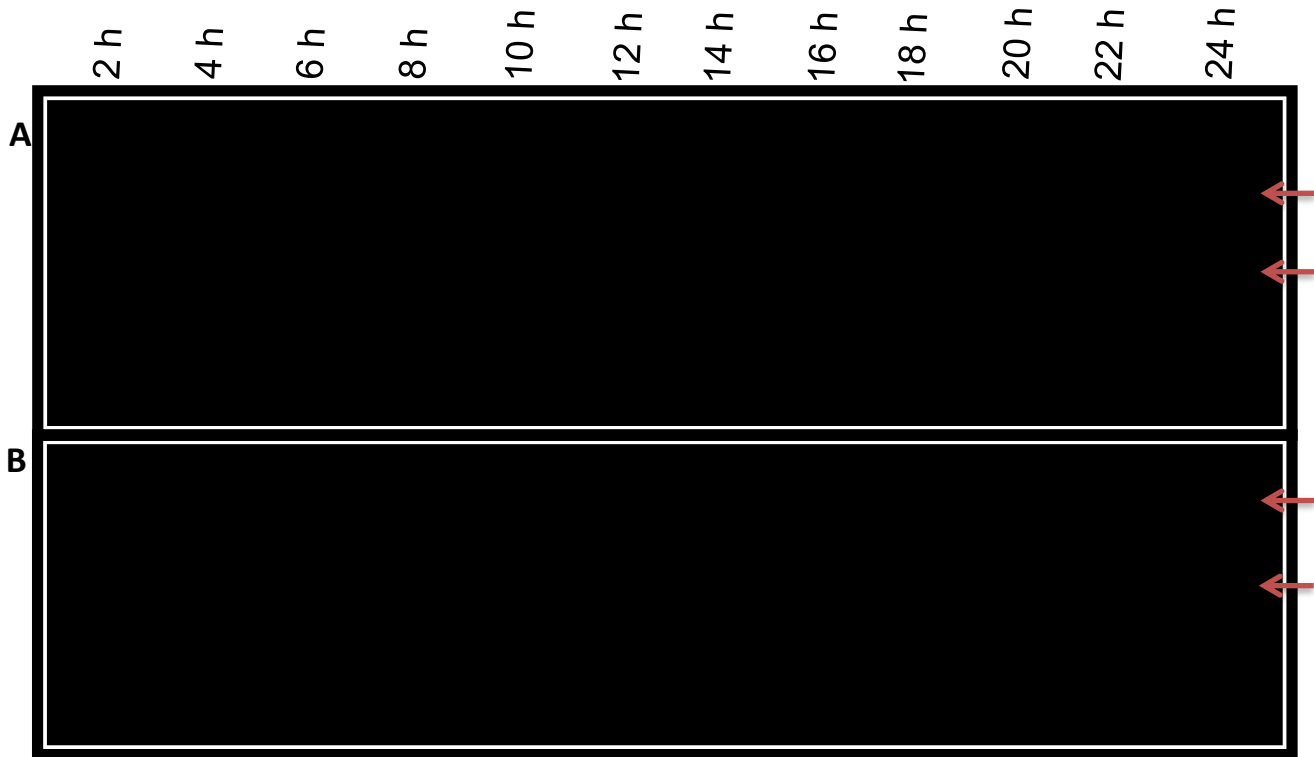


Figura 23. Gel de ARN de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes. A; ARN de la fermentación control y B; ARN de la fermentación con PK. En la parte superior de las bandas se muestra la hora en la que se tomó la muestra de la fermentación, a la cual se extrajo el ARN total.

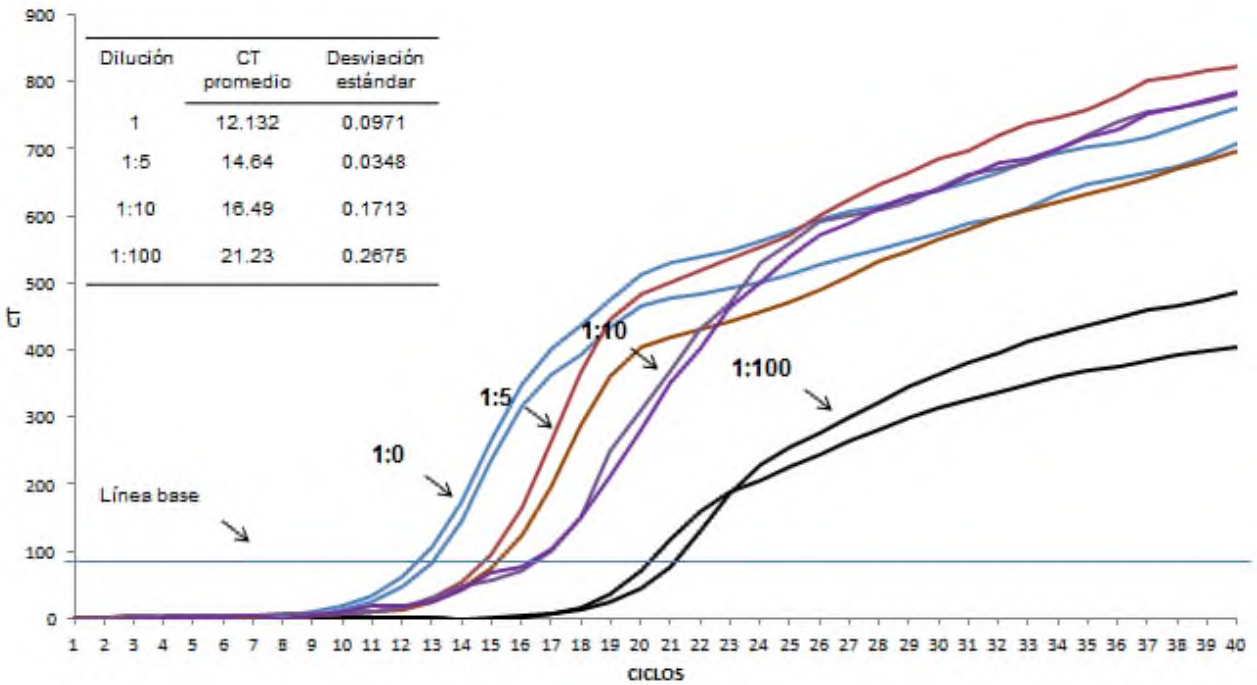


Figura 24. Curva de RFU de diferentes diluciones de ADNc usando el par de oligos 16S rANF.

Al igual que el gen *16S ARNr*, se realizaron gradientes de temperatura de alineamiento (T_a) de 50 a 63 °C para los oligos usados para la amplificación de los transcritos *nprA*, *nprRB*, *spo0A* y *cry*, teniendo como mejor resultado la temperatura de 60 °C, ya que no formaba dímeros o heterodímeros que afectaran la cuantificación de los transcritos.

8.6 Cuantificación de la transcripción de los genes *nprR-nprX*, *spo0A*, *nprA* y *cry1Ac*.

La figura 27 muestra los resultados de las cinéticas realizadas en fermentador para la transcripción de los genes *nprX*, *nprA*, *spo0A* y *cry1AC* en *B. thuringiensis* adicionando proteasa K y sin adicionarla. Para la fermentación control (sin adicionar PK) y donde se adicionó PK, se observa que durante la fase exponencial sólo se tiene transcripción de los genes *nprR-nprX* y *spo0A*. La expresión de los genes *nprA* y *cry1AC* se inició en la fase de esporulación para ambas fermentaciones.

La expresión máxima del gen *nprX* para el cultivo control fue a las 8 horas, esto representa la expresión *nprX/16S* normalizada de 1.0 y se usó como el valor relativo para los demás datos. Mientras que en el cultivo donde se adicionó PK la expresión relativa máxima fue de 0.6 ± 0.1 a las 10 horas, siendo 0.49 veces significativa menor que en el control. Es decir, que en ambos cultivos la máxima expresión relativa del *nprX/16S* se tiene durante la etapa de transición. Aceves *et al.* (2007), encontraron que el péptido NprRB (NprX) empieza a producirse en la fase de transición. Sin embargo al adicionar PK se retrasa 2 h el inicio de la transcripción de *nprX*, así como también, se reduce la expresión relativa hasta 0.4 ± 0.1 . Es evidente que la PK esta afectando la transcripción del *nprX*. Esto probablemente se debe a que la PK está hidrolizando señales o factores transcripcionales extracelulares implicadas en la formación de *nprX*.

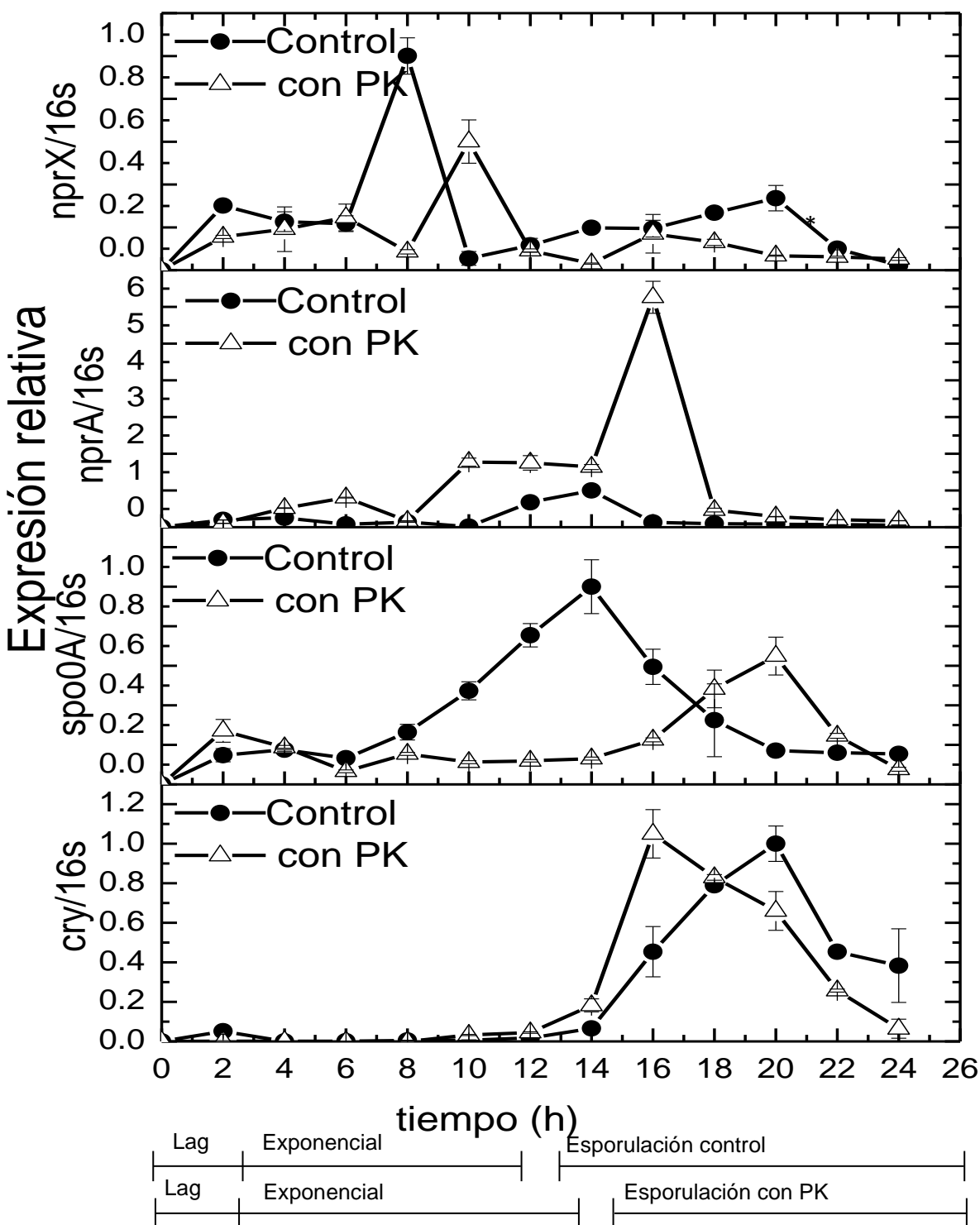


Figura 25. Cinética de la expresión de genes *nprX*, *nprA*, *spo0A* y *cry* de *B. thuringiensis* (●) adicionando y (△) sin adicionar proteasa K en fermentador. Los asteriscos (*) indican diferencia significativa mediante análisis de varianza con $\alpha=0.05$ y $n=3$. La expresión relativa se normalizó con el gen 16S igual a 1. Los datos son expresados como el promedio de las observaciones \pm su desviación estándar.

En cuanto al gen *spo0A* su expresión máxima para el cultivo control fue a las 14 horas, esto representa la expresión relativa *spo0A* /16S normalizada de 1.0. Mientras que en el cultivo donde se adicionó PK la expresión relativa máxima fue de 0.6 a las 20 horas. Es decir, que en ambos cultivos la máxima expresión relativa de del *spo0A* /16S se tiene durante la etapa de esporulación. Al igual que para el *nprX*, la adición de proteasa K esta afectando la transcripción del *spo0A*. Molle *et al.* (2003), reportaron que Spo0A-P es el principal regulador para el inicio de la esporulación, de tal forma, el retraso de la expresión de *spo0A* se puede asociar con nuestros resultados bioquímicos y microbiológicos donde se observó la aparición tardía de esporas en la fermentación con proteasa K.

La expresión máxima del *nprA* para el cultivo control fue a las 14 horas, esto representa la expresión relativa *nprA* /16S normalizada de 1.0. Mientras que en el cultivo donde se adicionó PK la expresión relativa máxima fue de 5.8 ± 0.5 a las 16 horas. Es decir, que en ambos cultivos la máxima expresión relativa del *nprA* /16S se tiene al mismo tiempo en que se detectan las primeras esporas. Donovan *et al.* (1997), reportaron que NprA se detectó en el proceso de formación de esporas en *B. thuringiensis* por métodos electroforéticos. La adición de proteasa K incrementa sustancialmente la expresión del gen *nprA*. Probablemente esto se deba a la hidrólisis de la NprA por la proteasa K, de tal manera que la célula al no detectar NprA en su exterior se ve forzada a transcribir una mayor cantidad de *nprA*, provocando el aumento en la expresión. Cabe mencionar que previamente se ha reportado que la NprA puede ser hidrolizada por proteasas que no son propias de *B. thuringiensis* como la proteasa K, la cual hidroliza reconociendo sitios específicos de diferentes proteínas (Petotchenko *et al.*, 2012).

La expresión máxima del gen *cry1Ac* para el cultivo control fue a las 16 horas, esto representa la expresión relativa *cry1Ac* /16S normalizada de 1.0. Mientras que en el cultivo donde se adicionó PK la expresión relativa máxima a las 20 h con la misma expresión relativa de 1.0. Es decir, que en ambos cultivos la máxima expresión relativa del *cry1Ac* /16S se tiene durante la fase de esporulación. La

trascrición máxima de *cry1Ac* se obtiene al mismo tiempo que la expresión máxima de *spo0A* en la fermentación control. Esto coincide con lo reportado por Yang *et al.* (2012), quienes aseguran que el gen *cry1AC* es dependiente de *spo0A*. Sin embargo, en la fermentación con PK la expresión máxima relativa del gen *cry1AC* fue 4 h antes que la del gen *spo0A*, donde se tiene un comportamiento diferente a la fermentación control y con lo reportado por Yang *et al.* (2012).

La Figura 28 muestra el gel de la cinética completa de proteína Cry para el cultivo en fermentador con adición de PK. Como se puede observar en la figura no se obtuvieron bandas de proteína de peso similar a Cry1AC (133 kDa) durante todo el cultivo. Esto implica que posiblemente la PK hidroliza la proteína Cry formada por *B. thurinsiensis*. Previamente se ha reportado el uso de la proteasa K para hidrolizar una proteína Cry. Mizuki *et al.* (2000), usaron la proteasa K para hidrolizar una proteína Cry de 81 kDa, obteniendo fragmentos de proteína de 66, 58, 56 y 44 kDa.

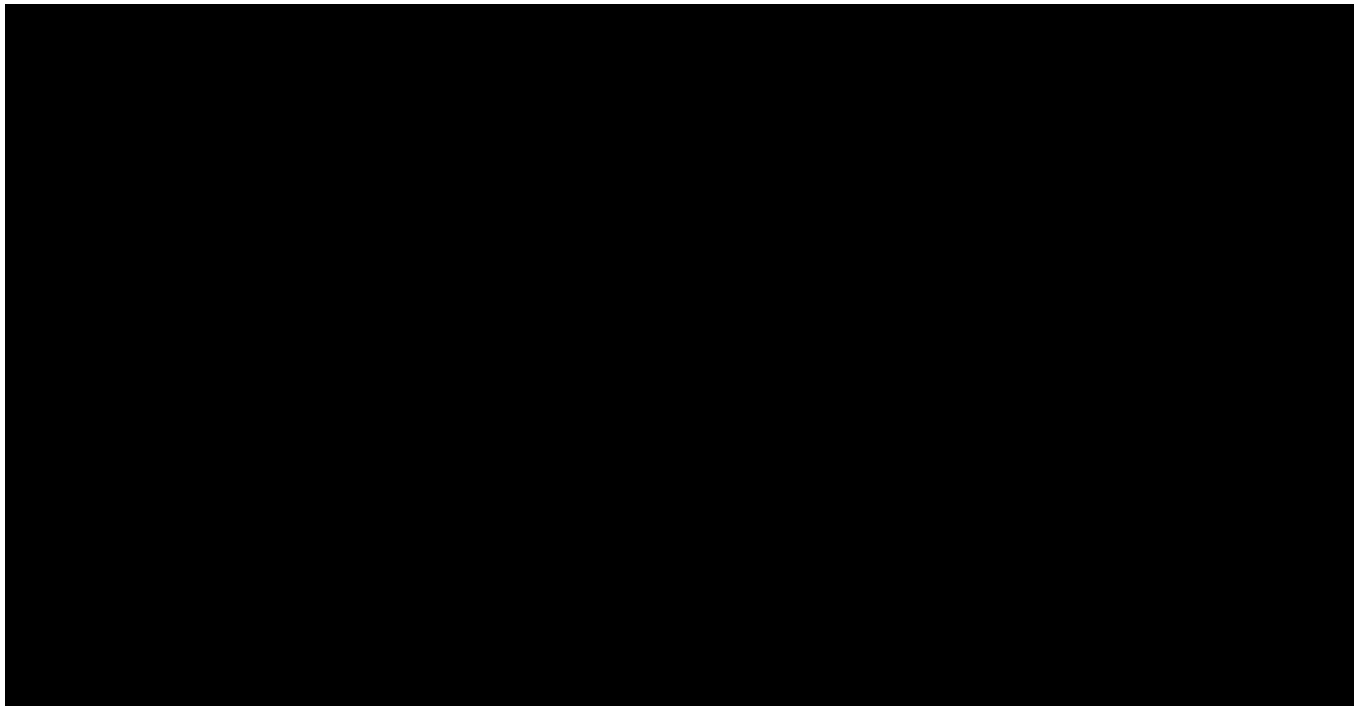


Figura 26. Gel electroforético del 8% (SDS-PAGE), donde se observa el efecto de la adición de PK en diferentes tiempos de la cinética de *B. thuringiensis* var. HD-73 en fermentador. En la parte superior se indican las horas en las cuales se midió la proteína Cry de 133.3 kDa. Tinción azul de Comassie.

9. Conclusiones

La proteasa K tiene un efecto significativo en el retraso de la aparición de esporas y el aumento en la cantidad de bacilos, debido a que afecta la transcripción de los genes *nprR-nprX*, *spo0A*, *nprA* y *cry1Ac* responsables de la comunicación celular en *B. thuringiensis*. De igual forma la proteasa K regula negativamente la transcripción del gen *nprX* y aumenta los genes *nprA* y *spo0A* en la fase de transición. Es posible que la proteasa K regule negativamente algunas señales fundamentales para la producción y/o acumulación de proteína Cry.

10.- RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar cinéticas de crecimiento, usando cepas mutantes de *Bacillus thuringiensis*, donde se eliminen los genes *spo0A*, *phbsintasa* y *nprA*, para poder relacionar con más precisión su comportamiento sobre la producción de esporas y proteína Cry.

Sería de gran aporte poder realizar un análisis proteómico diferencial entre la fermentación control y con PK, para cuantificar la proteasa NpRA y observar de una mejor forma el efecto de la PK sobre la síntesis de NpRA.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aceves-Diez, A.E., Robles-Burgueño, R. and de la Torre, M. (2007). SKPDT is a signaling peptide that stimulates sporulation and *cry1Aa* expression in *Bacillus thuringiensis* but not in *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**, 203-209.
- Adwitita, P., Ashwini, P., Avinash, Arun, K., Badri, R., Kajal, D., Voms, P. and Srividya, S. (2009). Optimization of Process Parameters for Maximum Polyn (- β -) hydroxybutyrate (PHB) Production by *Bacillus thuringiensis* IAM 12077. *Polish Journal of Microbiology* **58**, 149-154.
- Anderson, I., Sorokin, A., Kapatral, V., Reznik, G., Bhattacharya, A., Mikhailova, N., Burd, H., Joukov, V., Kaznadzey, D., Walunas, T., Markd'Souza, Larsen N., Pusch, G., Liolios, K., Grechkin, Y., Lapidus, A., Goltsman, E., Chu, L., Fonstein, M., Ehrlich, S.D., Overbeek, R., Kyrpides, N., and Ivanova, N. (2005). Comparative genome analysis of *Bacillus cereus* group genomes with *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **250**, 175-184.
- Andrews, R., Bibilos, M., and Bulla, L. (1985). Protease activation of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Appl. Environ. Microbiol* **50**, 737–742.
- Aronson A. (2002). Sporulation and delta-endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cell Mol Life Sci* **59**, 417-425.
- Baldus, L., Green, B., Youngman, P. and Moran, C. (1994). Phosphorylation of *Bacillus subtilis* transcription factor SpoOA stimulates transcription from the *spoZZG* promoter by enhancing binding to weak OA boxes. *J Bacteriol* **176**, 296-306.
- Benoit, T., Wilson, G. and Baygh, C. (1990). Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Lett in Appl Microbiol* **10**, 15-18.
- Bibilos, M., and Andrews, R. (1988). Inhibition of *Bacillus thuringiensis* proteases and their effects on crystal toxin proteins and cell-free translations. *Can J Microbiol* **34**, 740–747.

- Brandl, H., Gross, R., Lenz, R. and Fuller, C. (1988). *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Appl Environ Microbiol* **54**, 1977-1982.
- Braunegg, G., Sonleitner, B., and Laffery, M. (1978). A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutiric acid in microbial biomass. *Eur J Appl Microbiol. Biotechnol* **6**, 29-37.
- Bravo, A. Gill, S. and Soberon, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* **49**, 423-435.
- Brow, K. and Whiteley, H. (1988). Isolation of *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase capable of transcribing crystal protein genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 4166-4170.
- Cannon, R. (1996). *Bacillus thuringiensis* use in agriculture: A molecular perspective *Biol Rev* **71**, 561-636.
- Carroll, J., Li, J. and Ellar, D. (1989). Proteolytic processing of a coleopteran- specific delta-endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *J Biochem* **261**, 99–105.
- Cerón, J., Covarrubias, L., Quintero, R., Ortiz, A., Ortiz M., Aranda, E., Lina, L. y Bravo A. (1994). PCR Analysis of the Cry1 insecticidal crystal family gene from *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* **57**, 3057-3061.
- Chen, H., Tsai, T., Pan, S., Lin, J., Tseng, C. and Shaw, G. (2010). The master transcription factor Spo0A is required for poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) accumulation and expression of genes involved in PHB biosynthesis in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett* **304**, 74–81.
- Chestukhina, G., Zalunin, I., Kostina, L., Kotova, T., Katrukha, S. and Stepanov. V. (1980). Crystal-forming proteins of *Bacillus thuringiensis*: the limited hydrolysis by endogenous proteinases as a cause of their apparent multiplicity. *J Biochem* **187**, 457–465.
- Clarke, S., and J. Mandelstam. (1980). Dissociation of an early event in sporulation from chromosome replication in *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* **121**, 487-490.

- Clive, J. (2014). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. *ISAAA Brief No. 49. ISAAA: Ithaca, NY.*
- De la Torre, M. and Ferrera, R. (1997). *Bacillus thuringiensis*. Relación entre la expresión de los genes *cry* y las condiciones de proceso. *En perspectiva de la microbiología en México. IPN* pp 215-231.
- Dervyn, E., Poncet, S., Klier, A. and Rapoport, G. (1995). Transcriptional regulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Isrraelensis cryIVD* gene operon. *J Bacteriol* **177**, 2283-2291.
- Donovan, W., Tan, Y. and Slaney, A. (1997). Cloning of the *nprA* Gene for Neutral Protease A of *Bacillus thuringiensis* and Effect of In Vivo Deletion of *nprA* on Insecticidal Crystal Protein. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 2311–2317.
- Dunn, G., Jeffs, P., Mann, N., Torgersen, D. and Young, M. (1978). The relationship between DNA replication and the induction of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* **108**, 189-195.
- Dunny, G. and Leonard, B. (1997). Cell-cell communication in Gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **51**, 527-564.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., Heijne, G. and Nielsen, H. (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nat Protoc* **2**, 953–971
- Errington, J. (1993). *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbial rev* **57**, 1-33.
- Fernández, L., Aimanova, K., Gill, S., Bravo, A. and Soberón, M. (2006). A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochemical Journal* **394**, 77-84.
- Ferré, J. and Van, J. (2002). Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol* **47**, 501-33.
- Freese, E., Levinson, H., Sonenshein, A. and Tipper, D. (1981). Initiation of Bacterial Sporulation and Germination. *American Society for Microbiology, Washington, D.C.* p. 1-12.

- Fuqua C., Winans, S. and Greenberg, E. (1996). Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of *quorum-sensing* transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **50**, 727-751.
- Gao, W., Zhang, W. and Meldrum, D. (2011). RT-qPCR based quantitative analysis of gene expression in single bacterial cells. *Journal of Microbiological Methods* **85**, 221-227.
- González, J., Hobbs, E. y Losick, R. (2003). Cannibalism by Sporulating Bacteria. *Science* **301**, 510-513.
- Greenberg, E. and Fuqua, C. (1998). Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr Opin Microbiol* **1**, 183-189.
- Grossman, A. and Losick, R. (1988). Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 4369-4373.
- Hahn, J., Roggiani, M. and Dubnau, D. (1995). The major role of Spo0A in genetic competence is to downregulate *abrB*, an essential competence gene. *J Bacteriol* **177**, 3601–3605.
- Haldenwang, W. (1995). The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev* **59**, 1-30.
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**, 95-98.
- Hamon, M. and Lazazzera, B. (2001). The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **42**, 1199–1209.
- Hofte, H. and Whiteley, H. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* **53**, 242-255.
- Jurat, J. and Adang, M. (2004). Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur J Biochem* **271**, 3127-35.
- Karatas, A., Cetin, S. and Ozcengiz, G. (2003). The effects of insertional mutations in *comQ*, *comP*, *srfA*, *spo0H*, *spo0A* and *abrB* genes on bacilysin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Biochim Biophys Acta* **1626**, 51–56.
- Keynan, A., Berns, A., Dunn, G., Young, M. and Mandelstam, J. (1976). Resporulation of outgrowing *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol* **128**, 8-14.

- Knight, P., Crickmore, N. and Ellar, D. (1994). The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol Microbiol* **11**, 429-36.
- Ko, K., Kim, J., Kim, J., Kim, W., Chung, S., Kim, I. and Kook, Y. (2004). Population structure of the *Bacillus cereus* group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the plcR Gene. *Infect Immun* **72**, 5253-5261.
- Kodama, T., Endo, K., Ara, K., Ozaki, K., Kakeshita, H., Yamane, K. and Sekiguchi, J. (2007). Effect of *Bacillus subtilis* spo0A mutation on cell wall lytic enzymes and extracellular proteases, and prevention of cell lysis. *J Biosci Bioeng* **103**, 13–21.
- Kominek, L. and Halvorson, H. (1965). Metabolism of poly- β -hydroxybutyrate and acetoin in *Bacillus cereus*. *J bacterial* **90**, 1251-1259.
- Kraemer, A. and Moser, A. (1996). Kinetic study of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in lab-scale process. *Bioeng* **14**, 139-144.
- Kunitate, A., Okamoto, M. and Ohmori, I. (1989). Purification and characterization of a thermostable serine protease from *Bacillus thuringiensis*. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 3251–3256.
- Lazazzera, B., Palmer, T., Quisel, J. and Grossman, A. (1999). Cell density control of gene expression and development in *Bacillus subtilis*. In *Cell-Cell Communication in Bacteria*. Edited by Dunny, G. and Winans, S. Washington, D.C. ASM Press 27-46.
- Lazazzera, B. (2000). Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. *Current Opinion in Microbiology* **3**, 177–182.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M. and Chaufaux, J. (1994). Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* spo0A mutant. *BiolTechnology* **13**, 67-71.

- Li, E. and Yousten, A. (1975). Metalloprotease from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol* **30**, 354–361.
- Liu, B. and Tzeng, Y. (2000). Characterization study of the sporulation kinetics of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol Bioeng* **68**, 11-17.
- Mandelstam, J., and Higgs, S. (1974). Induction of sporulation during synchronized chromosome replication in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **120**, 38-42.
- Mendez, M., Orsaria, L., Philippe, V., Pedrido, M. and Grau, R. (2004). Novel roles of the master transcription factors Spo0A and SigmaB for survival and sporulation of *Bacillus subtilis* at low growth temperature. *J Bacteriol* **186**, 989–1000.
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* **31**, 426-431.
- Miller, M. and Bassler, B. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**, 165-199.
- Mizuki, E., Shin y., Saitoh, H., Yamashita, S., Akao, A., Higuchi, K. and Ohba, M. (2000). Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* **7**, 625–634.
- Molle, V., Fujita, M., Jensen, S., Eichenberger, P., Gonzalez, J., Liu, J. and Losick, R. (2003). The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **50**, 1683–1701.
- Navarro, A. (1999). Modelo Termodinamico: producción de proteína Cry por *Bacillus thuringiensis*. *Tesis de Maestría*. UNITEC-CINVESTAV-IPN, México.
- Navarro, A., Farrera, R., Lopez, R. and Perez, F. (2006). Relationship between poly- β -hydroxybutirate production and δ -endotoxin for *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biotechnol Lett* **28**, 641-644.
- Pal, A., Prabhu, A., Kumar, A., Rajagopal, B., Dadhe, K., Ponnamma, S., and Shivakumar, S. (2009). Optimization of Process Parameter for Maximun poly- β -hydroxybutirate (PHB) production for *Bacillus thuringiensis* IAM 12077. *Polish Journal of Microbiology* **58**, 149-154.

- Perchat, S., Dubois, T., Zouhir, S., Gominet, M., Poncet, S., Lemy, C., Aumont, M., Deutscher, J., Gohar, M., Nessler, S., and Lereclus, D., (2011). A cell–cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Molecular Microbiology* **82**, 619–633.
- Petrotchenko, E., Serpa, Darryl, J., Hardie, J., Berjanskii, M., Suriyamongkol, D., Wishart, B. and . Borchers, C. (2012). Use of Proteinase K Nonspecific Digestion for Selective and Comprehensive Identification of Interpeptide Cross-links: Application to Prion Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* **11**, M111.013524.
- Pfannenstiel, M., Ross, E., Kramer, V. and Nickerson, K. (1984). Toxicity and composition of protease-inhibited *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystals. *FEMS Microbiol Lett* **21**, 39–42.
- Phillips, Z. and Strauch, M. (2002). *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cell Mol Life Sci* **59**, 392-402.
- Poncet, S., Dervyn, E., Klier, A. and Rapoport, G. (1997). Spo0A represses transcription of the cry toxin genes in *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology* **143**, 2743-2751.
- Pottathil, M. and Lazazzera, B. (2003). The extracellular Phr peptide-Rap phosphatase signaling circuit of *Bacillus subtilis*. *Front Biosci* **8**, 32-45.
- Ratnayake, M., Serror, P., Win, K., and Sonenshein, A. (2001). *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes & Development*. **15**, 1093–1103.
- Reading, N. and Sperandio, V. (2006). Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **254**,1-11.
- Rocha, J., Flores, V., Cabrera, R., Soto, A., Granados, G., Juaristi, E., Guarneros, G., and de la Torre, M. (2012). Evolution and some functions of the NprR–NprRB quorum-sensing system in the *Bacillus cereus* group. *Appl Microbiol Biotechnol* **94**, 1069–1078.

- Rodríguez, M. and de la Torre M. (1996). Effect of the dilution rate on the biomass yield of *Bacillus thuringiensis* and determination of its rate coefficients under steady-state conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* **45**:546–550.
- Rowe, G. (1990). Central metabolism of *Bacillus thuringiensis* during growth and sporulation. London, Ontario, Canada. *Ph Dissert* p.p.295
- Rowe, G. and Margaritis, A. (1987). Bioprocess development in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. *Crit Rev Biotechnol* **6**, 87-127.
- Schauder, S. and Bassler, B. (2001). The languages of bacteria. *Genes Dev* **15**, 1468-1480.
- Schmittgen, T., and Livak, K. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protocols* **3**:1101-1108.
- Schneider, K., Tanya, M. and Grossman, D. (2002). Characterization of *comQ* and *comX*, Two Genes Required for Production of ComX Pheromone in *Bacillus subtilis* *Journal of Bacteriology*, **184**, 410–419.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van, Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. and Dean, D.H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 775-806.
- Slamti, L. and Lereclus, D. (2005). Specificity and polymorphism of the PlcR-PapR quorum-sensing system in the *Bacillus cereus* group. *J Bacteriol* **187**, 1182-1187.
- Slamti, L., Perchat, S., Huillet, E. and Lereclus, D. (2014). Quorum Sensing in *Bacillus thuringiensis* is Required for Completion of a Full Infectious Cycle in the Insect. *Toxins* **6**, 2239-2255.
- Slepecky, R. and Law, J. (1961). Synthesis and degradation of poly- β -hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium*. *J Bacteriol* **82**, 37–42.
- Solomon, J., Lazazzera, B. and Grossman, A. (1996). Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **10**, 2014-2024.

- Sonenshein, A., Smith, I., Slepecky, R. and Setlow, P. (1989). Metabolic regulation of sporulation and other stationary-phase phenomena. Regulation of prokaryotic development: a structural and functional analysis of sporulation and germination. *American Society for Microbiology Washington, D.C.* p. 109-130.
- Tamez, G., Galán, W., Medrano, R., García, G., Rodríguez, P., Gómez, F. and Tamez G. (2001). Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL* **4**, 143-152
- Tan, Y . and Donovan, W. (2000). Deletion of *aprA* and *nprA* genes for alkaline protease A and neutral protease A from *Bacillus thuringiensis*: effect on insecticidal crystal proteins. *Journal of Biotechnology* **84**, 67–72.
- Thurley, P., Chilcott, C., Kalmakoff, J. and Pillai. J. (1985). Characterization of proteolytic activity associated with *Bacillus thuringiensis* var. *Darmstadiensis* crystals. *FEMS Microbiol Lett* **27**, 221–225.
- Uehara, H., Yamane, K. and Maruo, B. (1979). Thermosensitive, extracellular neutral proteases in *Bacillus subtilis*: isolation, characterization, and genetics. *J Bacteriol* **139**, 583-590.
- Vadlamudi, R., Weber, E., Ji, I., Ji, T. and Bulla, L. (1995). Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem* **270**, 5490–5494.
- Verplaetse, E., Slamti, L., Gohar, M. and Lereclus, D. (2015). Cell differentiation in a *Bacillus thuringiensis* population during planktonic growth, biofilm formation, and host infection. *mBio* **6**, 1-10.
- Vilas, G., Peruca, A. and Arantes, O. (2007). Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can J Microbiol* **53**, 673-687.
- Waalwijk, C., Dullemans, A., vanworkurn, M. and Visser, B. (1985). Molecular cloning and the nucleotide sequence of the *M*, 28 000 crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Nucleic Acids Res* **13**, 8207-8217.
- Ward, E. and Ellar, D. (1986). *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* δ -endotoxin. Nucleotide sequence and characterization of the transcripts in *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **191**, 1-11.

- Waters, C. and Bassler, B. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 319-346.
- Wilcks, A., Jayaswal, N., Lereclus, D. and Andrup, L. (1998). Characterization of plasmid pAW63, a second self-transmissible plasmid in *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73. *Microbiology* **144**, 1263–1270.
- Winans, S. and Dunny, G. (1999). *Cell–Cell Signaling in Bacteria*. Washington, DC: ASM. 1-22.
- Wong, H. and Whiteley, H. (1987). Expression of a cloned *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* **169**, 4110–4118.
- Wong, H., Schnepf, H. and Whiteley, H. (1983). Transcriptional and translational start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J Biol Chem* **258**, 1960-1967.
- Yang, H., Wang, P., Peng, Q., Rong, R., Liu, C., Lereclus, D., Zhang, J., Song, F. and Huang, D. (2012). Weak Transcription of the *cry1Ac* Gene in Nonsporulating *Bacillus thuringiensis* Cells. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 6466–6474.
- Yoshisue, H., Fukada, T., Yoshida, K., Sen, K., Kurosawa, Sakai, H. and Komano, T. (1993). Transcriptional regulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* mosquito larvicidal crystal protein gene *cryZVA*. *J Bacteriol* **175**, 2750-2753.
- Zambrano, M. and Kolter, R. (1996). GASping for life in stationary phase. *Cell* **86**, 181-184.
- Zouari, N. and Jaoua, S. (1997). Purification and immunological characterization of particular delta-endotoxins from three strains of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol Lett* **19**, 825-829.

12. NOMENCLATURA

B	Biomasa.
esp	concentración de esporas [E08/mL]
G	glucosa.
kDa	kilo Daltones
nM	nano molar
<i>nprA</i>	gen que codifica a una proteasa neutra A
<i>nprR</i>	gen que codifica a un factor transcripcional NprR
<i>nprRB</i>	gen que codifica a un péptido transcripcional NprRB
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PK	proteasa K.
PM	peso molecular [g mol ⁻¹]
<i>spo0A</i>	gen que codifica a un factor de esporulación Spo0A
tc	tiempo crítico (h)
X	número de células durante la fermentación [célula mL ⁻¹]
X _{max}	Máximo crecimiento alcanzado (g L ⁻¹)
μ _{max}	velocidad máxima específica de crecimiento (h ⁻¹)
μL	microlitros
λ	constante para determinar la fase lag. (h ⁻¹)

13.- ANEXOS

Anexo 1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ARN ZR-Fungal/Bactrial RNA Microprep Zymo Research

Resuspender el pellet en 800 μ L de buffer de lisis de ARN, y transferirlo a un tubo de Lysis ZR Bashing beadtm.

1. Poner con seguridad el tubo en un vortex a velocidad máxima por 1-2 min.
2. Centrifugar el tubo ZR Bashing Bead Lysis buffer a $\geq 12\ 000$ x G por 1 min.
3. Transferir 400 μ l del sobrenadante a un columna Zymo-spin III C dentro de un tubo de recolección de 1.5 mL y centrifugar a 8000 x G por 30 segundos. Guardar el fluido.
4. Adicionar 320 μ L de etanol (95-100%) al fluido en el tubo de recolección y mezclar bien en vortex.
5. Transferir la mezcla a una columna Zymo-spin I C en un tubo de recolección y centrifugar a ≥ 12000 x G por 30 segundos. Descartar el fluido.
6. Adicionar 400 μ L de buffer RNA prep a la columna. Centrifugar ≥ 12000 x G por 1 min. Descartar el fluido y reemplazar la columna Zymo spin I C al tubo de colección.
7. Adicionar 800 μ L de buffer de lavado de ARN a la columna y centrifugar a 12000 x G por 30 segundos. Descartar el fluido y volver la columna al tubo de recolección. Repetir el lavado con 400 μ L de buffer de lavado ARN.
8. Centrifugar la columna Zymo spin I C a 12000 x G por 2 min en el tubo de recolección para asegurarse que se remueva completamente el buffer de lavado.
9. Quitar cuidadosamente la columna Zymo spin I C del tubo de recolección y colocarlo dentro de un tubo libre de DNAsa y RNAsa. Adicionar $6 \geq$ uL de agua desionizada libre de DNAsa y RNAsa directamente al centro de la columna y esperar 1 min.
10. Centrifugar a 10000 x G por 30 segundos. El ARN puede ser usado inmediatamente o almacenado ≤ -70 °C.

Nota: Es mejor adicionar 10 uL de agua desionizada libre de DNAsa y RNAsa.

Anexo 2. Digestión con DNasa libre de RNasa (#EN0521 1000 U).

1.- En un tubo libre de RNasa colocar:

ARN	1 µg
Buffer de reacción 10X con MgCl ₂	1 µL
DNasa I, libre de RNasa (#EN0521)	1 µL (1U)
Agua tratada con DEPC (#R0601)	a 10 µL

2.- Incubar a 37 °C por 30 min.

3.- Adicionar 1 µL 50 mM EDTA e incubar a 65 °C por 10 min.

4.- Usar el producto como templeado para la transcriptasa reversa o almacenar en congelación a -70 °C para su posterior uso.

Nota: No usar más de 1 U de DNasa I por cada 1 µg de ARN.

Anexo 3. Geles en condiciones desnaturalizantes con formaldehído en buffer MOPS.

1.- preparar el buffer MOPS: 0.4 M MOPS (pH 7.0), 0.1 M de acetato de sodio, 0.01 M de EDTA (pH 8.0).

2.- preparar geles de agarosa de la siguiente forma:

- mezclar 1 gr de agarosa en polvo en 72 mL de agua desionizada;
- disolver la agarosa y adicionar 10 mL de buffer MOPS 10X y mezclar;
- cuando la solución se enfríe a 60 °C, se añaden 18 mL de formaldehído (37%) en una campana de extracción y mezclar.

3.- poner el gel en una cámara de electroforesis con buffer MOPS 1X.

4.- calentar las muestras de ARN y marcador de peso molecular a 70 °C por 10 min y enfriar rápidamente sobre hielo por 3 min.

5.- cargar 10 µL de la muestra en el gel.

Nota: No se requiere bromuro de etidio para teñir el gel, el colorante 2X RNA es suficiente para visualizarlo bajo luz UV.

Anexo 4. Numeros genómicos de las cepas de *B. thuringiensis* usadas en el alineamiento de péptidos NprX.

Nombre de la cepa	NprX	Abreviación	Numero de acceso
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain 407	MKKMVFGVLAFILTLTVAGGIHQYSSKPDIVGQQAKTVEQVNL	Bt407	ACMZ01000019.1
<i>thuringiensis</i> serovar <i>andalousiensis</i> BGSC 4AW1	MKKMVFGALAFIVTLTVAGGIHQYSSKPDIVGQEAKTVQQINS	BtBGSC4A	ACNG01000020.1
<i>thuringiensis</i> serovar <i>berliner</i> ATCC 10792	MKKMVFGVLAFILTLTVAGGIHQYSSKPDIVGQQAKTVEQVNL	BtATCC10792	NZ_ACNF01000019.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i> str. T03a001	MKKMVFGVLAFILTLTVAGGIHQYSSKPDIVGQQAKTVEQVNL	BtT03a001	NZ_ACND01000019.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>pondicheriensis</i> BGSC 4BA1	MKKMVFGALAFIVTLTVAGGIHQYSSKPDIVGQEAKTVQQINS	BtBGSC4BA1	NZ_ACNH01000016.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>thuringiensis</i> str. T01001	MKKMVFGVLAFILTLTVAGGIHQYSSKPDIVGQQAKTVEQVNL	BtT01001	NZ_ACNA01000020.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i> 4Q1	MKKMVFGVLAFLIVTLTVAGGIHQYSSKPDIVGQQAKTVEQVNS	Bti4Q1	JN637469
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i> 4Q7	MKKMVFGVLAFLIVTLTVAGGIHQYSSKPDIVGQQAKTVEQVNS	Bti4Q7	JN637470
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>thuringiensis</i> 4A2	MKKMVFGVLAFILTLTVAGGIHQYSSKPDIVGQQAKTVEQVNL	Bt4A2	JN637471
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>thuringiensis</i> 8741	MKKMVFGVLAFILTLTVAGGIHQYSSKPDIVGQQAKTVEQVNL	Bt8741	JN637473
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i> 4D11	MKKIIIIGALALVAVLVVLEPQYAWTSDIYGQGEKVVELINS	Bt4D11	JN637468
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>huazhongensis</i> BGSC 4BD1	MKKIIIIGALALVAVLVVLEPQYAWTSDIYGQGEKVVELINS	BtBGSC 4BD1	NZ_ACNI01000018.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>monterrey</i> BGSC 4AJ1	MKEGSVNYSNPDIYGLNSLKEGSIKYSNPDIYGFNFSEEKVINY	BtBGSC4AJ1	NZ_ACNE01000016.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>pakistani</i> str. T13001	MKKFIVGTFVIMSIAAIVLDIQYAWKPDVLGQEAKTVEQINS	BtT13001	NZ_ACNC01000023.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>pulsiensis</i> BGSC 4CC1	MKKVMFLGMVIGVVFLTQFVEQYSSRPDVLTTQGTQIVETIES	BtBGSC4CC1	NZ_ACNJ01000017.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>sotto</i> str. T04001	MKKIIIIGALALVAVLVVLEPQYAWTSDIYGQGEKVVELINS	BtT04001	NZ_ACNB01000029.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>tochigiensis</i> BGSC 4Y1	MKKLIAGTFVVMIAAIVLDIQYAWKPTDLGQEAKTVQQINS	BtBGSC4Y1	NZ_ACMY01000020.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar	MKKMVFGVLAFLIVTLTVAGGIHQYSSKPDIVGQQAKTVEQVNS	BtATCC35646	CM000759.1

<i>israelensis</i> ATCC 35646			
<i>Bacillus thuringiensis</i> str. <i>Al Hakam</i>	MKKLIAGTFVVMIAAAVLDIQYAWKPD TL GQEAKTVQQINS	BtAH	NC_008600.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> IBL 200	MKKIIVGTFVIMSIAAIVLDIQYAWKPD V L G QEAKTVEQINS	BtIBL200	EEM98033.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>konkukian</i> str. 97-27	MKKVIFLGMVIGVVFLTQFVEQYSSRPD V LTQGTQIVETIES	Bt97-27	AAQ77235.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> BMB171	MKKMVFGVLA FILTLTVAGG VHQYSSK P DI VGQQAKTVEQ VNL	BtBMB171	ADH05341.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-73	MKKMVFGVLA FILTLTVAGGIHQYSSK P DIVGQQAKTVEQVNL	BtHD-73	
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-771	MKKIIIGALALVAVLVVLEPQYAWTSDIYGQGEKVVELINS	Bt-771	CP003752.1