

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL



**“Diferenciación de *Bacillus thuringiensis* HD73 en medio líquido y superficial:
Células especializadas para esporulación, virulencia, necrotrofismo y
formación de bio-película”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

ING. DANIEL GUADALUPE PÉREZ SOLÍS

COMITÉ TUTOTAL

CO-DIRECTOR INTERNO: Dr. GUSTAVO VINIEGRA GONZÁLEZ

CO-DIRECTOR EXTERNO: Dr. JORGE GUSTAVO ROCHA ESTRADA

ASESOR: Dr. ERNESTO FAVELA TORRES

CIUDAD DE MÉXICO 26 DE JUNIO 2020

Declaración de originalidad

El que suscribe Daniel Guadalupe Pérez Solís, alumno del posgrado en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: "**Diferenciación de *Bacillus thuringiensis* HD73 en medio líquido y superficial: Células especializadas para esporulación, virulencia, necrotrofismo y formación de bio-película**"

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para lo obtención del grado de Maestro en Biología Experimental es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o **moral** que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 18 de junio del 2020.

Atentamente



Daniel Guadalupe Pérez Solís

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 22 de junio de 2020

Comisión Académica del Posgrado
Presente

El que suscribe Daniel Guadalupe Pérez Solís alumno con número de matrícula 2173806072, del posgrado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación "**Diferenciación de *Bacillus thuringiensis* HD73 en medio líquido y superficial: Células especializadas para esporulación, virulencia, necrotrofismo y formación de bio-película**" a desarrollar en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado. En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiese ocasionarse a esta Casa de Estudios.


Daniel Guadalupe Pérez Solís

Nombre completo y firma autógrafa*

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Durante el desarrollo de este proyecto de tesis del Ing. Daniel Guadalupe Pérez Solís recibió la beca de CONACyT No 63399 que le fue otorgada para sus estudios de Maestría durante el periodo de septiembre 2017 a agosto 2019.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

“Diferenciación de *Bacillus thuringiensis* HD73 en medio líquido y superficial: Células especializadas para esporulación, virulencia, necrotrofismo y formación de bio-película”

que presentó

Daniel Guadalupe Pérez Solís

El día 26 de junio del año 2020

Sinodales:

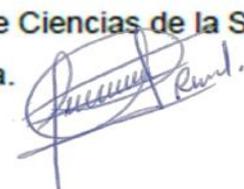
Presidente: Dr. Ernesto Favela Torres. Departamento de Biotecnología.
Universidad Autónoma Metropolitana.



Secretario: Dr. Francisco Javier Figueroa Martínez. Cátedras CONACyT-UAM.



Vocal 1: Dra. Roxana Uri Miranda Labra. Departamento de Ciencias de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana.



Vocal 2: Dr. Alfredo Martínez Jimenez. Departamento de Ingeniería Celular y Biotatálisis. Instituto de Biotecnología-UNAM.



COMITÉ TUTORAL

Co-Director Interno:

Gustavo Viniegra González (UAM-I)

Profesor Titular C del Tiempo Completo

Departamento de Biotecnología de la

Adscripción: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

E-mail: vini@xanum.uam.mx.

Co-director Externo:

Dr. Jorge Gustavo Rocha Estrada

Cátedras CONACyT-CIAD

Adscripción: Centro de Investigación y Desarrollo en Agrobiotecnología Alimentaria

E-mail: jorge.rocha@ciad.mx

Asesor:

Dr. Ernesto Favela Torres

Profesor Titular C del Tiempo Completo

Departamento de Biotecnología

Adscripción: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

E-mail: favela@xanum.uam.mx.

"Cuando alguien busca, suele ocurrir que sus ojos solo ven aquello que anda buscando, y ya no logra encontrar nada ni se vuelve receptivo a nada porque solo piensa en lo que busca, porque tiene un objetivo y se halla poseído por él.

Buscar significa tener un objetivo. Pero encontrar significa ser libre, estar abierto, carecer de objetivos"

Herman Hesse

DEDICATORIA:

A mi hermosa madre, a mi
hermana que tanto amo y a mi
abuelita Rosi de quien tanto
he aprendido.

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Gustavo Viniegra, por todo su apoyo, comprensión y palabras de aliento en que me dio en estos 4 años. Gran parte del ser humano que soy se lo debo a usted. Infinitas gracias por todo su apoyo, nunca me voy a olvidar de su persona.

Al Dr. Favela, por todo su apoyo que me brindo en este proceso, por su interés en mi desarrollo académico.

Al Dr. Jorge Rocha, por su apoyo y paciencia para realización de esta tesis, por aceptarme por ser su alumno.

A la Dra. Mayra de la Torre, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

A Dr. Francisco Figueroa, muchas gracias Paco por toda la paciencia que me tuviste durante toda la maestría, por el entusiasmo en querer ayudar a todos tus alumnos, muchas gracias.

A mi madre a quien ni siquiera con esta tesis podré agradecerle por darme la vida, por educarme para ser un gran ser humano, por las veces que me escuchó y nunca permito que me rindiera.

A mi hermana a quien tanto amo, gracias por todo tu apoyo durante camino, creo no pude haber tenido una mejor hermana que tú.

A mis abuelitos Rosi, Audelino y Celia quienes siempre me han demostrado su amor, cariño y comprensión.

A mi tía Paula, no tengo manera de agradecer que me brindará una familia en la Ciudad de México. Una de las mejores cosas que me ha pasado en la vida es tenerla como mi familia. Gracias mi tío Juan, a mis primos Leti, Juan, Vicky, Mari y Vale y Elias, por aceptarme como parte de su familia.

A mi amiga Isis, que aunque estamos a más de 700 km de distancia, tenemos una conexión que no se tiene con cualquiera, gracias por esas horas en el teléfono, gracias por ser parte de mi vida. Gracias por todo.

A Marco, muchas gracias por permitir ser parte de tu vida, gracias por esas experiencias que hemos tenido juntos, de ti solo he recibido lo mejor que se puede recibir de una persona. Gracias a Yadira que siempre fue una bella persona con nosotros, a Alma que fue tan amable y linda con nosotros, también Saúl. Armando y Michelle.

A José Luis, gracias por tu amistad, aunque casi no tenemos contacto sabes que mi amistad siempre será incondicional, eres un gran ser humano y haberte conocido es de las mejores cosas que me pasaron en la Ciudad de México.

A Adri, muchas gracias por permitirse ser parte de tu vida, aunque llevamos un poco tiempo de habernos conocido, siento que te conozco desde hace años.

A Gerardo, muchas gracias por todas las cosas que aprendimos juntos, por el tiempo que compartimos, gracias por todo.

A mi amigo Víctor e Iván, no saben lo agradecido que estoy con ustedes por todo el apoyo que brindaron cuando llegué a la Ciudad de México, sin duda alguna esto no hubiese sido posible. Los quiero mucho.

A mis amigos María José, Jorge y Erick. El mejor recuerdo que tengo de Sonora fue con ustedes. Gracias Pepé por permitirme formar parte de tu círculo de amigos, gracias por todas pláticas y noches hermosas que vivimos juntos. Eres excepcional y extraordinaria y tú sabes a que me refiero; le agradezco a la vida el gran regalo que me dio: permitirme conocerte.

A mis amigas Ceci y Silvia, muchas gracias por formar parte de mi círculo de amigos, por invitarme a sus casas, por tantas noches que pasamos juntos, por las risas, por las pijamadas. Gracias Silvia, por hacerme sentir parte de tu familia, por invitarme a quedarte contigo, nunca olvidaré esos momentos.

A mis amigos Pablo y Angie, infinitas gracias por todos los momentos que pasamos juntos, por las risas, las borracheras, esos momentos que están guardados en mi corazón, Pablo muchas gracias por presentarme a tu familia, por sentirme parte de ella, por las veces que bailamos en Atlixco, de los mejores momentos que he pasado en mi vida.

A mis amigos del CIAD y CIDEA; Gaby, muchas gracias por compartir tiempo contigo, gracias por ser mi compañera en Pachuca y en Sonora, hacíamos un buen team. A Abel, gracias por todo tu apoyo. A todas las personas que conocí en Sonora, yo sé que son muchas y les ofrezco una disculpa por no nombrarlos a todos. Michelle, Sharon, Hector, Emmanuel, Rosina, Adi.

A la señora Lucy, por esas pláticas *in English* y en español tan interesante que teníamos, muchas gracias por interesarse en ayudar a los demás, aún sin conocerme, es usted una de estas personas que vale la pena ser recordada por siempre.

A mis amigos del W-104, aunque siempre estuve intermitente en ese lab, en algún momento ustedes fueron parte de mi familia, muchas gracias por todas las experiencias que tuvimos juntos, por los viajes, por la ayuda que necesite en algún momento, por escucharme. Vicky, Miguel, Jorge, Bris, Neko, Nemi, Emmanuel, Facundo, Jaz.

A mis compañeros del W-103, Liz, Paula, Sinaí, Víctor, gracias por todos esos momentos que compartimos juntos en la UAM.

A mí, por convertirme en el ser humano que siempre deseaba ser.

A la vida por bendecirme tanto, por conocer personas tan hermosas en mi vida, por permitirme estudiar en donde quería, por permitirme viajar por el mundo, por dejarme maravillarme con libros y películas, por permitir dejar un legado en las personas con las que convivo, infinitas gracias.

Si por alguna razón omito a alguna persona, les ofrezco una sincera disculpa.

A dios por darme este regalo que se llama: Vida.

RESUMEN:

Bacillus thuringiensis (Bt) es el microorganismo más utilizado para combatir plagas agrícolas, debido que durante su esporulación produce proteínas Cry con actividad entomo-patógena; por esto, se han desarrollado estrategias para optimar su producción a nivel industrial. Los métodos más populares para la producción de Bt son las fermentaciones en estado sólido y líquido. Diversos autores han reportado una mayor producción de esporas en cultivo sólido en comparación con el cultivo líquido; sin embargo, se manejan diferentes condiciones y unidades de productividad entre ambos sistemas, por lo cual se complica su comparación. La hipótesis de trabajo es que la diferenciación –la generación de subpoblaciones de células especializadas –en las poblaciones de Bt podría estar asociada a las variaciones observadas en la producción de esporas en ambos tipos de cultivo. Para probar esta hipótesis, generamos un sistema experimental para evaluación de la diferenciación de Bt a nivel de células individuales. Se generaron 6 cepas reporteras a través de fusiones con la proteína verde fluorescente: para los genes de esporulación *spoIIA* y *sspB*; para los genes de formación de bio-película *sinI* y *sipW*; para el gen de virulencia *cryIAc*; y para el gen de necrotrofismo *nprA*. Estas cepas fueron cultivadas en medio líquido y con agar, encontrando que el estado físico del medio no afectó la eficiencia de esporulación. De igual manera, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células que expresan los genes de diferenciación en ambos sistemas de cultivo. Sin embargo, se demostró que, en cultivo superficial, existe una mayor heterogeneidad de estos genes de esporulación, virulencia y necrotrofismo, mientras que su expresión en medio líquido es más coordinada y homogénea. Estas transformantes son un recurso valioso para el estudio de la diferenciación en Bt, un fenómeno poco estudiado; además, son útiles para evaluar el efecto de condiciones medioambientales sobre la cantidad y calidad de biomasa en fermentaciones controladas, en relación con la expresión de genes de diferenciación.

ABSTRACT:

Bacillus thuringiensis (Bt) is one of the most widely used microorganisms in agriculture due to its ability to synthesize Cry proteins with entomopathogenic activity during sporulation; for this reason, many research efforts have been conducted to improve the yields in industrial production. Bt is commonly produced by liquid fermentation and solid state fermentation. It has been proposed that spore yields are higher in solid state fermentation in comparison with liquid culture; however, it is difficult to directly compare data from both systems, as they are often generated in diverse conditions and different units. We hypothesize that differentiation –the generation of subpopulations of specialized cells –in the populations of Bt could be related to variations in spore production between liquid and solid fermentations. To test this hypothesis, we generated an experimental system to evaluate differentiation of Bt at the single cell level. We created six reporter strains carrying transcriptional fusions of target promoters with the Green Fluorescent Protein (GFP): two for the sporulation genes *spoIIA* and *sspB*; two for biofilm formation genes *sinI* and *sipW*; one for the virulence gene *cryIAc*; and one for the necrotrophism gene *nprA*. When these strains were grown in both liquid culture and surface agar culture, we found no differences in sporulation efficiency due to the physical state of the media. Likewise, we found no acute differences between both systems when we evaluated the percentage of cells expressing GFP, using the differentiation reporter strains. Nonetheless, our data revealed higher heterogeneity in the expression of sporulation, virulence and necrotrophism genes when Bt is grown in agar surface culture; this contrasted with a more coordinated and homogeneous gene expression in liquid medium. This set of reporter strains could be useful to understand the largely understudied phenomenon of differentiation in Bt; they will also serve to evaluate how environmental conditions affect quality and quantity of the biomass in controlled fermentations, and its relation to the expression of differentiation genes.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Plagas agrícolas y control biológico.....	1
1.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt)	2
1.2.1. Fermentación de Bt	4
1.2.2. Entomotoxicidad de Bt.....	5
1.3. Producción de Bt, esporas y proteínas Cry a nivel industrial	7
1.4. Fermentación en estado sólido y líquido para la producción de Cry	8
1.5. Diferenciación en bacterias.....	9
1.5.1. Diferenciación en <i>Bacillus</i>	10
1.5.2. Esporulación	10
1.5.3. Regulación de la esporulación en <i>Bacillus</i>	11
1.5.4. Necrotrofismo en Bt.....	14
1.5.5. Formación de la bio-película	15
1.6. Fusiones transcripcionales: Herramientas para el estudio de la diferenciación en cultivos bacterianos.....	16
1.6.1. Genes indicadores de la diferenciación: Esporulación, virulencia, bio-película y necrotrofismo.....	17
2. ANTECEDENTES DIRECTOS DE ESTA INVESTIGACIÓN	19
3. JUSTIFICACIÓN Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	20
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVOS.....	23
General.....	23
Específicos	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
6.1. Cepas, plásmidos y medios de cultivos	24
6.2. Selección de genes de interés para este estudio	25
6.2.1. Diseño de oligonucleótidos e identificación de las regiones promotoras de genes de esporulación, virulencia, necrotrofismo y constitutivo.	26
6.3. Manipulación de ADN	27
6.4. Construcción de fusiones transcripcionales y generación de cepas reporteras	29
6.5. Transformación de ADN	32

6.6.	Verificación de la fluorescencia por medio del microscopio de fluorescencia.....	33
6.7.	Cinéticas de crecimiento y esporulación.....	33
6.6.1.	Preinóculos para cultivos superficiales y líquido.....	34
6.6.2.	Cinéticas en cultivo líquido	34
6.6.3.	Cinéticas en cultivo superficial.....	34
6.7.4.	Crecimiento y esporulación.....	36
6.8.	Análisis por citometría de flujo	36
6.9.	Análisis estadístico	37
7.	RESULTADOS	38
7.1.	Construcción de fusiones transcripcionales.....	38
7.2.	Secuenciación de las fusiones transcripcionales.....	43
7.3.	Verificación de la fluorescencia en cepas transformadas en Bt-HD73	44
7.4.	Cinéticas de crecimiento y esporulación.....	46
7.4.1.	Cultivo líquido	46
7.4.2.	Cultivo superficial.....	49
7.5.	Expresión de genes de diferenciación.....	52
8.	DISCUSIÓN.....	61
9.	CONCLUSIONES	69
10.	RECOMENDACIONES	70
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	71
12.	ANEXOS	82
12.1.	Medios de cultivos y solución amortiguadora (Anexo 1).....	82
12.2.	Secuencias (Anexo 2).....	83
	P_{spollA} 'gfp.....	83
	P_{sipw} 'gfp	86
	P_{sspB} 'gfp	89
	P_{sinI} 'gfp	92
	P_{spac}	95

1. INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis es uno de los microorganismos con mayor aplicación en el control biológico de plagas agrícolas. Esto se debe a que, durante la esporulación, produce un cristal para-esporal con propiedades entomo-patógenas. Por lo tanto, preparaciones de esporas y cristales de Bt son utilizados en formulaciones como insumos agrícolas bio-insecticidas. Con esta finalidad, se han desarrollado diferentes estrategias de cultivo para la producción de esta bacteria, esporas y cristales insecticidas Cry. Sin embargo, su producción se ve limitada por el poco conocimiento existente acerca de los mecanismos de regulación de la expresión genética de la esporulación; así como, de otros procesos como: el desarrollo conjunto del necrotrofismo, la formación del cristal entomopatógeno y la producción de matriz extracelular que compone al bio-película. En este estudio, proponemos la selección de genes como indicadores para la generación de cepas fluorescentes reporteras, que nos permitan estudiar, a nivel de células individuales los procesos de diferenciación en Bt en diferentes sistemas de cultivo.

1.1. Plagas agrícolas y control biológico

Una plaga agrícola se define como una población de una misma especie que, al superar los índices de peligrosidad, causan daños económicos en las cultivos o cosechas (Carrero, 1996). Las plagas de mayor impacto a nivel mundial son langostas, orugas, moscas de la fruta, roya del trigo etc., que afectan a cultivos como el trigo, arroz, caña y maíz (Carrero, 1996). Para contrarrestar los efectos nocivos en las cosechas, la alternativa más usada son los pesticidas de origen químico, desarrollados principalmente en la segunda mitad del siglo XX, durante la llamada Revolución Verde, cuando se intensificó la producción agrícola con nuevas semillas, mecanización y uso de plaguicidas. Sin embargo, con el tiempo las plagas han generado resistencia a los pesticidas, y además, se observan resultados erráticos en la efectividad de estos, ya

que algunos tienen poca especificidad a sus insectos blancos y pueden generar daños irreversibles hacia otras poblaciones como el microbioma del suelo e incluso al ser humano. Aunado a esto, los costos de desarrollo para dichos productos químicos han ido en aumento en las últimas décadas (Borel, 2017).

En vista de los problemas que presenta el uso de pesticidas químicos, el control biológico es una alternativa para el control de ciertos organismos plaga. Principalmente, porque cumple con las funciones de regularlos y controlarlos, utilizando organismos antagonistas o sus productos naturales y además, es un método que no genera daño al medio ambiente. Entre los microorganismos que se utilizan destacan *Trichoderma*, *Beauveria* y Bt (Mazid et al. 2011); siendo Bt el microorganismo más utilizado desde hace la última década para el control de dípteros y lepidópteros (Jouzani et al. 2017).

1.2. *Bacillus thuringiensis* (Bt)

Bt es una bacteria Gram (+), aerobia estricta, mesófila perteneciente al grupo *Bacillus cereus*, por lo cual está relacionada filogenéticamente con los patógenos de humanos *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis* perteneciente al filo de bacterias firmicutes (Helgason, et al. 2000). Las bacterias del filo firmicutes se distinguen por su capacidad de formar esporas que las hace resistentes a condiciones ambientales extremas: desecación, radiación UV, falta de nutrientes etc. Cabe señalar que el género *Bacillus* ha sido el modelo para el estudio bioquímico, morfológico y genético de la esporulación (Hutchison et al. 2014).

Las esporas que se generan en el proceso de diferenciación celular en el género *Bacillus* son capaces de vivir por tiempo prolongados y pueden convertirse en células vegetativas cuando detectan (censan) nutrientes disponibles en el medio. Si bien, las esporas no tienen un metabolismo activo, tienen importancia en la salud humana porque pueden ser el origen de contaminaciones de los alimentos, como sería el caso de *Bacillus anthracis* y *Bacillus cereus* (Setlow, 2006; Checinska, 2015).

La resistencia intrínseca a los factores ambientales extremos se le atribuye a las pequeñas proteínas solubles en ácido de la espora (SASP, por sus siglas en inglés) que se unen al ADN y lo protegen de la radiación UV, la desecación y el calor seco. Conjuntamente con las proteínas que forman parte del exosporio, una fina cutícula cubierta por proteína, lípidos y polisacáridos le confiere gran resistencia a enzimas proteolíticas.

A Bt se le diferencia de los grupos *B. cereus* y *B. anthracis* por producir un cuerpo para-esporal de naturaleza proteica conocido como proteína Cry que tiene propiedades insecticidas (Soberón y Bravo, 2008). Además, Bt parece controlar la esporulación y la producción de proteínas Cry, a través de sistemas sofisticados de comunicación celular que involucran producción, detección y respuesta a péptidos de señalización. En los cultivos bacterianos, la concentración de estos péptidos aumenta de acuerdo a la densidad poblacional, lo que le permite adquirir información con sus células vecinas y coordinar la expresión de genes para así poder afrontar las contingencias del ambiente (Miller et al. 2001; Waters et al. 2005). Estos sistemas de comunicación celular son conocidos como *Quorum Sensing* (QS) (Rutherford et al. 2012) (Fig. 1).

En los últimos años, Bt se ha utilizado como modelo para el estudio del sistema QS ya que varios genes relacionados con la virulencia o la esporulación, tienen regulación del tipo QS (Rocha et al. 2010; Rocha et al. 2012; Slamti et al. 2014; Cabrera et al. 2014; Cabrera et al. 2016; Gastélum et al. 2020; Dubois et al. 2019; Verdugo et al. 2020).

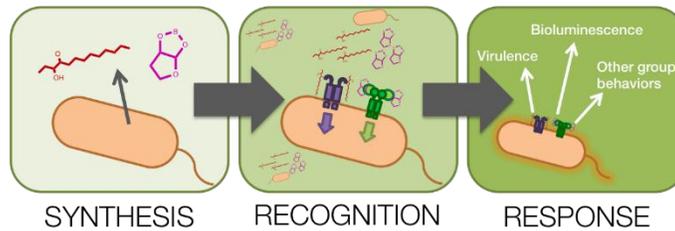


Figura. 1. Quorum sensing. Las bacterias sintetizan y secretan autoinductores (en *Bt* son péptidos), Esto se traduce en cambios transcripcionales y traduccionales y que repercuten en cambios funcionales como la formación de bio-película, esporulación competencia etc. Tomado de: <https://sites.tufts.edu/quorumsensing/quorumsensing101/>

1.2.1. Fermentación de *Bt*

La producción industrial de biomasa de *Bt* es comúnmente realizada por fermentación líquida sumergida, en medios de composición compleja (El-Bendary, 2006). Al seguir el crecimiento de *Bt* durante una fermentación en medio líquido, se obtiene una cinética de crecimiento en la que se reconocen cuatro fases: fase de latencia (F_L), fase de duplicación o exponencial (F_D), fase de transición (F_T) y fase de esporulación (F_E) (Dinorín, 2015). En las condiciones más comúnmente utilizadas, la fase de latencia, F_L , es muy breve y la fase exponencial, F_V , tiene una duración de 30-90 minutos dependiendo de las condiciones del cultivo. La duplicación se produce por la bipartición periódica de la mayor parte de las células. El análisis del transcriptoma de *B. subtilis* ha mostrado grandes cambios en la regulación de grupos de genes que indican la importancia de las transiciones entre las citadas fases (Blom et al. 2011).

Es común modelar al crecimiento de la población por la ecuación logística o de Verhulst

$$\frac{dN}{dt} = \mu \left[1 - \frac{N}{N_{max}} \right] N$$

El valor máximo de la tasa, dN/dt , se alcanza cuando $N = N_{max}/2$ y para entonces se cumple la relación siguiente:

$$\frac{dN}{dt} = \mu \left[1 - \frac{N_{max}/2}{N_{max}} \right] \frac{N_{max}}{2} = \mu \frac{N_{max}}{4}$$

Usualmente se reconoce como fase de crecimiento vegetativo, F_V , (García et al. 2017) cuando las células tienen una tasa específica de crecimiento casi fija en el intervalo, $N_0 < N < N_{max}/2$, pues cumplen con la relación lineal entre el logaritmo del número de las células, $\ln(N)$, con el incremento del tiempo, dt .

$$\frac{1}{N} dN = \ln(N) \approx \mu dt$$

Asimismo, F_V , se ha denominado de crecimiento balanceado porque en ella se ha observa una proporción fija entre la cantidad celular de: proteína, ADN y ARN (Schaechter et al., 1958; Maaløe y Kjeldgaard, 1966; Jun et al. 2018).

Después de que se alcanza la máxima tasa de crecimiento se observa una disminución del crecimiento y Bt expresa genes que le permiten utilizar las fuentes alternativas de nutrientes disponibles (López-y-López y de la Torre, 2005). Finalmente, la F_E incluye el programa de diferenciación celular de bacteria a espora. La F_E tiene una duración de al menos ocho horas.

Esta breve revisión del ciclo de crecimiento bacteriano apoya la idea de la expresión diferencial de genes regulatorios en algunas de las transiciones de ese ciclo y justifica la búsqueda de marcadores genéticos que permitan correlacionar la expresión de algunos genes regulatorios con la fisiología del crecimiento, medido por los cambios en la población celular, con los cambios metabólicos que se puedan medir por medio del consumo del sustrato y de las tasas respiratorias.

1.2.2. Entomotoxicidad de Bt

Una de las principales características de Bt es su capacidad entomopatógena. Por eso, las formulaciones que contienen esporas, proteína Cry y células vegetativas se usan para combatir plagas agrícolas. Durante la esporulación, Bt produce inclusiones paraesporales (delta- endotoxinas), conocidas como proteínas Cry, con actividad

entomopatógena (Agaisse y Lereclus 1994; Aronson 2002; Soberón et al. 2007). Dichas proteínas están clasificadas de acuerdo a su secuencia de aminoácidos y por el análisis de más de 500 secuencias se han establecido 67 grupos (CryI-Cry67) (Crickmore et al. 2010) que, a su vez, se han dividido en muchas subclases de acuerdo similitudes estructurales y del espectro insecticida de cada proteína (Höfte y Whiteley, 1989). Además de la proteína Cry, existen otros factores importantes como el regulador transcripcional PlcR que es dependiente de QS, y activa una gran cantidad de proteínas como fosfolipasas, enterotoxinas, hemolisinas y proteínas de la superficie celular que le dan la capacidad a estos microorganismos de ser virulentos contra el organismo hospedero (Agaisse et al. 2001; Slamti et al. 2014). Las esporas son otro factor importante en la virulencia de Bt que pueden germinar en el cadáver de sus hospederos, liberando enzimas líticas. De ese modo, las esporas pueden germinar dentro del cadáver del insecto y así aseguran la propagación de Bt en el ambiente circundante. *Bacillus thuringiensis* serovar *Kurstaki* HD73 (Bt-HD73) es una de las cepas de Bt más utilizadas en investigación y biotecnología. Su proteína Cry está codificada por el gen *CryIAc* y se ha demostrado que está íntimamente relacionado con la esporulación y la fase estacionaria (Deng et al. 2014).

1.2.2.1. Mecanismo de acción de la proteína Cry

En diversos estudios se ha demostrado que la presencia del cristal para-esporal es importante para la actividad entomopatógena de Bt. El modelo más estudiado como mecanismo de acción citotóxica de la proteína Cry está relacionado con la formación de poros en la membrana plasmática en células epiteliales del sistema digestivo de larvas de insectos (Soberón y Bravo 2008). Esto sucede por medio de una unión secuencial y daños en el balance osmótico de la célula, según se describe a continuación. Las proteínas Cry son ingeridas por las larvas y posteriormente solubilizadas en su sistema digestivo; esta solubilización depende del pH del intestino medio del insecto que suele ser altamente alcalino (Dow, 1996). Una vez solubilizadas las toxinas son procesadas proteolíticamente por enzimas digestivas, que conducen a su activación; posteriormente la toxina activa se une a un receptor de caderina que se

encuentra en la membrana apical del intestino de los insectos blanco; después, la proteína Cry se une a receptores N-aminopeptidasas, lo cual origina la oligomerización de la proteína generando un pre-poro; finalmente se forma un poro en las balsas lipídicas de la membrana del intestino (Melo et al. 2014; Pacheco et al. 2009). El poro generado en la membrana daña la integridad de la misma y conlleva a la muerte del insecto al provocar un desequilibrio osmótico (Dorch *et al.*, 2002; Soberón y Bravo 2008). La actividad entomopatógena de las proteínas Cry, le permite a Bt matar a su hospedero, para alimentarse de su cadáver y después, las esporas presentes en el hospedero puedan germinar de nuevo, a fin de completar el ciclo de vida esta bacteria.

1.3. Producción de Bt, esporas y proteínas Cry a nivel industrial

Puesto que Bt no ocasiona ningún daño al medio ambiente y puede controlar diversas plagas de la agricultura, se han generado investigaciones para la optimización de la producción de esporas, proteínas Cry y células vegetativas. Las cepas de Bt son fáciles de cultivar puesto que requieren fuentes de carbono de fácil asimilación para su desarrollo (Foda *et al.*, 1985) por ejemplo: glucosa, fructosa, maltosa, ribosa, etc. (Nickerson y Bulla, 1974; Arcas et al. 1984; Foda et al. 1985 y Scherrer et al. 1973). Estas fuentes de carbono pueden ser obtenidas a partir de materias primas de bajo costo como melaza, salvado de trigo y harina de soya (El-Bendary, 1999), y por lo tanto se han desarrollado medios de bajo costo (Devi et al. 2005). Con respecto a la fuente de nitrógeno para síntesis de proteínas, se ha demostrado la incapacidad de algunas cepas de Bt de crecer en medios de cultivo con fuentes inorgánicas de nitrógeno; sin embargo, su crecimiento suele ser bastante favorable cuando se le añaden los aminoácidos: glutamato, aspartato, valina, serina o treonina (Nickerson y Bulla 1974; Anderson y Jayaraman, 2003). Con relación a los metales iónicos, se ha demostrado que los iones Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{2+} son esenciales para obtener altos títulos de esporulación y proteínas Cry en Bt (Faloci et al, 1986; Icggen et al., 2002b). Por otra parte, una fuente nutricional fundamental es la adición de fosfato al medio de cultivo, para obtener altos títulos de la proteína Cry (Wakisaka *et al.*, 1982; El-Bendary, 1999). La temperatura normal para el crecimiento y producción de la toxina en Bt es

30 °C y un pH en un rango de 5.5-8.5 según Ozkan (2003). Por último, el nivel de aireación es determinante para la obtención de altos títulos de proteína Cry. Foda et al. (1985) demostraron que Bt presenta problemas de crecimiento y esporulación a bajos niveles de aireación; por tal motivo, la mayoría de las fermentaciones líquidas son realizadas con altas tasas de aireación, ya que se ha demostrado que la cantidad de esporas obtenidas en un fermentador agitado es proporcional al coeficiente de transferencia de oxígeno (Razo et al. 1997).

1.4. Fermentación en estado sólido y líquido para la producción de Cry

Existen dos métodos por los cuales se pueden producir Bt a nivel industrial: La fermentación en estado líquido (FEL) y en estado sólido (FES) (El-Bendary, 1999). La FEL consiste en un proceso microbiano en la cual la biomasa se encuentra completamente rodeada por el medio de cultivo (Viniegra, 2003). En contraste la FES es un cultivo utilizado para microorganismos aerobios dentro de una cama de soporte sólido, con una porosidad superior al 50% (Viniegra et al. 2014). Esta definición también incluye la definición de Pandey (2013): “fermentación que involucra sólidos en la ausencia (o casi ausencia) de agua libre, pero con suficiente humedad para sostener el crecimiento y metabolismo microbiano”. Los principales contrastes entre ambos sistemas están definidos por sus características físico-químicas y diferencias entre las dos formas de fermentación tales como a) mezclado de sustratos y productos mucho menor en FES; b) solubilidad y difusión del oxígeno y otros gases no polares mayor en FES (debido a la porosidad del sustrato); c) conducción del calor mucho menor en FES; d) contenido de agua menor en FES; e) mayor producción de metabolitos de interés industrial en FES (Acuña et al, 1995; Barrios et al,1988). Experimentos realizados en nuestro laboratorio (Lima et al. 2019) y en otros grupos de investigación (Robinson et al. 2001) indican que se han obtenido títulos superiores de esporas y proteína Cry en medio sólido (usando como sustrato salvado de trigo) en comparación con medio líquido (Devi *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2008). Sin embargo, poco se conoce sobre las diferencias en la regulación genética asociadas a lo que se observa a nivel fisiológico

en los dos sistemas de producción. De hecho, no se ha generado herramientas precisas para evaluar los mecanismos de regulación de la esporulación de Bt en medios sólidos destinados a la producción industrial de este microorganismo. En especial, no se han realizado estudios comparativos del crecimiento y esporulación de Bt en cultivos sumergidos o sobre sustratos sólidos en los que las posibles diferencias fisiológicas puedan relacionarse con la transcripción de los genes reguladores de las distintas etapas del cultivo. Estas consideraciones serán discutidas con mayor detalle en el planteamiento y justificación de esta investigación.

1.5. Diferenciación en bacterias

La diferenciación bacteriana consiste en la aparición de células especializadas dentro de una población. Para esto, los microorganismos llevan a cabo un cambio en su expresión genética para generar subpoblaciones con funciones especializadas; por ejemplo, formadoras de bio-película, motiles, esporuladas, etc. Estos fenómenos son una posible causa de las diferencias entre diferentes tipos de cultivo.

Durante muchos años las bacterias fueron vistas como organismos simples que participaban en procesos biogeoquímicos en la tierra y en algunos casos sólo destinados a la producción de algún metabolito de interés industrial. Sin embargo, esta visión ha ido cambiando; uno de los primeros microorganismos en ser un modelo para estudiar la diferenciación celular fue la cianobacteria *Anabaena* sp., con capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica. Además de llevar a cabo la fotosíntesis, *Anabaena* puede fijar nitrógeno atmosférico; esto se debe a que puede diferenciarse en heterocistos a partir de las células vegetativas. Las células vegetativas se encargan de llevar a cabo la fotosíntesis, pero cuando existe un ambiente bajo en nitrógeno, se producen células especializadas en la fijación de nitrógeno (Muro et al. 2017; Zhang et al. 2005 y Shapiro, 1988). Otra bacteria que ha sido utilizada como modelo para el estudio de diferenciación son las proteobacterias del género *Myxococcus* las cuales, con la falta de nutrientes pueden diferenciarse en cuerpos fructíferos, teniendo células vegetativas en la periferia y esporas dentro (O'Connor, y Zusman, 1991). Además,

cuando la población se encuentra sobre un soporte sólido, estas bacterias se mueven como se si fueran una entidad colectiva única o enjambre (*swarm*), es decir, sus movimientos son ampliamente coordinados entre sí. Durante este movimiento, se secretan enzimas líticas y compuestos antimicrobianos para alimentarse de otras bacterias que se encuentren en el medio circundante. Por eso, la diferenciación en *Myxococcus*, es uno de los modelos más fascinantes para el estudio de la coordinación y generación de células especializadas que son diferentes metabólicamente, funcional y morfológicamente (Hoiczyk et al. 2009; Shapiro, 1988). Para que se lleve a cabo una correcta regulación de la diferenciación en la población, las bacterias tienen que llevar a cabo un cambio en la expresión de sus genes, especialmente en la actividad de los reguladores transcripcionales. Para detectar estos fenómenos a nivel poblacional o celular, se utilizan herramientas moleculares como proteínas fluorescentes, entre otras (Lindow, 1995; Silhavy et al. 2000). Entre los beneficios de la diferenciación en una población de bacterias, destaca la eficiente proliferación o supervivencia de los microorganismos. Además, estas pueden mejorar el consumo de sustratos al diferenciarse en distintos tipos de células que tienen diferentes procesos metabólicos al mismo tiempo, pero no en las mismas células.

1.5.1. Diferenciación en *Bacillus*

Bacillus subtilis (Bs) es el microorganismo más utilizado para el estudio de la diferenciación en bacterias Gram-positivas. Esto se debe a su capacidad para generar células especializadas en función de las condiciones ambientales que las rodea. En una población de Bs pueden coexistir células: competentes (con capacidad de tomar ADN del medio), productoras de matriz extracelular (bio-película), móviles, caníbales y formadoras de esporas (López et al 2008).

1.5.2. Esporulación

La esporulación en Bs ha sido ampliamente estudiada como un modelo de diferenciación celular. Cuando existe algún tipo de estrés en el medio Bs puede

diferenciarse en esporas a partir de células vegetativas; las esporas son mucho más resistentes a la radiación, falta de nutrientes, etc. La espora es una forma de resistencia y propagación y, generalmente se le considera como un agente infeccioso potente en algunas cepas del género *Bacillus* y en algunas Gram-negativas.

1.5.3. Regulación de la esporulación en *Bacillus*

El inicio de la esporulación depende de la detección de señales de estrés por medio de un sistema llamado fosforelevo, que consiste en enzimas cinasas, proteínas fosforilables y fosfatasas reguladoras (Fig. 2) (Phillips y Strauch, 2002). Las señales de estrés son detectadas por histidinas cinasas (Kin A, B, C, D y E), las cuales generan una respuesta a proteínas fosforilables. Las cinasas detectan cambios que son responsables de iniciar la cascada de fosforilación; Spo0F es la proteína objetivo de la actividad de las cinasas, además funciona como un tipo de segundo mensajero. Después, Spo0F transfiere el grupo fosfato a Spo0B y finalmente al factor de transcripción Spo0A (Fig. 2). El resultado crucial de este sistema de transducción de señales es la fosforilación del factor de transcripción de Spo0A. Spo0A~P modifica globalmente la expresión genética de la célula, debido a que en su forma fosforilada activa la transcripción de genes en la fase de transición, uniéndose a diversos sitios en las regiones promotoras de estos genes (Baldus et al., 1994; Strauch et al., 1990). La presencia de bajos niveles de Spo0A~P, regula negativamente la transcripción del gen *AbrB*, que codifica una proteína represora de la expresión de genes involucrados en la esporulación, producción de antibióticos etc. (Roberson et al. 1989). Cuando Spo0A~P alcanza altos niveles de concentración, reprime genes de crecimiento vegetativo y activa genes de esporulación, entre otros fenómenos de diferenciación como la formación de bio-película (Phillips y Strauch, 2002,).

El uso de proteínas intermediarias (Spo0F y Spo0B) implica, principalmente la adición de módulos de regulación al fosfo-relevo. Ejemplo de ellos son las fosfatasas Rap A, B y C, las cuales son capaces de defosforilar a Spo0F~P. Las proteínas Rap son reguladores de tipo Quorum Sensing, y su actividad está regulada por pequeños

péptidos (Phr) que resultan de un procesamiento proteolítico que se origina durante un ciclo de secreción y reinternalización de las bacterias. Estos péptidos se pueden considerar como feromonas que se acumulan en alta concentración celular (Miller y Bassler 2001).

El activador transcripcional Spo0A~P lleva a cabo la activación de los operones: *spoIIA* y *SpoIIIG* que son los encargados de la adecuada formación del septo asimétrico en la espora (Losick y Stragier, 1992) (Figura 2). Comúnmente, la expresión de *spoIIA*, se usa como indicador del inicio de la esporulación y de la fosforilación de Spo0A. Los operones mencionados anteriormente dividen a la bacteria en compartimentos de tamaño desigual: la pre-espora y la célula madre. Este proceso es irreversible y a partir de este punto, sucede una cascada de expresión diferenciada entre ambos compartimientos (Figura 3). Después de la formación del septo de la espora, dos factores sigma son sintetizados en formas inactivas para estar presentes, ya sea en la célula madre o en la pre-espora. En su forma activa, originan una cascada temporal de factores sigma sujeto de una regulación entrecruzada (Losick y Stragier, 1992). Finalmente, los factores sigma K y G son los responsables de la expresión de genes necesarios para el ensamblaje, maduración y liberación de la espora. Ejemplo de estos genes, son las proteínas que están codificadas por el operón *ssp* que se sintetiza únicamente en las endoesporas de los bacilos esporulados (pre-espora) (Setlow, 1998; Vlamakis, 2008 y Moir, 2016), y su expresión indica que el proceso de esporulación está en la fase final.

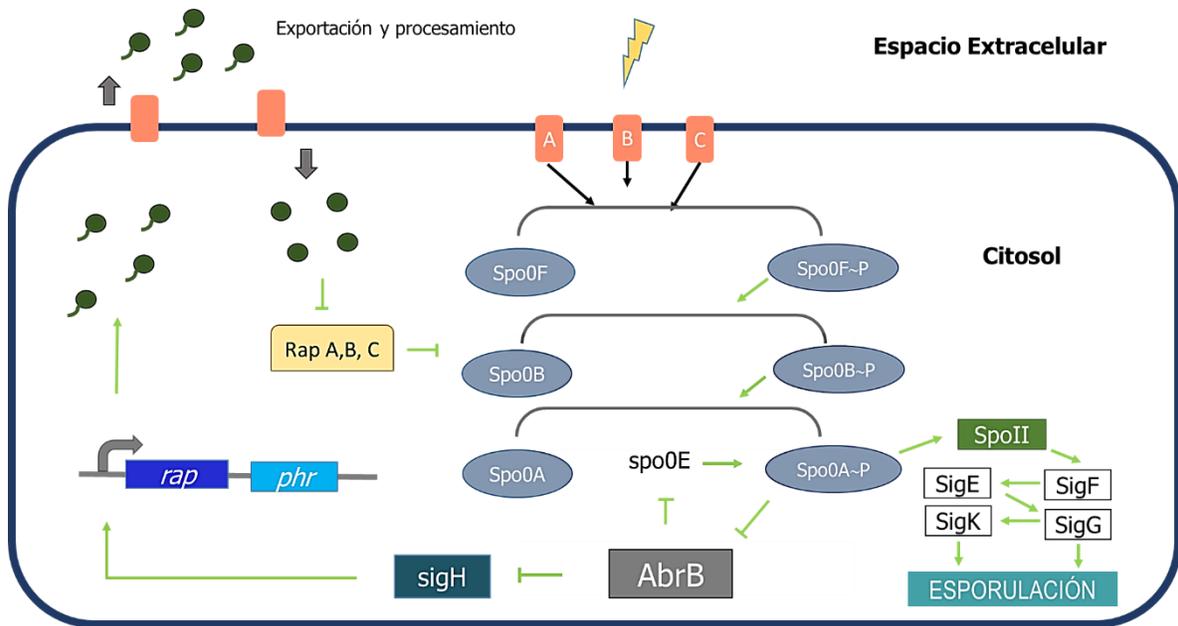


Figura. 2. Regulación del inicio de esporulación por el fosforelevo de Spo0A en *Bs*. Las cinasas (A, B, C) detectan señales de estrés del medio ambiente. El receptor final spo0A. El operón *spoIIA*, genera una cascada de factores sigma que culmina con la esporulación. Spo0A es regulado por Spo0E que es una fosfatasa y regula la esporulación a tiempos adecuados. AbrB es un antirepresor del factor sigma H (SigH). Cuando SigH está activado, inicia la transcripción de las proteínas Rap que son fosfatasas y regulan al fosforelevo. Al mismo tiempo se transcribe los péptidos de señalización (Phr) que son exportados y procesados proteolíticamente y después importados al citosol. Los Phr se unen con las Raps inhibiendo su actividad fosfatasa (Perego, 2013; Ohlsen et al. 1994).

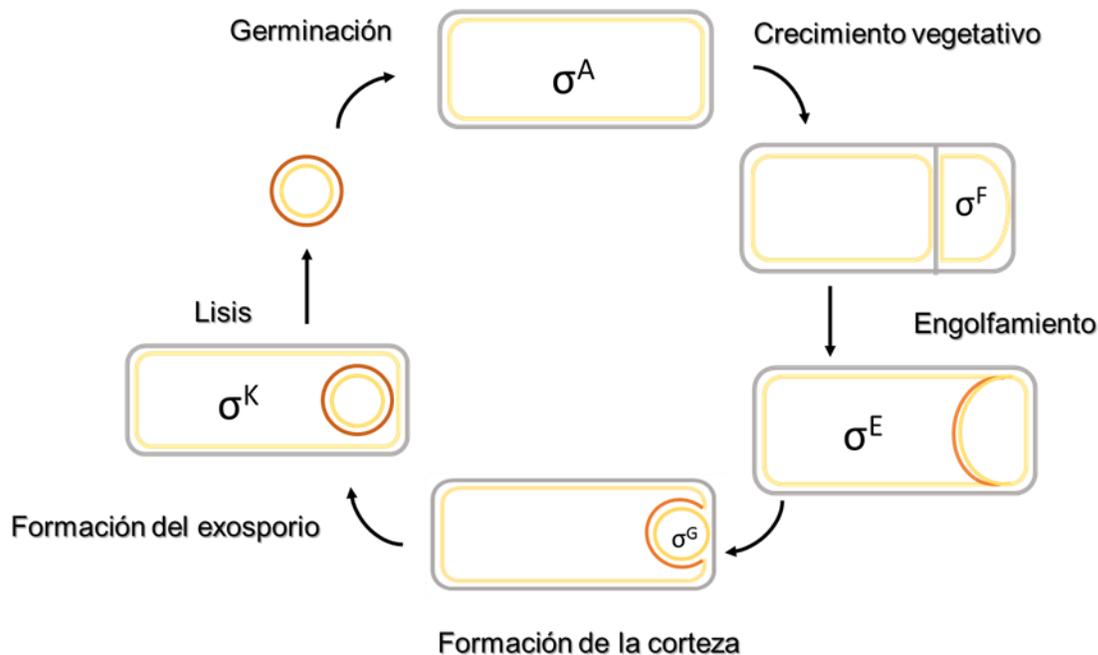


Figura.3 Regulación de los factores de transcripción en la célula madre e hija durante la esporulación de *Bs*. Durante el crecimiento vegetativo se expresa principalmente el factor sigma A. El factor sigma F en la pre-espora durante la fase de esporulación. El factor sigma E que activa a genes para la formación de la corteza y la resistencia a la lisozima en la espora y para la degradación del peptidoglucano en la pre-espora. El factor sigma G es sintetizado y este activa genes relacionados a la resistencia de la espora (radiación UV, calor, etc.) y la germinación (*gerA*, *gerB*). El factor sigma K activa genes relacionados con la liberación y maduración de la espora (Higgins y Dworkin 2012; Sella, et al. 2014; Errington, 1993; Gutiérrez et al. 2010).

1.5.4. Necrotrofismo en Bt

Los organismos necrotróficos son aquellos patógenos que tienen la capacidad de alimentarse de los cadáveres de sus hospederos. Estos generan moléculas tóxicas y enzimas líticas que descomponen las células de sus hospederos para liberar nutrientes que posteriormente utilizan como sustrato para su desarrollo (Van Kan, 2006). El necrotrofismo ha sido principalmente estudiado en hongos que se desarrollan en plantas en descomposición.

Bt es una bacteria necrotrófica, ya que puede alimentarse de los cadáveres de sus insectos hospederos (Slamti et al. 2014). La actividad necrotrófica de Bt está regulada por el sistema NprR-NprX, así como por varias proteínas Rap. NprR es un receptor de

tipo quórum sensing que funciona como activador transcripcional y depende de NprX (o NprRB) y de un péptido de señalización (Rocha et al. 2010). El complejo NprR-NprX puede activar la transcripción de más de 41 genes, ya que adopta una forma tetrámerica que le permite unirse a secuencias promotoras específicas de ADN. Por ejemplo, el gen *nprA* que es el gen que codifica a la proteasa neutra, es utilizado como indicador de la fase necrotrófica de Bt. Además, NprR regula la transcripción de genes involucrados en la formación de bio-película (Slamti et al. 2014) y regula el inicio de la esporulación (Cabrera et al. 2014). Además de NprR, 6 proteínas Rap de Bt regulan la producción de proteasas extracelulares, y por lo tanto son importantes para la regulación del desarrollo del necrotrofismo (Gastélum et al. 2020).

1.5.5. Formación de la bio-película

Aunque la fisiología bacteriana es normalmente estudiada utilizando medios líquidos con cultivos axénicos a nivel de laboratorio, en la naturaleza las bacterias se encuentran mayormente en bio-película (en las raíces de plantas, el tracto digestivo de animales, etc.) Una bio-película es una asociación de microorganismos que se adhieren entre ellos o sobre superficies. Su característica principal es la formación de una matriz extracelular de exo-polisacáridos, proteínas y ADN, que le confiere resistencia a factores de estrés en el medio, por ejemplo, a los antibióticos. Las bio-películas tienen importancia clínica ya que se pueden desarrollar en catéteres de pacientes en hospitales; además, pueden contaminar productos alimenticios e incluso mediar infecciones en plantas (Mielich y Lopez, 2015). En el laboratorio, una bio-película se puede formar en medio sólido (interface sólido-aire) mientras que una película se forma en el medio líquido sin agitar (interface líquido-aire). Una bio-película es un claro ejemplo donde ocurre una alta heterogeneidad en la expresión génica de una población bacteriana, ya que en ella pueden existir diferentes subpoblaciones que comprenden células móviles, esporuladas y formadoras de matriz extracelular, etc. (López, 2009).

La formación de bio-películas es un proceso que está altamente regulado en *Bs*. El activador transcripcional Spo0A~P es el encargado de regular la formación de la bio-película que durante el crecimiento planctónico se encuentra bloqueada por la presencia del represor SinR. La función de SinR es mantener reprimida durante la fase de crecimiento vegetativo la transcripción de 15 genes de los operones *eps* y *tapA-sipW-tas*, relacionados con la formación de exo-polisacáridos extracelulares y las proteínas estructurales del bio-película, respectivamente (Cairns et al.2014; Vlamakis et al, 2013). La represión transcripcional de SinR es atenuada por la proteína anti-represora SinI. SinI es activada por Spo0A~P y es capaz de unirse a SinR formando un heterodímero, de forma irreversible, permitiendo la transcripción de los genes relacionados con la formación del bio-película (Cairns et al.2014; Vlamakis et al, 2013). La expresión del antirepresor SinI, o bien los genes de los operones *eps* y *tapA-sipW-tas* pueden ser utilizados como indicadores de la formación de bio-películas.

Cómo se mencionó anteriormente, la diferenciación en *Bacillus* es un proceso que tiene como fin la supervivencia y proliferación de los microorganismos, especialmente en condiciones adversas, por lo que las bacterias generan un cambio en su expresión genética convirtiéndose en caníbales, móviles, necrotróficas, etc. Cuando estos estadios de diferenciación fracasan, existe un último estado de diferenciación la esporulación. Todos estos tipos de células pueden coexistir en un bio-película.

1.6. Fusiones transcripcionales: Herramientas para el estudio de la diferenciación en cultivos bacterianos

La diferenciación de *Bt* conlleva cambios en su expresión genética que repercuten en su fisiología y ecología, tanto en la naturaleza como en fermentaciones controladas. Sin embargo, las herramientas tradicionales para el estudio de expresión genética y fisiología bacteriana a nivel poblacional no permiten detectar la expresión heterogénea y la aparición de subpoblaciones. Recientemente se han desarrollado herramientas genéticas para el estudio de subpoblaciones. Las fusiones transcripcionales consisten en el promotor de los genes de interés, dirigiendo la transcripción de un gen reportero

cuyo producto sea fácil de analizar a nivel de células individuales. Las fusiones transcripcionales son principalmente usadas para seguir el dinamismo celular asociados a su expresión génica y la actividad de los promotores, además, son herramientas cuantitativas que se pueden usar en diferentes condiciones. (e.g. medio sólido y líquido). La principal ventaja del uso de fusiones transcripcionales es la alta sensibilidad, conveniencia y confianza; un buen ejemplo de este tipo de gen reportero es la *gfp*, cuyo producto es la GFP (proteína verde fluorescente, por sus siglas en inglés), que puede ser detectado a nivel de células individuales por medio de citometría de flujo o microscopia de tipo confocal en preparaciones sólidas.

1.6.1. Genes indicadores de la diferenciación: Esporulación, virulencia, bio-película y necrotrofismo.

Como se describió en el párrafo anterior, las fusiones transcripcionales son herramientas adecuadas para medir la expresión de genes relacionados en la diferenciación de bacterias. El conocimiento que se tiene de genética y ecología de Bt permite la construcción de fusiones para detectar células especializadas (esporulación, bio-película, necrotrofismo y proteína Cry) dentro de una población, para medir la diferenciación en diferentes condiciones. Para detectar células que han entrado al proceso de esporulación, se ha utilizado el promotor del operón *spoIIA* que es activado directamente por Spo0A~P, y por lo tanto es un indicador del inicio de la esporulación, y del funcionamiento del fosforelevo. El gen *sspB* codifica para las proteínas SASP y se expresa en los últimos estadios de la esporulación (Fig. 3); por lo tanto, este gen sirve como indicador de los bacilos que llegan a formar esporas maduras. Para detectar subpoblaciones de células especializadas en la producción de componentes de la matriz extracelular para la formación de bio-película, se pueden elegir genes conocidos en Bs y conservados en Bt. Por un lado, la expresión del gen *sinI*, que es inhibidor del represor sinR, es un indicador de la derepresión de genes que codifican para componentes de la matriz extracelular (ME). Por otro lado, el gen

sipW, que codifica para la peptidasa que se encarga de eliminar el péptido señal de las proteínas que forman parte de ME, para después ser translocadas en el espacio extracelular. Por otro lado, nos interesa conocer las subpoblaciones de Bt que expresan genes importantes para la virulencia. En este sentido, las proteínas Cry son uno de los determinantes más importantes para la actividad entomopatógena de Bt. La expresión del gen Cry (*cryIAc*) puede ser un indicador de la capacidad entomopatógena que hay en la población. Finalmente, el necrotrofismo es uno de los fenómenos de diferenciación más estudiados en Bt (Dubois et al. 2012; Slamti et al. 2014 y Verplaetse et al. 2017). El gen que codifica para la proteasa neutra extracelular *nprA*, activado por el sistema de QS NprR-nprX, es un indicador de que las células están produciendo enzimas extracelulares líticas para el necrotrofismo.

2. ANTECEDENTES DIRECTOS DE ESTA INVESTIGACIÓN

Bt es el microorganismo más utilizado como biopesticida para el control de insectos plaga en cultivos agrícolas (Jouzani et al. 2017). Su producción a nivel industrial se lleva a cabo principalmente en fermentación en medio líquido. Sin embargo, algunos trabajos han mostrado que se pueden obtener altos rendimientos de esporas en bolsas de cultivo y medios sólidos basados en trigo y melazas (Devi et al. 2005; El-Bendary, 1999). Se ha propuesto que, la fermentación en estado sólido es una opción económicamente viable, debido al bajo costo de las materias primas y si se generan títulos elevados de esporas. En nuestro grupo de investigación, se han obtenido altos títulos de esporulación en medio sólido en comparación a medio líquido (1×10^9 esporas/mL vs 1×10^{10} esporas/g); sin embargo, aún se desconocen las bases moleculares y fisiológicas que sustentan estas observaciones. Los avances en la utilización de Bt como modelo de estudio para señalización y de determinación de la expresión genética durante la diferenciación celular (Rocha *et al.*, 2010; Verplaetse *et al.*, 2015) permite plantear estudios relacionados con los cambios producidos en la expresión genética que desencadena heterogeneidad fenotípica en una población de Bt cultivada en diferentes condiciones. Dichos estudios aplicados a superficie permitira explorar, a nivel molecular, las condiciones fisiológicas que son responsables de los diferentes niveles de esporulación en medio sólidos en comparación con los cultivos en medio líquidos.

3. JUSTIFICACIÓN Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

La prolongada acción residual de los insecticidas químicos, combinada a su toxicidad, ha provocado problemas de salud, de contaminación ambiental y la aparición de plagas con resistencia a estos insecticidas. En consecuencia, el control biológico es una alternativa viable en términos económicos y ambientalmente amigables en comparación con los insecticidas químicos (Carrero, 1996). Por esta razón se explica el interés por el uso de Bt para el combate a diversos insectos que actúan como plagas en la agricultura. Existen dos tecnologías de producción para este biopesticida: el medio líquido sumergido y el sólido, con títulos de esporas superiores en el segundo (Pérez-Solís, 2016). Sin embargo, los cambios a nivel molecular en la expresión de genes de esporulación en fermentaciones de Bt no son completamente conocidos, y su medición es complicada en medio sólido debido a que en estos sistemas se utilizan residuos agroindustriales complejos (i.e. salvado de trigo y melaza de caña). Desde hace varias décadas, existen técnicas moleculares que pueden solucionar este tipo de inconvenientes metodológicos; por ejemplo, las fusiones transcripcionales permiten generar cepas reporteras para medir expresión de genes a nivel poblacional o a nivel de células individuales. La combinación de herramientas moleculares, la ingeniería genética y un sistema de laboratorio para probar el efecto del estado físico del medio, podría generar información con indicios claros de como ocurre la diferenciación, y específicamente la esporulación en los cultivos sobre soportes sólidos. En base a dicha información, se podrían generar estrategias para acelerar la producción de esporas y proteína Cry en Bt. Finalmente, una de las aportaciones más grandes de este proyecto de investigación es que no existe ningún estudio con proteínas fluorescentes y bacterias reporteras en fermentación sobre superficies sólidas (cultivo superficial). El uso de proteínas fluorescentes, como reporteras de expresión, representan una herramienta que a futuro podría utilizarse en otras investigaciones para conocer a detalle como ocurre el proceso de diferenciación en células de Bt cultivadas diferentes condiciones, incluyendo sustratos sólidos. En la última década

este tipo de cultivos ha aumentado su popularidad en sistemas de producción industrial.

Pregunta de Investigación:

¿Cómo afecta el estado físico en dos sistemas de cultivo líquido y superficial, la expresión de genes de diferenciación, relacionados con esporulación, formación de bio-película, proteína Cry y necrotrofismo, en Bt?

4. HIPÓTESIS

La creación de cepas reporteras utilizando como proteína reportera GFP en los promotores de genes de diferenciación en la cepa Bt HD73, y su cuantificación a nivel de células individuales, permitirá evaluar el efecto del estado físico del medio cultivo sobre la aparición de subpoblaciones especializadas en: esporulación, formación de bio-película, necrotrofismo y virulencia.

5. OBJETIVOS

General

- ⇒ Evaluar la aparición de subpoblaciones de Bt en cultivo líquido y superficial cuantificando la expresión de genes de diferenciación mediante proteínas reporteras fluorescentes.

Específicos

- ⇒ Diseñar, construir y transformar plásmidos con fusiones transcripcionales de *gfp* para los genes: *spollA*, *sspB*, *sipW*, *sinI*, *cryIAC*, *nprA* y el promotor constitutivo *spac*.
- ⇒ Evaluar el crecimiento y esporulación de cepas transformadas en cultivo líquido y superficial.
- ⇒ Cuantificar la expresión de cada gen reportero en ambos sistemas de cultivo a nivel de células individuales.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cepas, plásmidos y medios de cultivos

Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la tabla 1. Para realizar este estudio se utilizó la cepa Bt-HD73, donada por el Dr. Jorge Eugenio Ibarra Rendón, investigador del CINVESTAV, Irapuato. Esta cepa se utilizó para evaluar la expresión de diversos genes de diferenciación. También se utilizó el ADN de esta cepa para amplificar los promotores de los genes de diferenciación. La cepa *Escherichia coli* ECE149 transformada con el plásmido pMutin-GFP+ confiere resistencia a ampicilina (Ap) (Kaltwasser et al. 2002) (Donada por el *Bacillus Genetic Stock Center* por sus siglas en inglés) fue utilizada para amplificar la región codificante de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés *Green Fluorescent Protein*). La bacteria *Escherichia coli* TOP10 se utilizó para la construcción y clonación de los plásmidos antes de ser transformadas en Bt-HD73. Los medios de cultivos utilizados fueron Medio Luria-Bertani (LB, 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura y 5 g/L NaCl), Caldo Nutritivo (CN) y Agar nutritivo (AN) (8 g/L caldo nutritivo y 15 g/L Agar), para el crecimiento de rutina de Bt-HD73 y *E. coli*, a 30 °C y 37 °C, respectivamente, a una agitación de 220 rpm. Para el crecimiento selectivo se utilizó ampicilina (100 µg mg⁻¹) o eritromicina (5 µg mg⁻¹) para *E. coli* y Bt-HD73, respectivamente en un matriz de 125 mL con 25 mL de LB.

Tabla 1. Cepas, características y plásmidos utilizado en este estudio.

Cepa	Descripción	Referencia
<i>Escherichia coli</i> ECE 149	Contiene el plásmido pMutin-GFP+. Ap ^R	(Kaltwasser et al. 2002)
<i>Escherichia coli</i> Top 10	Cepa utilizada para la clonación y construcción de plásmidos.	Invitrogen Cat. C404010
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki HD73	Cepa silvestre	Donada por el Dr. Jorge Ibarra del CINVESTAV-Irapuato. Número de acceso: NC_020238.1 .
Plásmidos	Descripción	Referencia
pHT315	Plásmido utilizado para la expresión de las fusiones transcripcional en Bt-HD73	(Arantes y Lereclus, 1991)
pHT315- <i>P_{spollA}'gfp</i>	Plásmido para evaluar la expresión de la esporulación en los primeros estadios.	Este estudio
pHT315- <i>P_{sspB}'gfp</i>	Plásmido para evaluar la expresión de la esporulación en los últimos estadios	Este estudio
pHT315- <i>P_{nprA}'gfp</i>	Plásmido para evaluar la expresión del necrotrofismo	Este estudio
pHT315- <i>P_{cryIAc}'gfp</i>	Plásmido para evaluar la expresión de la proteína CryIAc	Este estudio
pHT315- <i>P_{sinI}'gfp</i>	Plásmido para evaluar la expresión de genes de formación de bio-película	Este estudio
pHT315- <i>P_{sipW}'gfp</i>	Plásmido para evaluar la expresión de genes de formación de bio-película	Este estudio
pHT315- <i>P_{spac}'gfp</i>	Plásmido con el promotor constitutivo <i>spaC</i>	Este estudio

6.2. Selección de genes de interés para este estudio

Para seleccionar genes indicadores de diferenciación se utilizaron las secuencias de genomas de Bt-HD73 publicadas en NCBI (NC_020238.1), identificando los genes *spollA*, *nprA* y *cryIAc*. Para identificar genes homólogos a *sspB*, *sipW* y *sinI*, que han

sido más estudiados en Bs se realizó una búsqueda partiendo de los genes en *Bacillus subtilis* 168 (NC_000964.3). *spaC* es un promotor híbrido, derivado de un promotor del bacteriófago SP01, el cual contiene sitios de reconocimiento de ARN polimerasa de Bs, además posee el operador del promotor *Lacl*; ya que Bs no contiene a *Lacl* en su genoma, no hay represión y el promotor es constitutivo (Yansura y Henner, 1984). Los números de acceso de los genes identificados en Bt-HD73 y Bs 168 se enlistan en la tabla 2.

Tabla 2. Genes indicadores de diferenciación utilizados en este estudio.

Relación con:	Gen	Número de acceso (NCBI)
Esporulación	<i>spolIA</i>	NC_020238.1
Esporulación	<i>sspB</i>	NC_000964.3
Necrotrofismo	<i>nprA</i>	NC_020238.1
Virulencia	<i>cryIAC</i>	AAU87037.1
Bio-película	<i>sipW</i>	NC_000964.3
	<i>sinI</i>	NC_000964.3
Promotor constitutivo	<i>Spac</i>	García et al. 2017

6.2.1. Diseño de oligonucleótidos e identificación de las regiones promotoras de genes de esporulación, virulencia, necrotrofismo y constitutivo.

Los oligonucleótidos que se utilizaron como cebadores en este estudio se enlistan en la tabla 3. Para identificar las regiones promotoras de los genes de interés, primero se descargó el genoma completo de Bt-HD73 (NC_020238.1) por medio de la página Nacional Center of Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), posteriormente con ayuda del programa Artemis, se localizaron las regiones promotoras de cada gen, aproximadamente 200 pb río arriba de la secuencia del gen, considerando, la caja TATA, la presencia de genes adyacentes, el sitio de inicio de la traducción y la región promotora. Los cebadores directos (*forward primers*) de cada región promotora y reverso (*reverse primers*) de *gfp* contenían la secuencia de la enzima de restricción *XbaI* (TCTAGA). Para el ensamblaje de Gibson (ver abajo), se añadieron a los cebadores reversos de cada promotor, una secuencia complementaria

Gel Stain (Biotium), un intercalador del ADN, en la concentración recomendada por el fabricante. Las electroforesis se corrieron en amortiguador TAE 1x a un voltaje constante de 70 V durante 80 minutos. Se empleó el marcador de peso molecular Invitrogen 1 Kb Plus DNA Ladder (ThermoFisher). Cuando fue necesario, se cortaron las bandas de gel a partir de una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % y se purificaron utilizando el estuche Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research), siguiendo las indicciones del fabricante. Para los ensambles de las fusiones transcripcionales se utilizó el estuche Gibson Assembly® Master Mix (New England BioLabs® Inc.), siguiendo las recomendaciones del fabricante; la reacción se agitó suavemente y posteriormente se incubaron a 50° C por 40 minutos en el termociclador. Se utilizó la enzima de restricción *Xba*I (New England BioLabs® Inc.) y la T4 DNA Ligasa (New England Biolabs Inc.), siguiendo las recomendaciones del fabricante para su aplicación.

Tabla 4: Protocolo de PCR para la enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase.

Reactivo	Volumen para una reacción (µL)	Volumen para testigos (µL)
5x Phusion HG amortiguador	10	10
10 mM dntps	1	1
10 µM Forward Primer	2.5	2.5
10 µM Reverse Primer	2.5	2.5
ADN Molde	1	-
ADN Polimerasa	0.5	0.5
Agua libre de nucleasas	32.5	32.5

Tabla 5: Protocolo de PCR para Dream *Taq* PCR Master Mix (2X).

Reactivo	Volumen para una reacción (µL)	Volumen para testigos (µL)
Dream <i>Taq</i> Master Mix (2x)	20	20
Forward primer	2	2
Reverse primer	2	2
ADN molde	1	-
Agua libre de nucleasas	15	16
Volumen total	40	40

Tabla 6: Ciclos de PCR

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	1-3 min	1
Desnaturalización	94	30 s	30
Alineamiento	55	30 s	30
Extensión	72	1 min	30
Extensión final	72	5- 15 min	1

6.4. Construcción de fusiones transcripcionales y generación de cepas reporteras

Con el objetivo de evaluar la expresión de genes de esporulación, necrotrofismo, virulencia y bio-película se diseñaron 7 fusiones transcripcionales entre la proteína verde fluorescentes (GFP) y cada uno de los promotores seleccionados que se indican en la Tabla 2. Para amplificar la secuencia codificante de *gfp*, la cual estaba contenida en el vector pMutin-*gfp*, se utilizaron los cebadores DS1 y DS2 (Tabla 3) y como molde el ADN plasmídico de la cepa *E. coli* ECE 149. Para amplificar las regiones promotoras, se utilizaron los cebadores correspondientes (Tabla 3) y el ADN genómico de Bt-HD73. Se generó una construcción como testigo positivo el cual contiene el promotor P_{spac}. Para la generación de la fusión con el promotor P_{spac}, se generó un primer modificado *gfp* “corriente-arriba” que contenía la secuencia P_{spac} “corriente-arriba” (Tabla 3). De este modo, cuando se amplificó la secuencia codificante de *gfp* del vector pMutin-*gfp*, incluyó al promotor constitutivo *spac*. Con el fin de ensamblar las regiones promotoras con el gen *gfp*, se utilizó el ensamblaje de Gibson et al. (2009). Este método es relativamente fácil y eficiente, permite unir secuencias que tengan una región en común en un solo paso; participan tres enzimas claves: una polimerasa de alta fidelidad, una endonucleasa y una ligasa (Gibson, et al. 2009), tal como se ilustra en la Fig. 4. Después del ensamblaje de Gibson se llevaron a cabo PCR's con diluciones

1:10, 1:20 y 1:50 de la citada reacción de Gibson et al. (2009). Se usaron los cebadores *anterógrados* de cada promotor y el *retrógrado* de *gfp*.

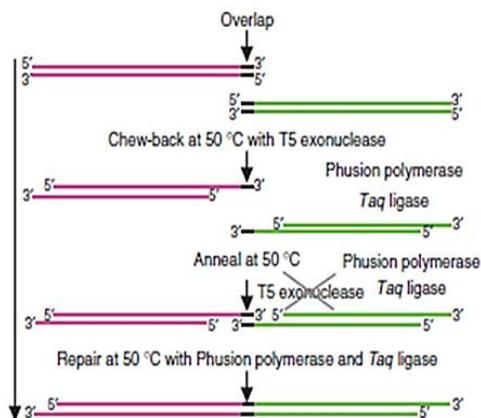


Figura. 4. Esquema de la reacción de Gibson. Dos fragmentos de ADN (magenta y verde) deben de poseer una secuencia en común (negro). La superposición de las regiones idénticas entre dos secuencias permite que la exonucleasa T5 corte aproximadamente 25 pb de los extremos 5' de cada región de ADN. Después las secuencias complementarias se alinean y la enzima polimerasa de fusión repara los nucleótidos que eliminó la exonucleasa (dado a que la exonucleasa es termolábil, sé inactiva durante la alineación). Finalmente, la *Taq* ligasa sella los sitios de corte con enlaces covalentes en el extremo 5' al 3' (Gibson et al. 2009).

Para verificar si el ensamblaje se había realizado de manera correcta, se corrió un gel de electroforesis y cuando fue necesario se realizó las purificaciones de bandas directamente del gel. Una vez obtenidas las fusiones transcripcionales purificadas, la ligación se realizó en el vector pHT315 (Arantes y Lereclus, 1991) en el sitio de restricción *Xba*I (Fig. 5). En primer lugar, se realizó la digestión del plásmido y los insertos con la enzima *Xba*I (Tabla 7). Efectuada la restricción, el plásmido y las construcciones se mezclaron a una relación equimolar para efectuar la ligación en el vector pHT315 (Tabla 8). La reacción de ligación se transformó en *E. coli* Top10 quimio competentes, y las colonias positivas fueron seleccionadas con medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina. Se realizaron reacciones PCR de las colonias crecidas en este agar, para verificar la presencia de la construcción en el plásmido. Dos colonias positivas de *E. coli* TOP10 transformadas con cada fusión transcripcional fueron conservadas en glicerol y guardadas a -80° C hasta su uso. Los

plásmidos resultantes fueron extraídos y se obtuvieron las secuencias en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, (LANGEBIO) Unidad Cinvestav Irapuato por el método Sanger utilizando los cebadores DS16 y DS17.

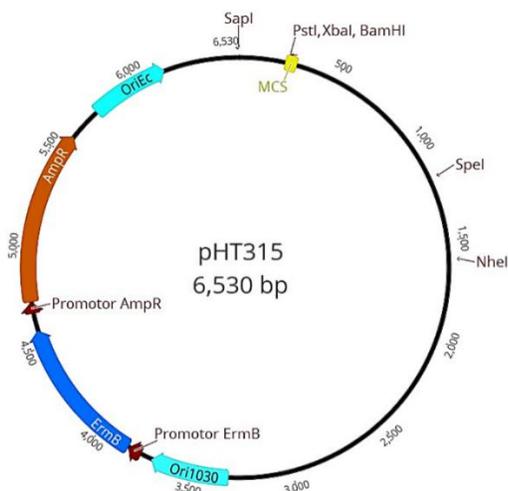


Figura. 5. Plásmido pHT315. La zona amarilla representa el sitio de clonación múltiple (MCS, por sus siglas en inglés); el plásmido contiene dos orígenes de replicación para Gram negativas (OriEC) y Grampositivas (Ori1030). Además, dos genes de resistencia para ampicilina (*ampR*) y eritromicina (*ermB*), para y Gram negativas y Gram positivas, respectivamente (Arantes y Lereclus, 1991).

Tabla 7. Preparación de la reacción de restricción con la enzima *XbaI* en el vector pHT315.

Reactivo	Volumen Final (µL)
ADNp	27
10X NE amortiguador	5
Enzima de restricción	1
Fosfatasa alcalina	2
Agua libre de RNAasa	15
Volumen total	50

Tabla 8. Ligación de las construcciones en el vector pHT315 en *E. coli* TOP10.

Reactivo	Volumen Final (µL)	Control
ADNp	4	4
10X NE amortiguador	1.5	1.5
Construcción	3	-
Ligasa	1	1
Agua libre de RNAasa	5.5	8.5
Volumen total	15	15

6.5. Transformación de ADN

Como cepa hospedera de los plásmidos se utilizó a *E. coli* TOP10, para lo cual se prepararon células competentes de dicha cepa en presencia de CaCl₂. Para esto, se tomó 1 mL de células crecidas toda la noche en 100 mL de LB y se crecieron entre 1.5 a 3 h. Después las células fueron colocadas en hielo por 10 minutos y centrifugadas. Posteriormente, se añadieron 10 mL de CaCl₂ al 0.1 M y se incubaron en hielo durante 20 minutos; se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Por último, se añadieron 5 mL de CaCl₂ al 0.1 M/15% de glicerol y las células fueron guardadas a -80 °C, hasta su uso. La transformación de *E. coli* se efectuó con el método de choque térmico (Froger y Hall, 2007).

Las células de Bt-HD73 se hicieron electrocompetentes de acuerdo al siguiente protocolo. Se sembró por estrías en una caja Petri con medio LB, a un inóculo de la cepa silvestre de Bt-HD73 y se incubó toda la noche. Posteriormente, se tomó un inóculo de la colonia de Bt y se creció en 25 mL de LB dentro de un matraz de 125 mL a 30 °C y 200 rpm, por toda una noche. Al día siguiente, se tomaron 2 mL para inocular 200 mL de caldo BHI (Anexo 1) en un matraz de 1 L y se esperó a que este cultivo alcanzara una absorbancia a 600 nm de 0.3-0.4 e inmediatamente se le añadió glicina al 25% (16-25 mL) para incubarse en las mismas condiciones por 1 hora. El cultivo se colocó en hielo por 5 minutos. Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 5000 x g por 5 minutos a 4 °C. Después fueron lavadas y centrifugadas en volúmenes descendentes (1, 0.5 y 0.25) de solución EB (Anexo). Finalmente, las células fueron resuspendidas en 3 mL de solución EB. La electroporación se llevó a cabo en el Electroporador (ECM630, BTX Harvard Bioscience Inc.).

Para generar las transformantes de Bt con los plásmidos descritos en la Tabla 2, se agregó 1 µg de ADN plasmídico a 300 µL de células electrocompetentes y se agitaron gentilmente. Enseguida, se incubaron por 5 minutos en hielo. Las mezclas fueron transferidas a celdas de 0.4 cm pre-enfriadas y se les aplicó un pulso de 200 ohms, 25

mF y 2.5 V, inmediatamente las células fueron resuspendidas en 1 mL de caldo BHI y se incubaron a 28 °C durante una hora. Posteriormente, las células se centrifugaron a 12, 000 rpm durante 5 minutos, se eliminó 1 mL del sobrenadante y se resuspendió en el sobrenadante restante y sembradas en medio agar BHI con 5 mg/mL de eritromicina. Dos colonias positivas de BtHD73 transformadas con cada fusión transcripcional fueron crecidas y después fueron almacenadas en glicerol y guardadas a -80 °C hasta su uso.

6.6. Verificación de la fluorescencia por medio del microscopio de fluorescencia

Para comprobar la fluorescencia de las cepas transformadas en Bt HD73, se utilizó un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Avio Observer Z1.6). Se utilizaron portaobjetos especiales para la visualización de los bacilos. Primero, se localizaron las células por medio de microscopía de contraste de fases, posteriormente se utilizó el filtro utilizado fue el 56 HE GFP (con excitación a 470/27 nm, y emisión a 512/30 nm) y finalmente se realizó un sobrelapamiento para ver cuales células presentan fluorescencia y cuales no.

6.7. Cinéticas de crecimiento y esporulación

Con el fin de evaluar el crecimiento, esporulación y expresión de genes en medio líquido y superficial se llevaron a cabo cinéticas en ambos sistemas. Las esporas fueron contadas como las unidades formadoras de colonias (UFC), después de un choque térmico a 80 °C por 20 min. Las células totales fueron contadas como las UFC sin el choque térmico. La expresión de los genes se midió por citometría de flujo. Estas técnicas se describen más adelante.

6.6.1. Preinóculos para cultivos superficiales y líquido

A partir de una colonia aislada sobre agar LB de cada cepa reportera se inoculó un matraz de 125 mL con 25 mL de medio LB y se incubó a 30 °C a 220 rpm durante 14 h. Posteriormente, se tomó 1 mL del cultivo en un microtubo y se centrifugó a 8000 rpm por 3 minutos. Después se descartó el sobrenadante; el *pellet* de células se resuspendió en 1 mL de PBS estéril y se centrifugó en las condiciones antes mencionadas. En seguida, se resuspendió en 1 mL de PBS.

6.6.2. Cinéticas en cultivo líquido

Las cinéticas en cultivo líquido se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL a los cuales se les añadieron 50 mL de Medio Limpio (Dinorín, 2011) (Anexo 1) con eritromicina. Después se inocularon con 0.5% v/v (250 µl) del inóculo. Los matraces se mantuvieron en una incubadora con agitación a 30 °C hasta 72 h. Durante la cinética se tomaron muestras en cada matraz en diferentes tiempos para evaluar el crecimiento, la esporulación y la expresión de genes (Tabla 9). Para los experimentos en medio líquido se tomaron muestras de 300 µL. Estas fueron centrifugadas, lavadas dos veces y resuspendidas en 300 µL de PBS. Se verificó la presencia de agregados celulares que pudieran afectar las mediciones de crecimiento y esporulación por UFC; cuando esto ocurría, las muestras se agitaron en vortex por media hora. La desagregación de células se corroboró mediante observación microscópica.

6.6.3. Cinéticas en cultivo superficial.

Los experimentos en cultivo superficial se realizaron en tubos para centrifuga de 50 mL con tapa de rosca, a los cuales se le añadieron 10 mL de medio agar limpio (Anexo 1) con eritromicina; se dejaron gelificar de 2 a 3 h en la campana de flujo laminar antes de la inoculación. Posteriormente, se inocularon a una dilución 1/10 con 70 µL del preinóculo y se propagaron en la superficie del medio con perlas de vidrio, después se

retiraron las perlas. Los tubos se mantuvieron en una incubadora a 30 °C durante 120 h. Para los experimentos en cultivo superficial se tomó cada tubo de centrifuga y se extrajeron todas las células contenidas dentro del tubo en diferentes tiempos (Tabla 10). Para esto, se agregaron entre 3-10 ml de PBS estéril (*Phosphate buffered saline*, por sus siglas en inglés) y después por medio del agitador vortex se suspendieron las células. Después, se tomaron 500 µL de la suspensión de células y se centrifugaron, se lavaron dos veces y fueron resuspendidas en 500 µL de PBS. Se verificó la presencia de agregados con el mismo método que en cultivo líquido.

Tabla 9: Horas de muestro en cultivo líquido, en la tercera columna se detalla que tipo de experimento se llevó a cabo en ese tiempo.

Cultivo	Hora	Medición
Líquido	1	Citometría/Viabilidad
Líquido	3	Citometría
Líquido	5	Citometría/Viabilidad
Líquido	9	Citometría
Líquido	12	Citometría/Viabilidad
Líquido	16	Citometría
Líquido	20	Citometría/Viabilidad
Líquido	28*	Citometría/Viabilidad
Líquido	36	Citometría/Viabilidad
Líquido	48	Citometría/Viabilidad
Líquido	72	Citometría/Viabilidad

*Se tomaron muestras en la hora 28 para las cepas reporteras de *nprA*, *cryIAc*, *sinI* y *sipW*

Tabla 10: Horas de muestro en cultivo superficial, en la tercera columna se detalla que tipo de experimento se llevó a cabo en ese tiempo.

Cultivo	Hora	Medición
Sólido	8	Citometría/Viabilidad
Sólido	16	Citometría
Sólido	24	Citometría/Viabilidad
Sólido	36	Citometría
Sólido	48	Citometría/Viabilidad
Sólido	72	Citometría/Viabilidad
Sólido	96	Citometría/Viabilidad
Sólido	120	Citometría/Viabilidad

6.7.4. Crecimiento y esporulación

Con el fin de determinar el número de células totales y termo-resistentes en cultivo líquido y superficial, se llevaron a cabo diluciones seriadas 1:10 de cada una de las muestras colectadas en las cinéticas. Las diluciones se hicieron en una microplaca de pozos de 300 μ L. Para cuantificar células termo-resistentes, las muestras fueron incubadas a 80 °C por 20 minutos antes de preparar las diluciones seriadas. Posteriormente, se sembraron con la técnica de gota, utilizando 6 μ L de cada dilución en una caja Petri de 15 cm de diámetro sobre AN 0.5 x, que fueron incubadas a 30 °C por 24 h. Se realizaron los conteos de colonias, y los resultados se expresan en unidades formadoras de colonia (UFC) por mL para cultivo líquido, y en UFC por cm^2 para cultivo superficial. Se calculó la eficiencia de esporulación dividiendo las UFC termo-resistentes, entre UFC totales y se multiplicaron por 100.

6.8. Análisis por citometría de flujo

Calculamos el porcentaje de células individuales que expresan cada gen reportero en todas las muestras por medio del citómetro de flujo Accuri™ C6 Plus (BD). Para la detección inicial de las células de Bt se utilizó la cepa testigo BtHD73-pHT315, que contiene el plásmido vacío sin el promotor del gen blanco ni *gfp*; de esta manera se localizaron las células por tamaño y complejidad. Para la detección de GFP se utilizó una longitud de onda de excitación a 488 nm y emisión de 530 nm. Por cada muestra se registraron 10,000 eventos. Las células que expresan la proteína GFP se identificaron como células que proporcionan una intensidad de señal más altas en comparación con lo células que no expresan ningún gen reportero (pHT315) (Verplaetse et al., 2015). La expresión de cada gen se definió como el porcentaje de células con fluorescencia superior a un umbral establecido para cada hora de muestreo.

En un segundo experimento se procesaron solamente las cepas reporteras de los genes *sinI*, *sipW*, *CryIAc* y las cepas testigo pHT315 y P_{spac}. Se midió la expresión en un citómetro BD FACSCalibur en ambos cultivos, con los criterios descritos anteriormente.

6.9. Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado, se determinó la media y la desviación estándar para cada tiempo de incubación y se graficaron usando el programa GraphPad Prism 6.

7. RESULTADOS

7.1. Construcción de fusiones transcripcionales

Con el fin de amplificar las regiones promotoras y la secuencia codificante de *gfp* se utilizaron los cebadores mencionados en la tabla 3 en un PCR. Se usó como molde el ADN genómico de Bt-HD73 y ADN plasmídico de la cepa *E. coli* ECE 149, respectivamente. Se logró obtener amplificación de todos los promotores; así como, del gen *gfp*, observando bandas del tamaño esperado pares de bases (pb) (Fig. 6 y 7)

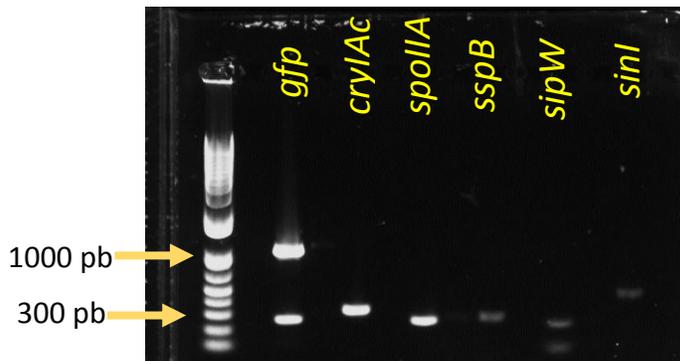


Figura. 6. Gel de electroforesis al 1% de agarosa. Las letras en amarillo representan el nombre de cada promotor. Tamaño esperado: *gfp* (949 pb) *cryIAC* (296 pb), *spoIIA* (212 pb) *sspB* (252 pb) *sipW* (199 pb) y *sinI* (452 pb).

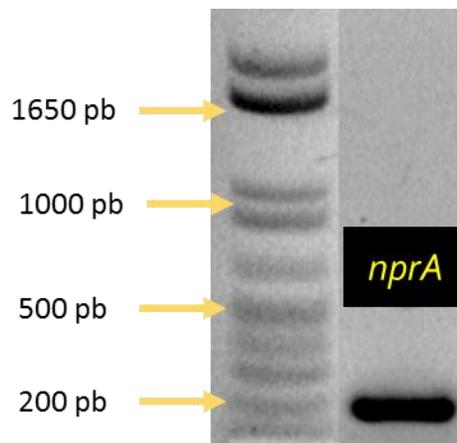


Figura. 7. Gel de electroforesis al 1% de agarosa. Las letras en amarillo representan el nombre de cada promotor. Tamaño esperado: *nprA* (222 pb).

Cuando en los geles de electroforesis se presentaron más de dos productos de PCR, se llevó a cabo una purificación de banda en un gel de agarosa al 0.8%. Este fue el caso para las bandas de *gfp*, P_{sipW} (Fig. 8) y P_{spac} (resultados no mostrados). Después de purificar el ADN de una banda cortada, se observa que las bandas secundarias se eliminaron o disminuyeron su concentración que pudiera deberse a que los cebadores eran inespecíficos (Fig. 8).

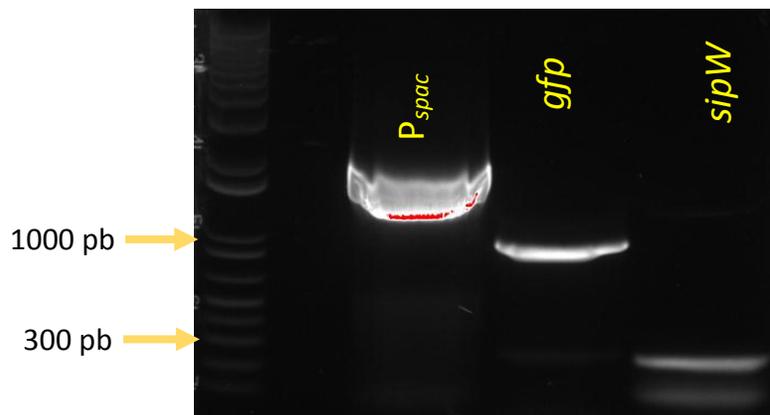


Figura. 8. Gel de electroforesis al 0.8% para purificar bandas específicas. Las letras en amarillo representan el nombre de cada gen. Tamaño esperado: (P_{spac} 1000 pb) (*gfp* 942 pb) (*sipW* 199 pb)

Después de purificar las bandas del gel se corrió un gel de electroforesis al 1%. Para corroborar la pureza de los amplicones o fragmentos amplificados de ADN por PCR. Como se muestra en la figura 9, se comprobó que todas las bandas son monodispersas. A continuación, se procedió a realizar la unión de las regiones promotoras con la región codificante de GFP por medio del ensamblaje de Gibson (Fig. 10). Una vez que se reamplificaron los productos de las reacciones de Gibson, se obtuvieron bandas monodispersas para las fusiones $P_{sipW}'gfp$ y $P_{sspB}'gfp$. Para los casos $P_{spollA}'gfp$ y $P_{sipW}'gfp$ se obtuvieron bandas secundarias (Fig. 10).

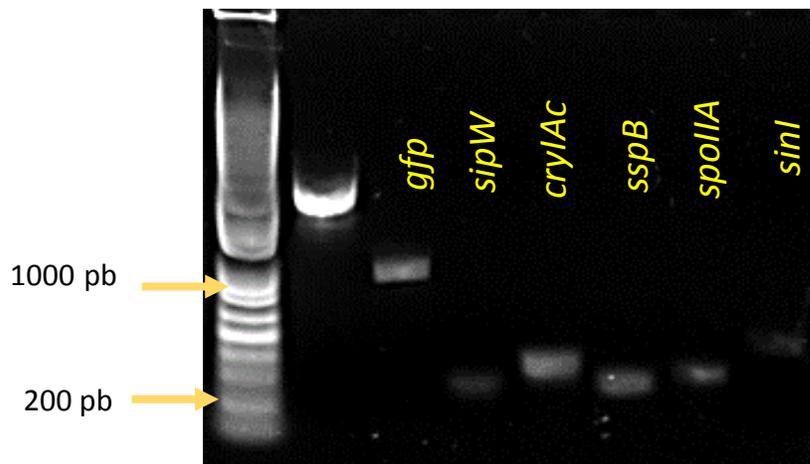


Figura 9. Gel de electroforesis al 1%. Las letras en amarillo representan el nombre de cada gen. Tamaño esperado: (*gfp* 942 pb) (*sipW* 199 pb) (*cryIAC* 296 pb) (*sspB* 252 pb) (*spollA* 212 pb) (*sinI* 452 pb).

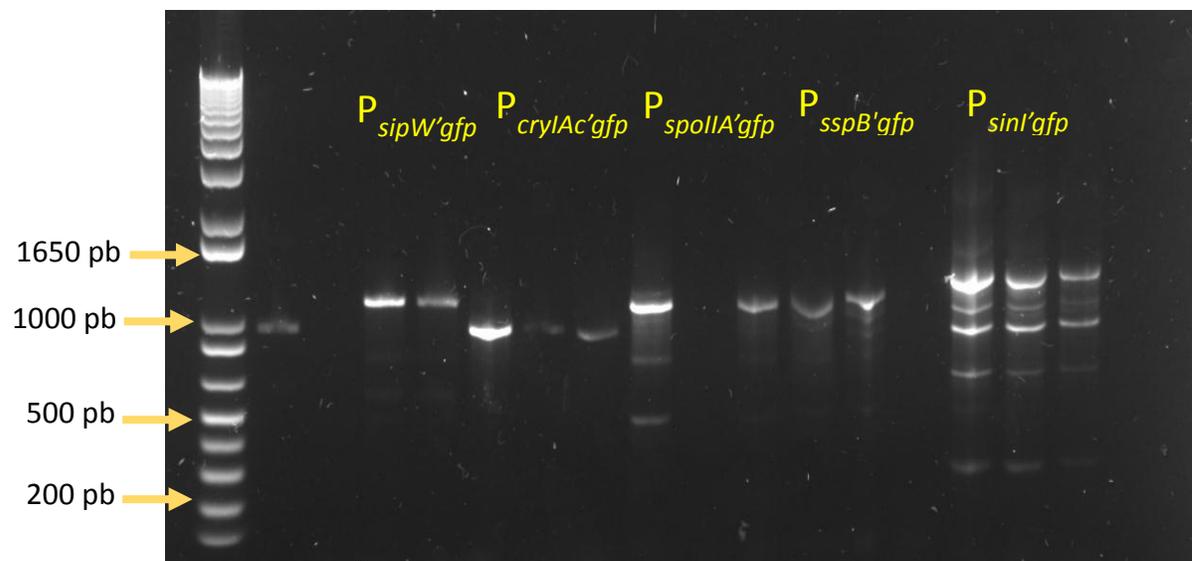


Figura 10. Gel de electroforesis al 1%. Ensamblaje de Gibson. Las letras en amarillo representan el nombre de las fusiones transcripcionales; se usó como referencia la banda del gen de *gfp*, siendo posibles positivas aquellas que tuvieran el tamaño esperado de la fusión transcripcional. Tamaño esperado: ($P_{sipW'gfp}$ 1141 pb) ($P_{cryIAC'gfp}$ 1238 pb)* ($P_{spollA'gfp}$ 1158 pb) ($P_{sspB'gfp}$ 1194 pb) ($P_{sinI'gfp}$ 1394 pb).

En estos casos, se procedió a cortar las bandas principales y a purificarlas por una segunda electroforesis. Se cortó el carril número 1 de la fusión $P_{sinI'gfp}$ (Fig. 10). Después de obtener las fusiones transcripcionales (Fig. 11) se procedió a ligarlas al

vector pHT315 usando como hospedero a *E. coli* Top 10. La primera banda de izquierda a derecha corresponde al vector pHT315, la segunda banda corresponde al vector digerido con las enzimas de restricción *Xba*I y las demás bandas, a las fusiones transcripcionales purificadas (Fig. 12). Estas bandas se ligaron y se transformaron en *E. coli*. Una vez verificada la presencia de los plásmidos con las fusiones transcripcionales en *E. coli* se procedió a transformar Bt-HD73.

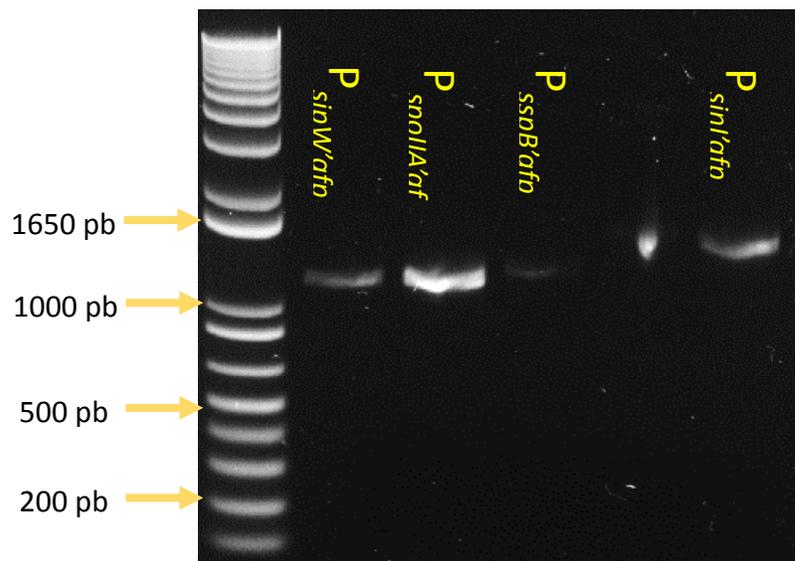


Figura. 11. Gel de electroforesis al 1%. Purificaciones del ensamblaje de Gibson. Las letras en amarillo representan el nombre de las fusiones transcripcionales. Tamaño esperado: ($P_{sipW'gfp}$ 1141 pb) ($P_{spolIA'gfp}$ 1158 pb) ($P_{sspB'gfp}$ 1194 pb) ($P_{sinI'gfp}$ 1394 pb).

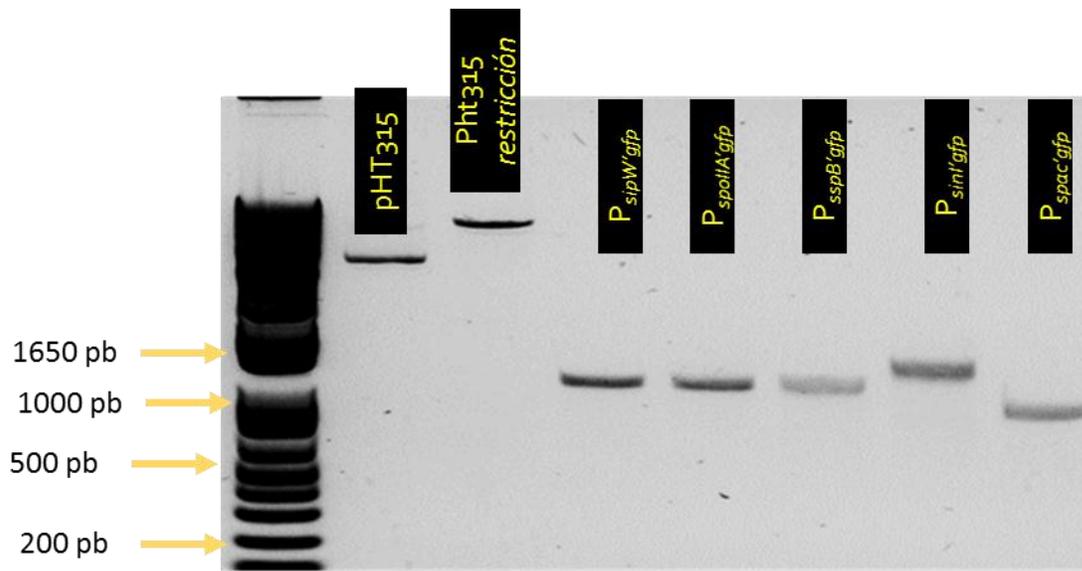


Figura. 12. Gel de electroforesis al 1%. Restricciones y fusiones transcripcionales. Las letras amarillas del carril 1 al 2, representan las restricciones hechas en el vector pHT315, las demás representan el nombre de las fusiones transcripcionales. Tamaño esperado: ($P_{sipW'gfp}$ 1141 pb) ($P_{spollA'gfp}$ 1158 pb) ($P_{sspB'gfp}$ 1194 pb) ($P_{sinI'gfp}$ 1394 pb).

Se comprobó que cada cepa tuviera la fusión transcripcional por medio de PCR; cada banda representa la fusión transcripcional en la cepa reportera y todas las cepas presentan estas bandas del tamaño esperado (Fig. 13 y 14).

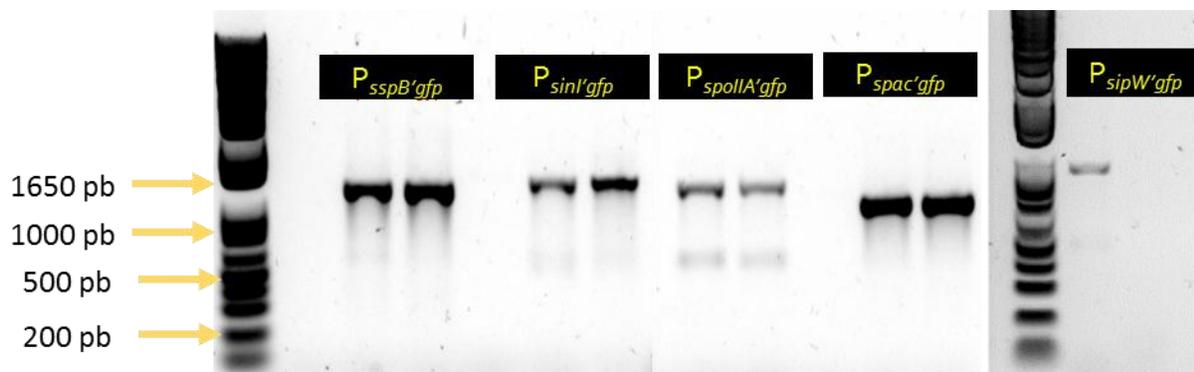


Figura. 13. Gel de electroforesis al 1%. PCRs de colonias en cepas transformadas de *Bt* HD73. Las letras en amarillo representan las cepas transformantes en *Bt*. Tamaño esperado: ($P_{sspB'gfp}$ 1194 pb) ($P_{sinI'gfp}$ 1394 pb) ($P_{spollA'gfp}$ 1158 pb) (P_{spac} 1000 pb) ($P_{sipW'gfp}$ 1141 pb).

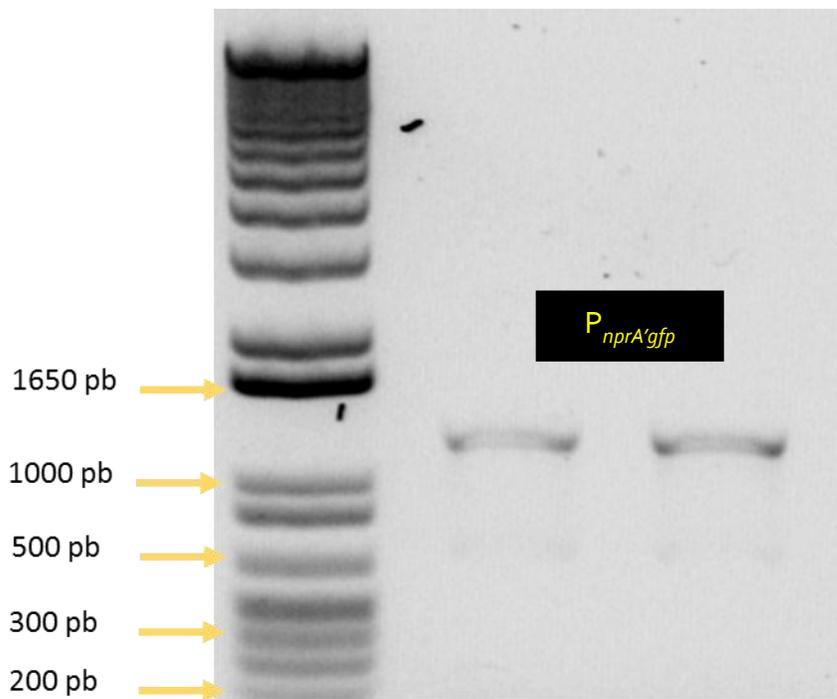


Figura. 14. Gel de electroforesis al 1%. PCRs de colonias en cepas transformadas de *Bt* HD73. Las letras en amarillo representan las cepas transformantes en *Bt*. Tamaño esperado: ($P_{nprA'gfp}$ 1259 pb)

7.2. Secuenciación de las fusiones transcripcionales

Para corroborar la correcta construcción de las fusiones transcripcionales y descartar la presencia de mutaciones, se extrajo ADN plasmídico de las cepas de *E. coli* TOP10 y se enviaron al Laboratorio de Servicios Genómicos (CINVESTAV-LANGEBIO), para su secuenciación por medio de la tecnología Sanger. Se usaron los cebadores DS15 y DS16 (Tabla 3). Se realizó un BlastN con la secuencia teórica en comparación con las obtenidas en la secuenciación. Las cepas transformadas tenían las secuencias teóricas; aunque se detectaron algunas pocas mutaciones puntuales (Anexo 2). Se desconoce si estos errores son debido a la secuenciación Sanger en este trabajo o si son mutaciones introducidas por la ADN polimerasa cuando se llevo a cabo la PCR en la amplificación. Las mutaciones que se presentaron para todas las fusiones se dieron principalmente en la secuencia de GFP; sin embargo, ninguna mutación afectó a los

aminóácidos 65, 66, y 67 los cuales le confieren fluorescencia. Con respecto a los promotores, la única cepa reportera que presentó mutaciones fue $P_{sinI'gfp}$, a la cual le faltaron dos timinas en la región promotora seleccionada.

7.3. Verificación de la fluorescencia en cepas transformadas en Bt-HD73

Para comprobar la fluorescencia de las cepas transformadas en Bt HD73, se utilizó un microscopio de fluorescencia invertido. Encontramos que todas las cepas reporteras presentan fluorescencia (Fig. 15); es decir, que la región promotora seleccionada para genes de diferenciación fue la adecuada. La cepa transformada con el vector vacío no presentó fluorescencia, lo cual se esperaba puesto que no tiene ninguna región promotora ni *gfp* (Fig. 15). Notablemente, la señal GFP emitida por la reportera $P_{sspB'gfp}$ se encontró localizada solamente en las endosporas, a diferencia del resto de las cepas reporteras que presentan fluorescencia en las células completas (Fig. 15).

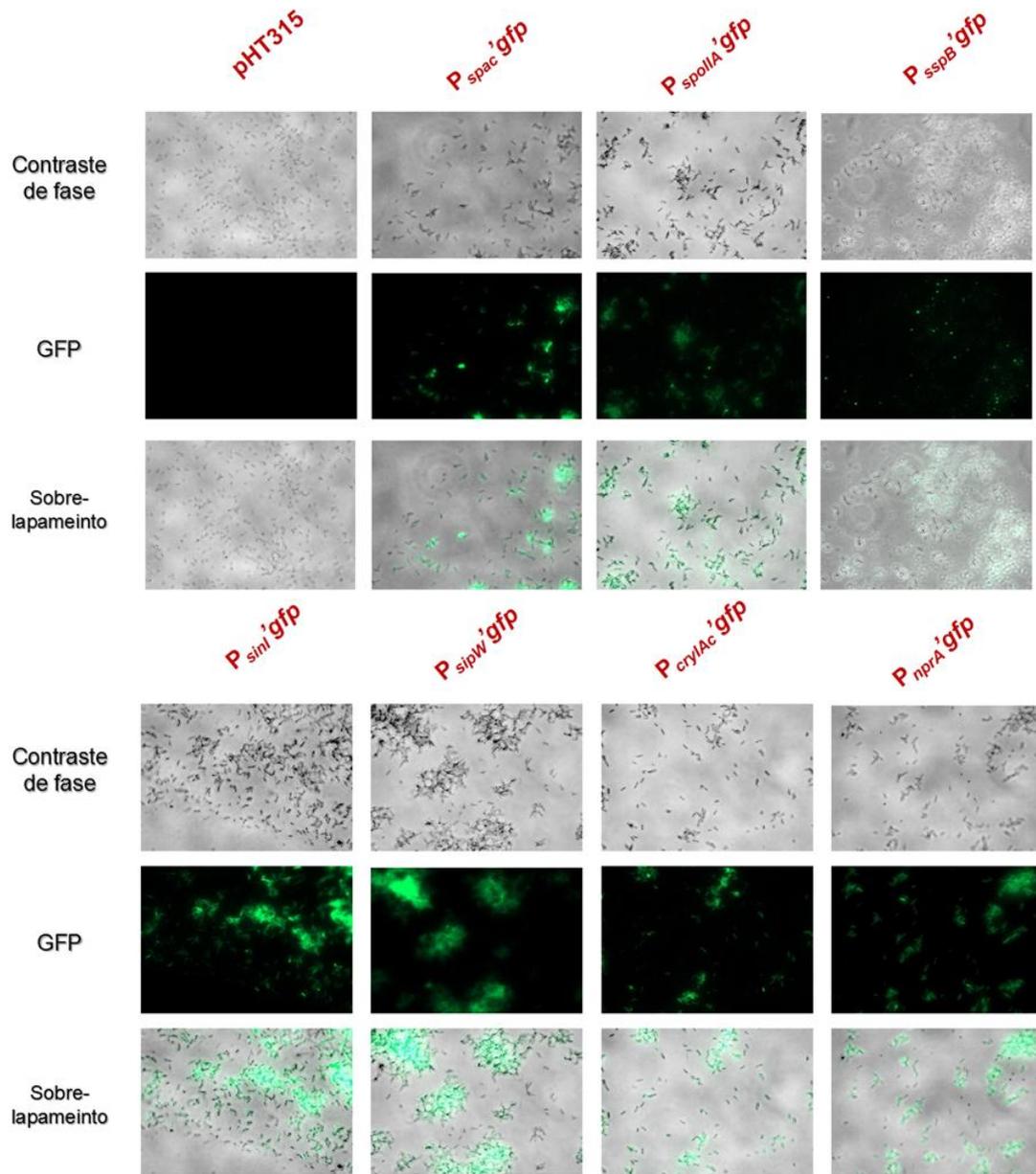


Figura. 15. Fluorescencia de las cepas reporteras de Bt-HD73. Con el detector de contraste de fases de localizan las células, posteriormente se utiliza el filtro para GFP y por último el sobrelapamiento de ambas imágenes.

7.4. Cinéticas de crecimiento y esporulación

7.4.1. Cultivo líquido

Para detectar las fases de crecimiento de Bt-HD73, así como para conocer si las transformaciones con los diferentes plásmidos en *Bt* habían generado alguna modificación en el crecimiento o esporulación, se realizaron cinéticas de crecimiento y esporulación en cultivo líquido y en superficial. Se tomaron muestras en distintos tiempos en ambos sistemas. Con respecto al crecimiento y esporulación en cultivo líquido, encontramos que todas las cepas presentan cinéticas muy similares (Fig. 16). Se observa que el punto máximo de crecimiento vegetativo se alcanza a las 20 h, mientras que las células termo-resistentes (esporas) se detectan a partir de las 20 a 28 h. Con respecto a la esporulación, se alcanzó un título máximo de esporas $N_E \approx 1.5 \times 10^8$ UFC/mL. Cabe destacar que el límite de detección inferior de este método fue de $N_E \approx 166$ UFC mL⁻¹. Por lo tanto, se utiliza este valor basal para calcular la eficiencia de esporulación en los casos donde las esporas no fueron detectadas (ND, Fig. 15). En cultivo líquido se alcanzó una eficiencia de esporulación entre el 60% y 85 % en todas las cepas reporteras a la hora 72, (Fig. 17). Esto permite confirmar que la producción de GFP en las ocho cepas reporteras no generó ningún cambio detectable en la fisiología del crecimiento y esporulación de dichas cepas. Por lo tanto, se pueden descartar posibles cambios en la expresión genética de genes asociados a la diferenciación, como resultado de la transformación con los plásmidos el 60% y 85 % en todas las cepas reporteras a la hora 72, (Fig. 17). Esto permite confirmar que la producción de GFP en las ocho cepas reporteras no generó ningún cambio detectable en la fisiología del crecimiento y esporulación de dichas cepas. Por lo tanto, se pueden descartar posibles cambios en la expresión genética de genes asociados a la diferenciación, como resultado de la transformación con los plásmidos.

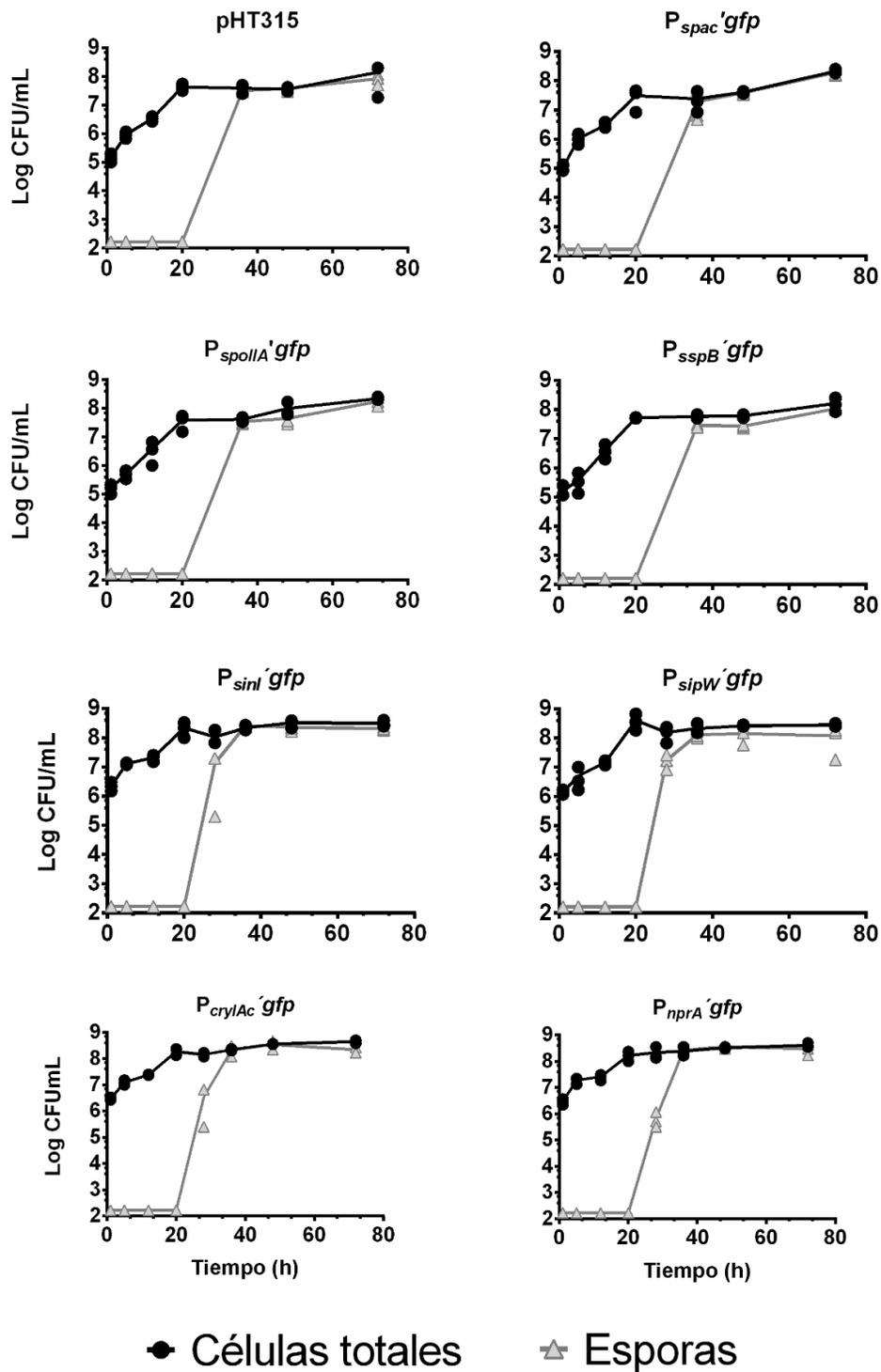


Figura. 16. Crecimiento y esporulación en cultivo líquido de las cepas transformadas en Bt-HD73. Las líneas negras en el promedio del crecimiento total, las líneas grises en el promedio de esporas. Los puntos negros y triángulos grises son cada triplicado del experimento.

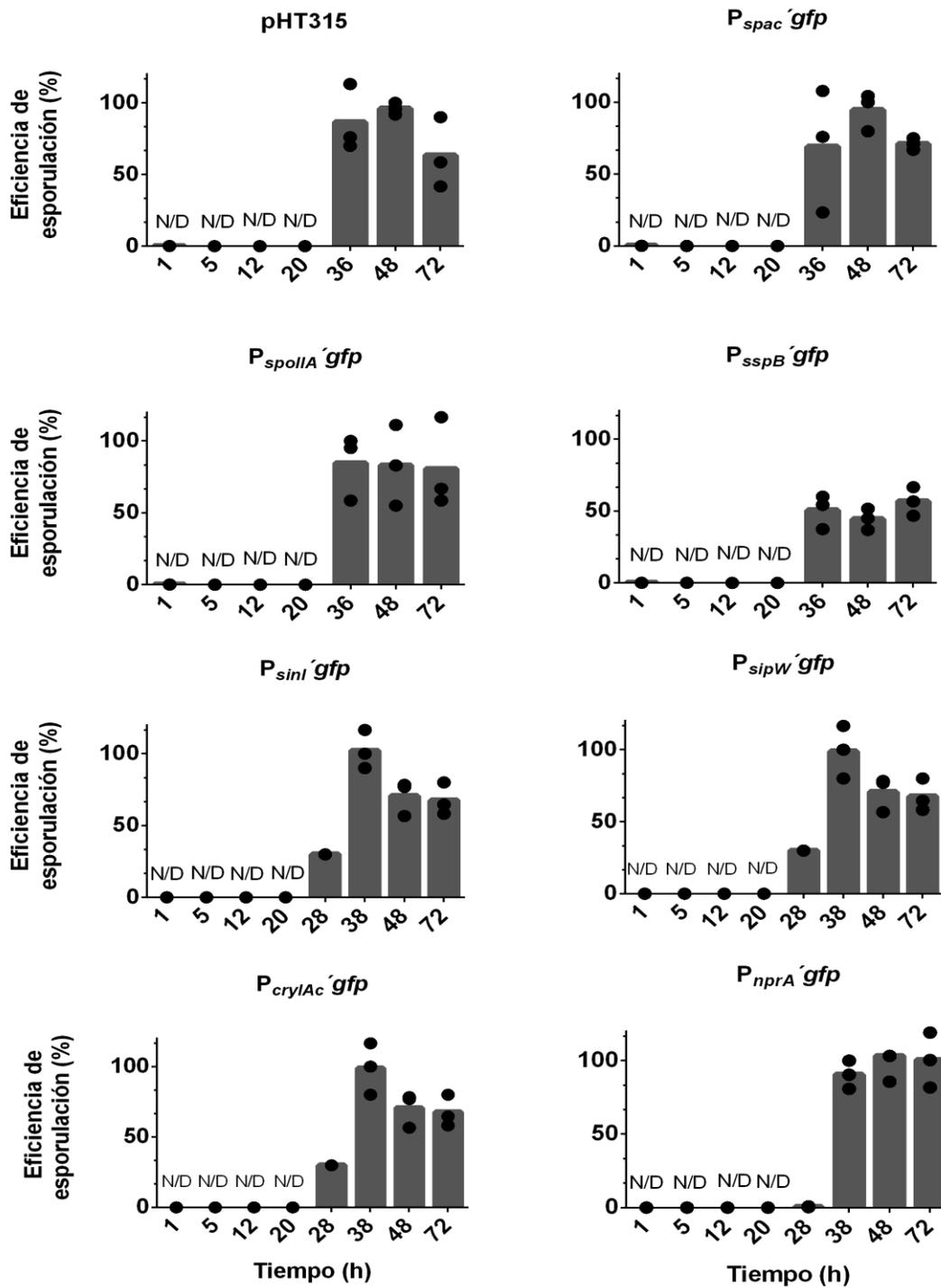


Figura.

17. Eficiencia de esporulación en cultivo líquido de las cepas transformadas de Bt-HD73. N/D= No detectado. Las barras es el promedio del porcentaje de eficiencia de esporulación y los puntos son cada triplicado del experimento.

7.4.2. Cultivo superficial

Del mismo modo que en cultivo líquido, se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento y esporulación en cultivo superficial, en las que se cuantificaron las UFC totales y termo-resistentes. Todas las cepas presentaron cinéticas similares en este sistema de cultivo. Se alcanzó un crecimiento máximo a las 120 h con un conteo de células totales de $N_T \approx 2 \times 10^9$ UFC/cm² (Fig. 18). Las esporas se detectaron a partir de las 8 o 24 h con título máximo de esporulación de $N_E \approx 1 \times 10^9$ UFC/cm² a las 120 horas. Con respecto a la eficiencia de esporulación se observan dos patrones distintos: en el primer escenario, las cepas reporteras $P_{spolIA}'gfp$, $P_{nprA}'gfp$, $P_{sspB}'gfp$ y $P_{cryIAc}'gfp$, presentan 20-25% de eficiencia de esporulación; mientras que el resto de las cepas tiene entre un 50 y 65 % de eficiencia (Fig. 19). Esto se pudo atribuir a la variabilidad intrínseca del método, debido a condiciones desconocidas y no testiguadas durante el crecimiento bacteriano. Adicionalmente, en este método de medición solo se pueden detectar cambios cuando en los resultados se encuentra variaciones mayores a un orden de magnitud. Estos datos sugieren que el crecimiento y la esporulación de las cepas reporteras no afectada por la producción de GFP. Para corroborar si la transformación hubiera afectado el crecimiento y esporulación de Bt se necesitarían realizar cinéticas con la cepa sin transformar, trabajo que nos se realizó en esta tesis. Además, las cinéticas de crecimiento y esporulación nos permiten asociar la expresión de cada gen con distintas fases del crecimiento.

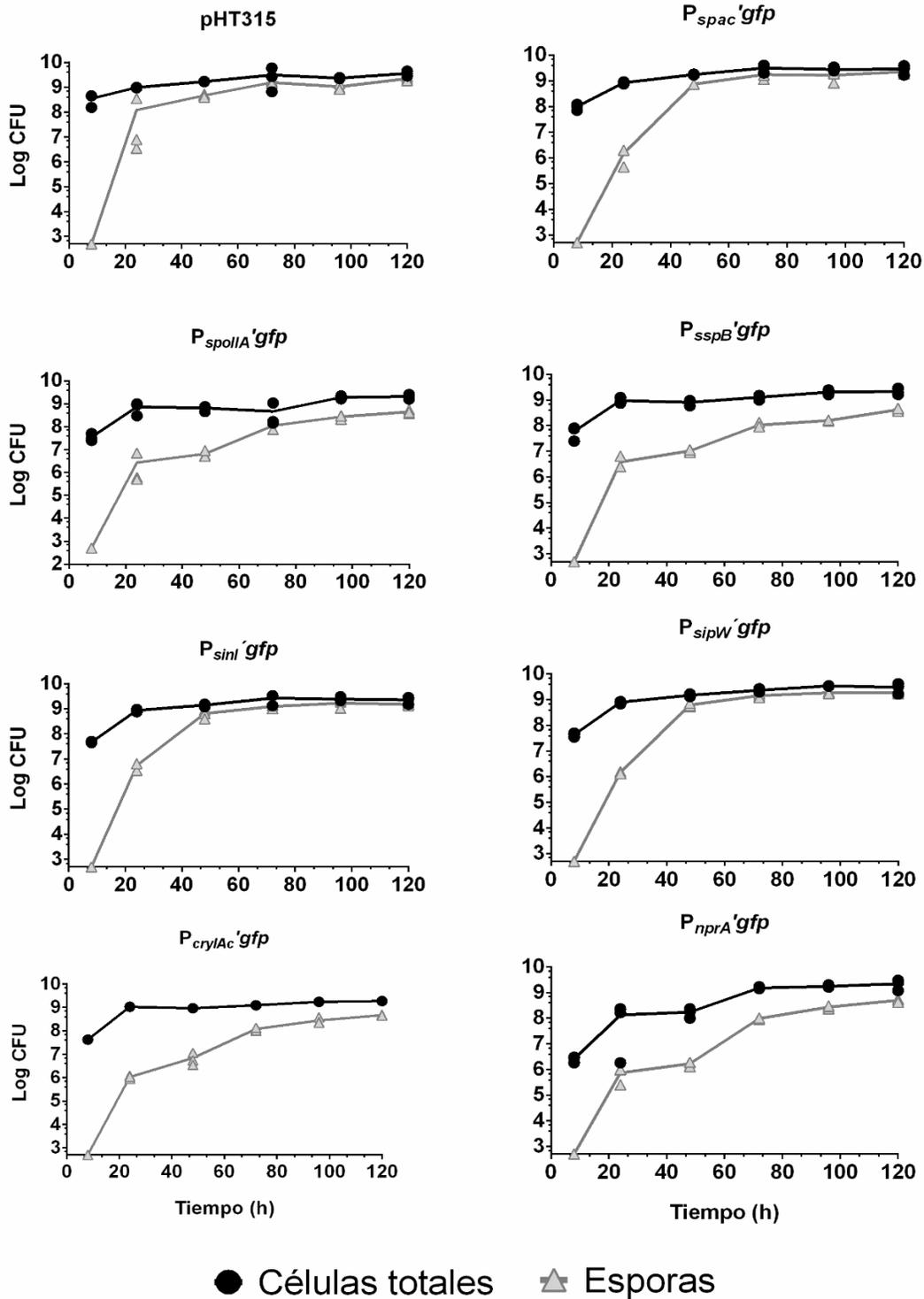


Figura 18. Crecimiento y esporulación en cultivo superficial de las cepas transformadas de Bt HD73. Las líneas negras en el promedio del crecimiento total, las líneas grises en el promedio de esporas. Los puntos negros y triángulos grises son cada triplicado del experimento.

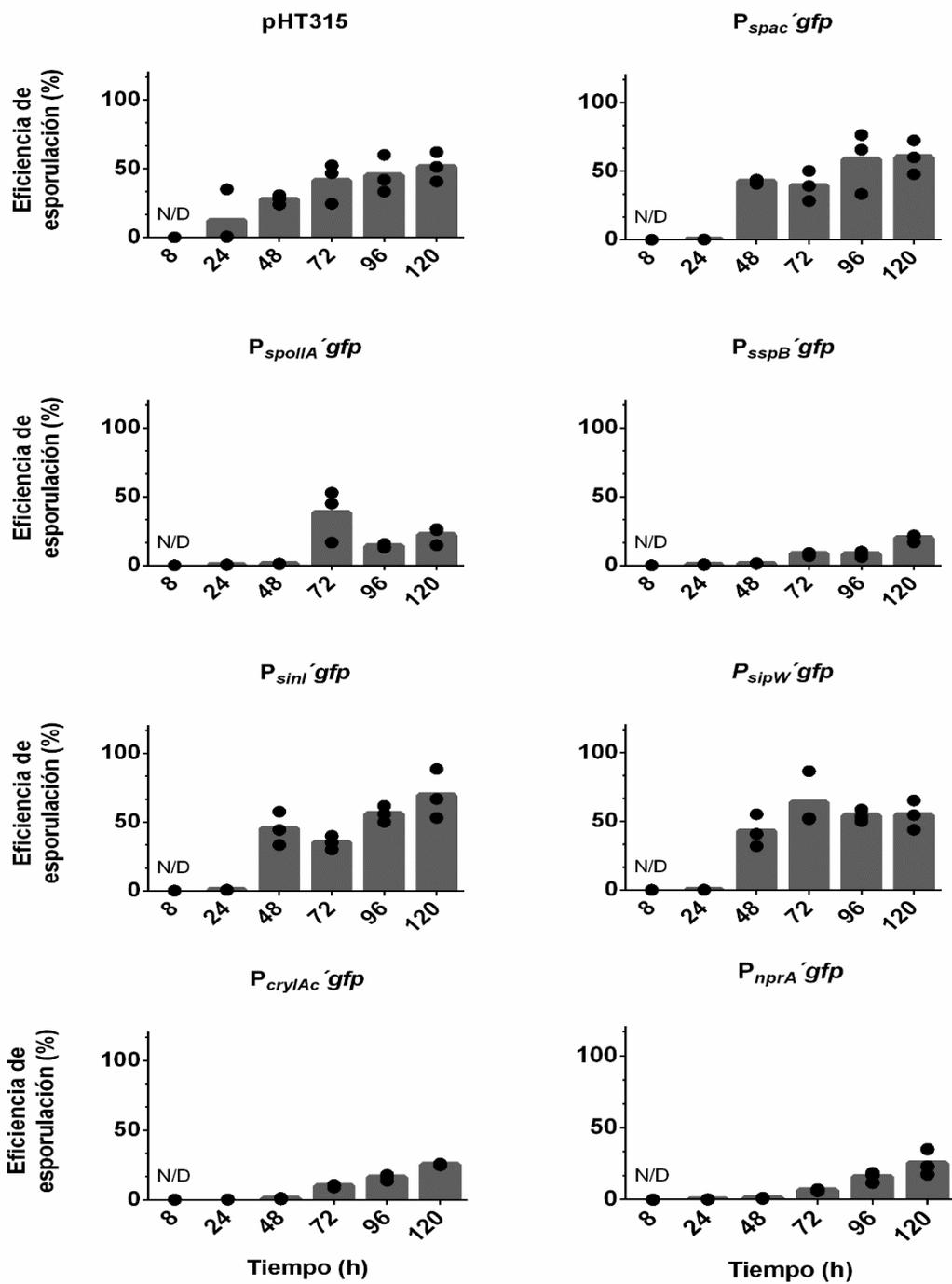


Figura 19. Eficiencia de esporulación en cultivo líquido de las cepas transformadas de Bt HD73. N/D= No detectado. Las barras es el promedio del porcentaje de eficiencia de esporulación y los puntos son cada triplicado del experimento.

7.5. Expresión de genes de diferenciación

La hipótesis central de este trabajo es que una posible causa de las diferencias en títulos de esporas entre cultivos líquido y superficial (Veening et al. 2005; Verplaetse et al. 2015; Lima et al. 2019) se debe a variaciones en la expresión genética asociada a la diferenciación celular. La diferenciación en bacterias consiste en la aparición de células especializadas en diferentes funciones; para esto, los microorganismos pueden formar subpoblaciones con diferentes niveles de expresión en algunos genes.

Se realizaron 2 experimentos independientes debido a la dispersión de datos en la cepa reportera $P_{sipW}'gfp$. En el primero se probaron todas las cepas en ambos regímenes de cultivo. Posteriormente se repitió la medición de las cepas $P_{sinI}'gfp$, $P_{sipW}'gfp$, $P_{spac}'gfp$, $P_{cryIAc}'gfp$ y pHT315 en los cultivos líquido y superficial.

Para determinar la expresión de genes de diferenciación en subpoblaciones de Bt-HD73 se crearon cepas reporteras fluorescentes y se midió fluorescencia a nivel de células individuales. En el primer experimento, se evaluó el porcentaje de células que expresan GFP con el citómetro de flujo Accuri™ C6 Plus (BD) localizado en CIAD, Hermosillo.

Se utilizaron dos cepas testigos: $P_{spac}'gfp$ (testigo positivo) y pHT315 (testigo negativo). En cultivo líquido, (lado izquierdo de la Fig. 20), observamos que alrededor de las 5 h, el 100% de la población bacteriana tiene fluorescencia en testigo positivo ($P_{spac}'gfp$). Pero para tiempos más prolongados de cultivo, $P_{spac}'gfp$ muestra fluorescencia con porcentajes variables, entre 25 y 80%. Por otra parte, ambos lados de la Fig. 18 no se muestra fluorescencia para la cepa transformada con el vector vacío (pHT315), que utilizamos como testigo negativo. Con respecto al cultivo superficial (lado derecho de la Fig. 20) se demostró que la cepa $P_{spac}'gfp$ presentó un alto nivel de fluorescencia después de 20 h de incubación que se mantuvo casi constante (92%) hasta las 120 h de incubación. Estos resultados indican que las cepas controles funciona correctamente, y que la respuesta en el cultivo superficial para la cepa testigo positivo

es más estable, es decir se presentan menos fluctuaciones que la respuesta en el cultivo líquido.

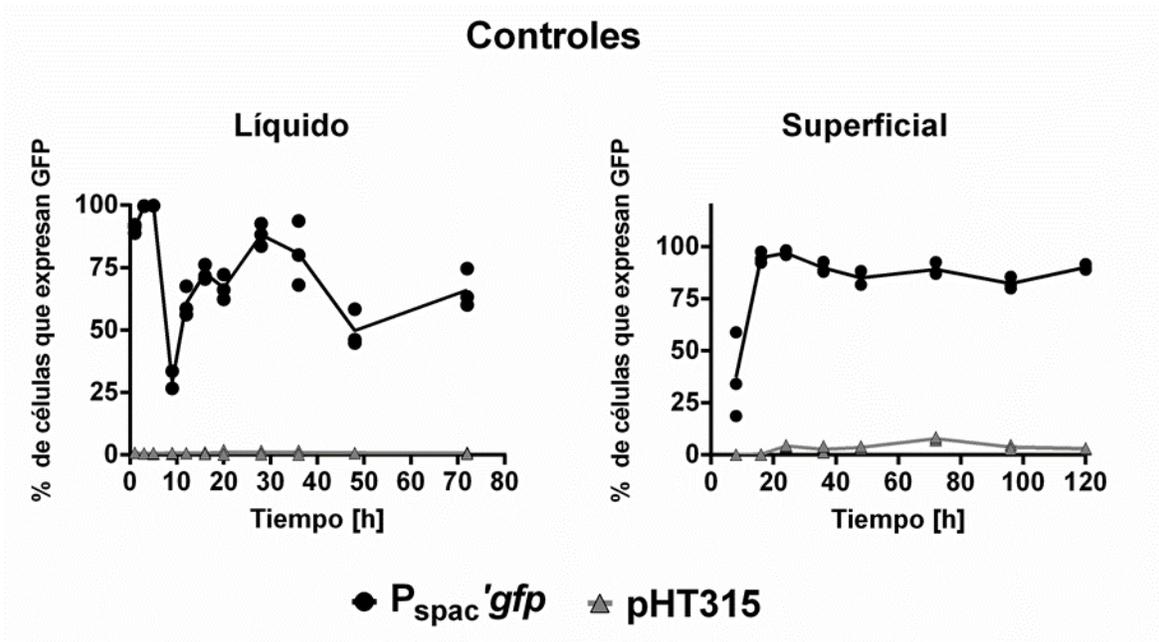


Figura. 20. Expresión de GFP cepas testigo. Porcentaje de células que expresan GFP en cultivo líquido y superficial medidas con el citómetro Accuri™ C6 Plus (BD).

Cuando se comparó la fluorescencia de las transformantes $P_{spollA}'gfp$ y $P_{sspB}'gfp$ ligadas a la esporulación. En la Fig. 21 se muestra mayor porcentaje de fluorescencia para la primera, con respecto a la segunda. Es de notarse que la fluorescencia observada con $P_{spollA}'gfp$, aparece a las 10 h de cultivo, anterior a la esporulación mostrada en las Figs. 16 y 18. En cultivo líquido, la expresión de GFP en la cepa $P_{spollA}'gfp$ se detecta a partir de la hora 9; posteriormente se observa un aumento gradual, teniendo un pico de expresión entre el 60 y 65% alrededor de la hora 16 y 20 (Fig. 21). La población que expresa GFP en la cepa $P_{sspB}'gfp$ es de alrededor del 10% de la población. Sin embargo, se tiene un pico de expresión de GFP en alrededor de la hora 16; posteriormente la expresión se mantiene constante durante toda la cinética entre 10 y 12%. En cultivo superficial, se observó la expresión del GFP para la cepa $P_{spollA}'gfp$ en un 30% de la población a las 16 h y se mantiene incrementando hasta la

hora 30; después se observa un punto de declive al 15% en la expresión a las 48 h. Por otro lado en la cepa reportera $P_{sspB}'gfp$, se observa que solo una pequeña parte de la población expresa este promotor, alcanzado un punto máximo de expresión del 10% entre las 72 y 96 horas (Fig. 21).

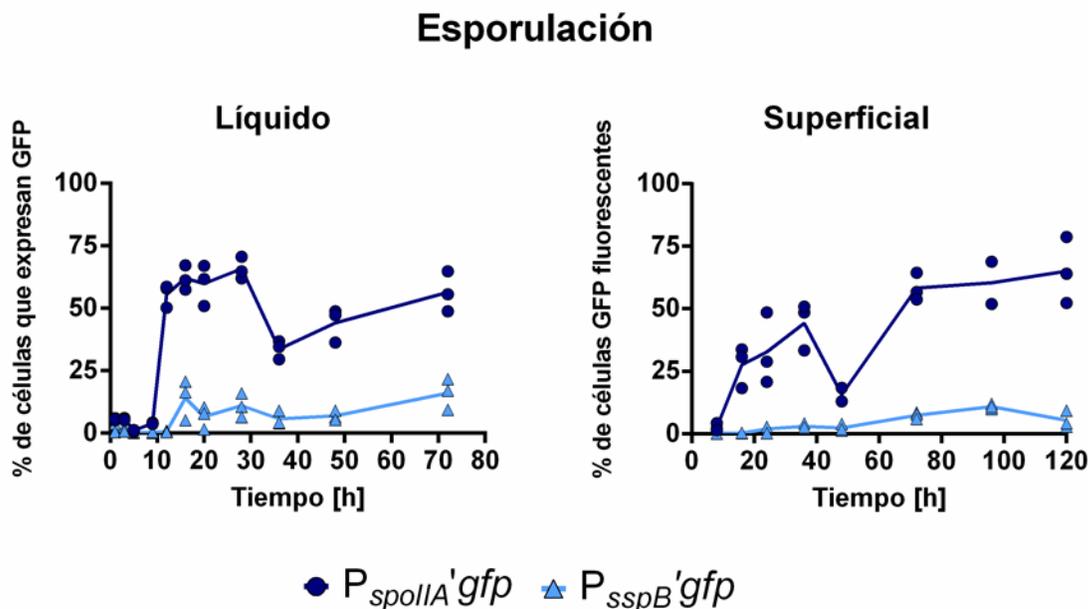


Figura. 21. Expresión de GFP en cepas reporteras de esporulación. Porcentaje de células que expresan GFP en cultivo líquido y superficial medidas con el citómetro Accuri™ C6 Plus (BD).

Para estudiar la transcripción relacionada con la formación de bio-películas, se utilizaron las transformantes $P_{sini}'gfp$ y $P_{sipW}'gfp$. En la Fig. 22 se observa que, tanto en cultivo líquido como en el superficial, la expresión del GFP correspondiente a la transformante, $P_{sipW}'gfp$, se inició, a las 9 h de incubación y después de las 20 h se mantuvieron niveles cercanos al 50% de células fluorescentes durante casi todo el periodo de observación que abarcó 120 h, aunque el porcentaje de fluorescencia fue mayor en el cultivo superficial. Sin embargo, observamos una gran variabilidad en los datos de expresión de $P_{sini}'gfp$ en cultivo superficial. (Fig. 22). En general se observa que el promotor $P_{sipW}'gfp$ se expresa en una subpoblación más grande en cultivo superficial y se mantiene constante durante todo el crecimiento entre las 24 y 120 h.

Bio-película

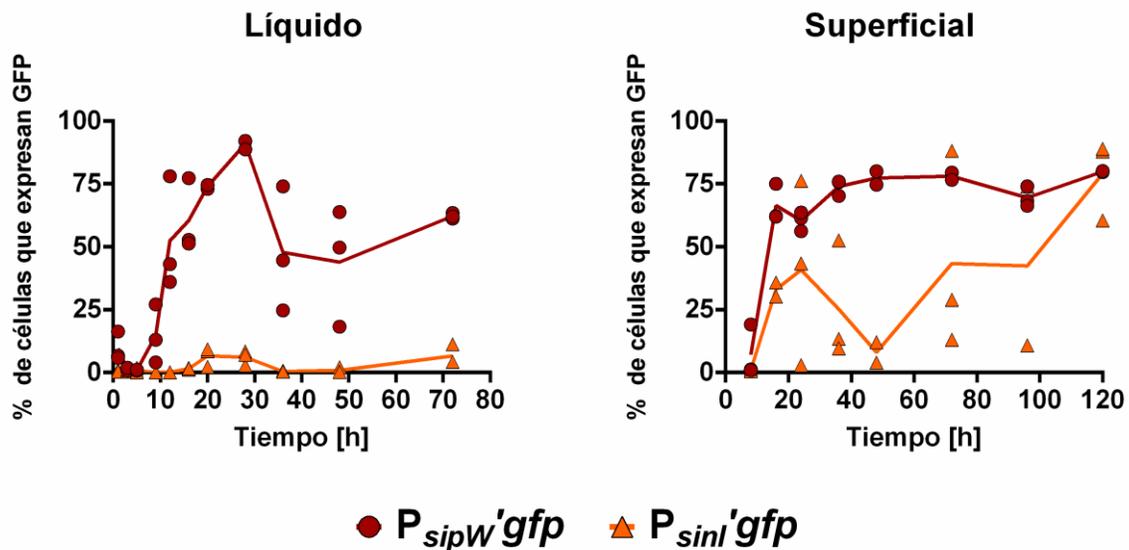


Figura. 22. Expresión de GFP en cepas reporteras de la formación de bio-película. Porcentaje de células que expresan GFP en cultivo líquido y superficial medidas con el citómetro Accuri™ C6 Plus (BD).

En la Fig. 23 se muestran los porcentajes de células fluorescentes con las transformantes: $P_{nprA}'gfp$, relacionada con un gen regulador del necrotrofismo y la $P_{cryIAc}'gfp$, relacionada con el promotor del gen regulador de la endotoxina Cry. Nuevamente se observó que la expresión de GFP empieza aproximadamente entre 8 y 9 h después del tiempo de inoculación. (Fig. 23).

Es de notarse la coincidencia del inicio de la expresión de GFP, entre 8 a 10 h de incubación, en los promotores de todos los genes reguladores y en los dos cultivos estudiados. Esta coincidencia, concuerda con el tiempo de arranque de la aparición de la esporulación, medido por el número de UFC con células termorresistentes. Esto indica un origen común en el proceso de diferenciación, pues aparentemente, todas

las secuencias del ADN, ligadas a los promotores estudiados, empiezan a transcribirse en la misma etapa del ciclo de cultivo. Esto sugiere una coincidencia importante en el proceso de diferenciación. Por ejemplo: que la diferenciación de Bt obedece a una transición bien definida en el metabolismo de las células y que posiblemente existe un control maestro general asociado a de dicha diferenciación.

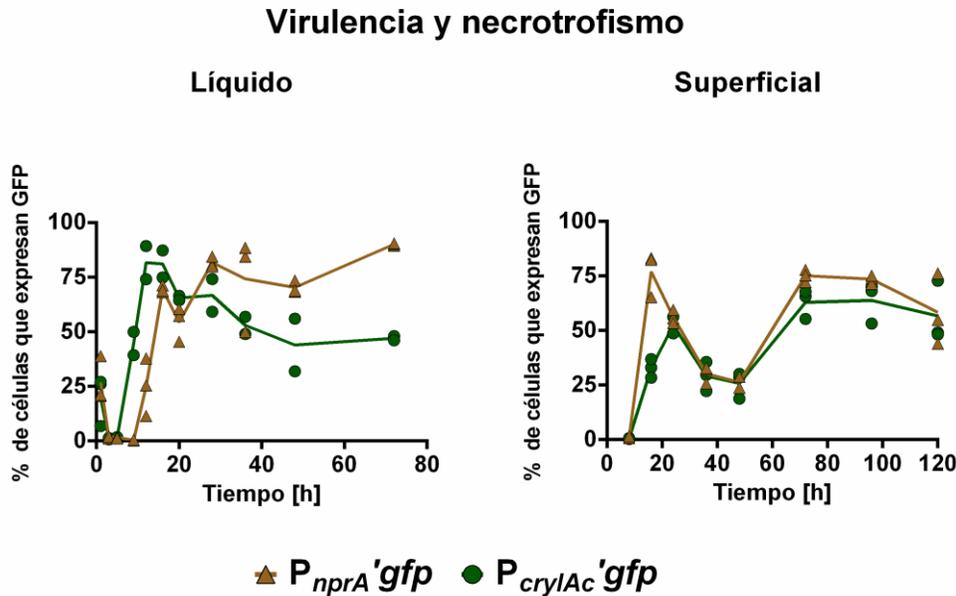


Figura. 23. Expresión de GFP en cepas reporteras de necrotrofismo y virulencia. Porcentaje de células que expresan GFP en cultivo líquido y superficial medidas con el citómetro Accuri™ C6 Plus (BD).

Para aclarar las fluctuaciones importantes en los niveles de fluorescencias mostradas en las Figs. 20 y 22 se realizó un segundo experimento, porque, las fluctuaciones de la fluorescencia de la transformante, $P_{spac}'gfp$, planteaban dudas sobre la hipótesis de la estabilidad del transcritto de un gen de tipo constitutivo como se vio en la Fig. 20 y por ello se repitieron los experimentos correspondientes, pero ahora usando el citómetro situado en la UAMI, con la colaboración de la Dra. Edith Cortés.

La Fig. 24 muestra que la fluorescencia de las transformantes testigo $P_{spac}'gfp$ (positivo) y pHT315 (negativo). En el primer caso la fluorescencia se inicia antes de las 5 h y definitivamente antes del periodo de esporulación que se detectó alrededor de 8 h. En cambio, el testigo negativo no mostró fluorescencia durante todo el periodo de

incubación. Además, el patrón de fluorescencia tuvo mucho menos fluctuaciones que en el experimento anterior, quizás debido que las mediciones estuvieron sujetas a menores errores experimentales. De todas formas, se detectó que el porcentaje de células fluorescentes disminuyó con el tiempo, aunque con mayor tasa en el cultivo superficial que en el cultivo líquido. Estos datos sugieren que durante la lisis celular durante la esporulación de Bt, la proteína fluorescente (GFP) se libera de las células y ya no es detectable por el citómetro de flujo. También se confirmó definitivamente que la fluorescencia estaba ligada al proceso de transformación genética pues la cepa testigo pHT315 no presentó fluorescencia en todo el periodo de observación en los dos cultivos (Fig. 24).

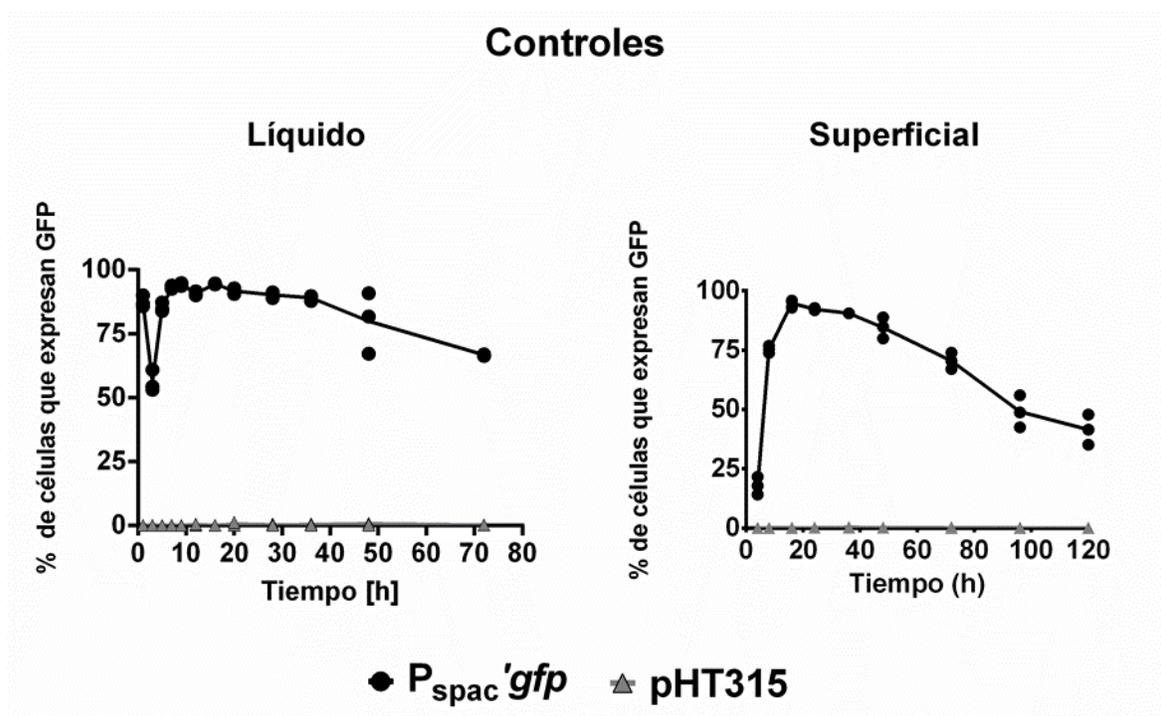


Figura 24. Expresión de GFP en cepas testigo. Porcentaje de células que expresan GFP en cultivo líquido y superficial medidas con el citómetro BD FACSCalibur.

En la Fig. 25 se muestran los porcentajes de fluorescencia con las transformantes $P_{sipW}'gfp$, ligada al proceso de formación de la bio-película y $P_{sini}'gfp$, relacionada con el promotor de una peptidasa responsable de la edición de los péptidos señaladores del proceso de formación de la bio-película. En el caso de $P_{sipW}'gfp$, se observaron menos fluctuaciones con respecto a la tendencia de la cinética de fluorescencia. Tanto en cultivo líquido como en el superficial se alcanzó un nivel de fluorescencia mayor del 75%, pero su aparición fue más temprana en el cultivo superficial que en el líquido. En esta repetición no se observó fluorescencia con la transformante $P_{sini}'gfp$. Es de notarse que en la Fig. 22 se indicaron niveles más bajos de fluorescencia de GFP con $P_{sini}'gfp$ que con la transformante $P_{sipW}'gfp$. En el momento presente no se tienen indicios que expliquen estas diferencias, que pudieran deberse a una menor estabilidad de esta construcción.

En la Fig. 26 se muestra el patrón de fluorescencia con la transformante cultivo en cultivo líquido en la cepa $P_{cryIAc}'gfp$, asociada a la formación de la endotoxina Cry. Ahí se confirma que la transcripción relacionada con esta transformante ocurre entre las 5 y 10 h, y por lo tanto es un proceso que ocurre antes de la formación de las esporas, mostrada en las Figs. 14 y 16. Esto apoya la idea que diversos autores han mencionado la formación de la proteína Cry y de la espora, son parte de un proceso complejo que se detecta al mismo tiempo durante el ciclo de vida de Bt (Agaisse y Lereclus 1994; Aronson 2002; Soberón et al. 2007).

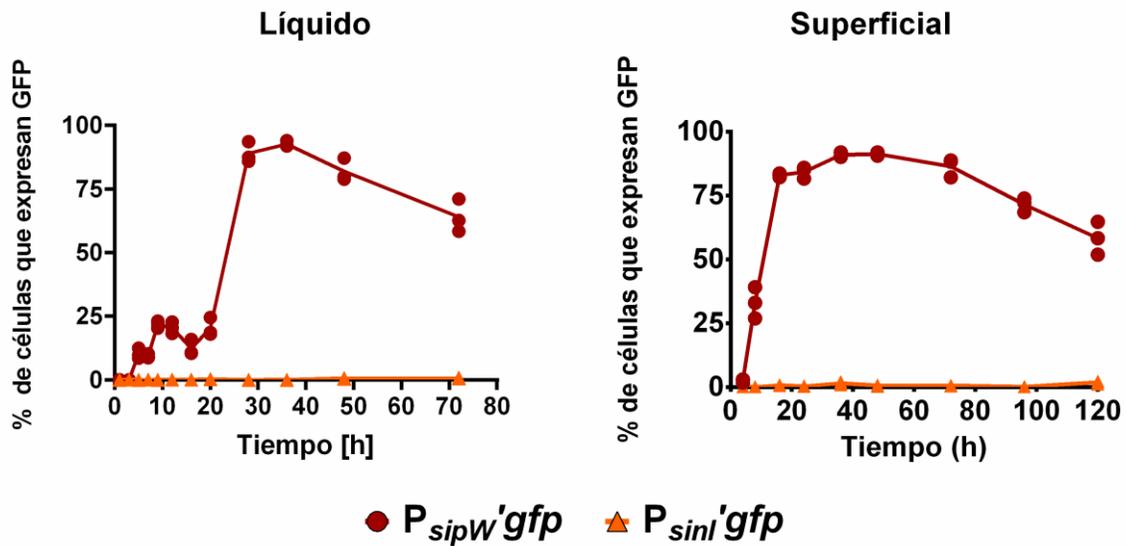


Figura 25. Expresión de GFP en cepas reporteras de la formación de bio-película. Porcentaje de células que expresan GFP en cultivo en líquido y superficial medidas con el citómetro BD FACSCalibur.

Por último, también se repitió la cinética en cultivo líquido para la cepa reportera $P_{cryIAc}'gfp$. En esta cepa, detectamos un inicio de expresión de GFP alrededor de la hora 5, del 5%, y aumenta a través del tiempo alcanzando un punto máximo de expresión del 82% a la hora 20; posteriormente, se tiene un declive a partir de la hora 36 del 75% y 50% a la hora 72 (Fig. 26). Cabe resaltar que todos los datos tienen una dispersión menor, comparado al primer experimento (Figs. 20-23); sin embargo, en general los patrones de expresión de GFP son similares.

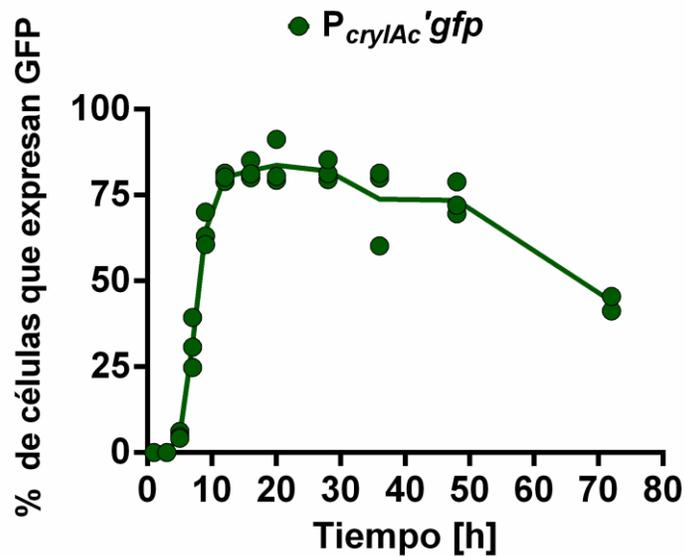


Figura. 26. Expresión de GFP en cepas reporteras de virulencia. Porcentaje de células que expresan GFP en cultivo en cultivo líquido medidas con el citómetro BD FACSCalibur.

Los resultados de los experimentos aquí mostrados confirman la hipótesis que el uso de las transformantes con GFP asociados a promotores de los genes reguladores del ciclo de vida de Bt permiten definir las etapas de inicio en la expresión de dichos genes, y en este caso coinciden en un evento especial, ligado al fin del crecimiento vegetativo, llamado también exponencial o de crecimiento balanceado. Este concepto es discutido con mayor amplitud en la siguiente sección.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo generamos herramientas, estrategias y metodologías para la medición de la diferenciación en *B. thuringiensis* a nivel de células individuales. La diferenciación en bacterias es un proceso para la generación de células especializadas de acuerdo a las condiciones del medio circundante y necesidades de la población bacteriana; este fenómeno está asociado cambios en la regulación genética de los microorganismos. Para la medición de la diferenciación se han generado herramientas que permiten evaluar variaciones en la expresión genética dentro de una población de interés, por ejemplo, fusiones transcripcionales con β -galactosidasa (*lacZ*) o genes fluorescentes (*gfp*) (Lindow, 1995; Silhavy et al. 2000). Debido a la facilidad del método del ensayo de *lacZ*, este método fue la técnica preferida durante muchos años para estudiar la variación genética en poblaciones bacterianas. Esta técnica es ideal cuando se espera que la expresión del gen a estudiar sea idéntica en todas las células (López et al. 2008), o cuando se investigan cambios a nivel poblacional. Sin embargo, cuando se espera una heterogeneidad genética en la población, esta técnica no permite conocer la expresión en cada individuo.

Una herramienta poderosa para evaluar expresión a nivel de células individuales son las fusiones con proteínas fluorescentes. Estas tienen la capacidad de mostrar *in vivo* los niveles de expresión, la localización y la funcionalidad de proteínas y pueden ser usados como reporteros de la actividad de cualquier promotor de interés (Brehm et al, 2004). El gen reportero fluorescente más usado es *gfp*, el cual codifica para la proteína verde fluorescente, GFP. Una facultad importante de las proteínas fluorescentes es que pueden ser monitoreadas por medio del citómetro de flujo de manera cuantitativa. Este equipo es capaz de generar datos robustos de la expresión genética en cualquier condición medioambiental que se encuentre la bacteria, evaluando lo que sucede a nivel de células individuales en lugar de un promedio de toda la población (Valdivia et al. 1998; Brehm et al. 2004; Ambriz et. 2014).

En este proyecto, el uso de fusiones transcripcionales con GFP permitió medir y comparar la aparición de subpoblaciones en fermentaciones líquidas contra cultivos superficiales. Para lograr esto, se generaron ocho cepas reporteras: Un testigo negativo y otro positivo, dos cepas reporteras de genes de esporulación, dos para la formación de bio-película, una para virulencia y una para necrotrofismo. Encontramos que todas las cepas (excepto la cepa con el plásmido vacío pHT315) tienen fluorescencia. La cepa que utilizamos como testigo positivo ($P_{spac}'gfp$) mostró tener una expresión constante en ambos sistemas de cultivos, sin embargo, no es homogénea, es decir no se expresa igual en toda la población. El promotor P_{spac} se expresa en la mayor parte de la población en *Bs*. Sun et al. 2009, demostraron que reemplazando el promotor P_{spac} en el gen de nativo de surfactina, se obtiene una mayor producción de este lipopéptido. Por otra parte, García et al. 2017 evidenciaron que dicho promotor también se expresa en *Bt*. En ese trabajo se generó una cepa transformante con la fusión $P_{spac}'gfp$ y por medio de microscopia de fluorescencia se confirmó que el promotor es funcional en *Bt*-HD73. Entonces, ambos testigos funcionaron como se esperaba en ambos experimentos, tanto en cultivo líquido como en superficial, lo cual indica que este sistema funciona correctamente para cuantificar la expresión de genes a nivel de células individuales.

Mientras que la mayoría de las cepas reporteras presentan fluorescencia homogénea en la célula, en el caso de la cepa $P_{sspB}'gfp$ se visualizó la fluorescencia localizada en la espora, dentro del bacilo esporulado. Este resultado es consistente con los análisis de microscopia de fluorescencia de Vlamakis et al. 2008. Esto se debe a que durante la formación del septo asimétrico, cada compartimento (célula madre y pre-espora) tiene patrones diferenciales de expresión regulados por una cascada entre cruzada de factores sigma. En *B. subtilis*, se conoce que el operón *sspB*, se expresa únicamente en la pre-espora (Dignam et al. 1980; Connors et al. 1986; Setlow et al. 1988), y en este trabajo lo demostramos por primera vez en *B. thuringiensis*.

Los resultados de fluorescencia indicaron que la elección de las regiones promotoras fue correcta para todos los genes. También indica que el ensamble de Gibson et al.

(2009) es una herramienta útil para esta finalidad, ya que la unión de las regiones promotoras con secuencia codificante de *gfp*, se ejecutó de manera correcta y rápida. Con respecto a este tipo de herramientas fluorescentes, en Bs existen diversos artículos donde se estudia la diferenciación con este tipo de técnicas (Chai et al. 2008; Veening et al. 2005; Vlamakis et al. 2008; López et al. 2008). Sin embargo, es reconocido que los estudios de diferenciación a nivel de células individuales en bacterias del grupo *B. cereus* son pocos, ya que las herramientas disponibles son limitadas (Pérez et al. 2016). De hecho, sólo existe un estudio sobre la interacción bacteria-insecto en Bt (Verplaetse et al. 2015), en donde se logró observar que el principal gen que se expresan sobre el cadáver del insecto es el regulador de virulencia PlcR, además se presenta heterogeneidad en su expresión, es decir que se generan subpoblaciones durante esta interacción. Proponemos que nuestras cepas reporteras son un recurso valioso para estudios futuros sobre la regulación genética en diferentes aspectos del ciclo de vida de Bt, que es un tema de interés en nuestro grupo de investigación en CIAD-CIDEA (Rocha et al. 2010; Rocha et al. 2012; Cabrera et al. 2014; Cabrera et al. 2016; Gastélum et al. 2020; Verdugo et al. 2020). Además, pueden ser útiles para seguir caracterizando la fisiología bacteriana en sistemas de fermentación de Bt para su uso biotecnológico, como también se ha hecho en el grupo de investigación en UAM-I (Lima et al. 2019).

El objetivo principal del trabajo era evaluar cambios en genes de diferenciación, comparando dos sistemas de cultivo: fermentación en cultivo líquido y en superficial. Diversos autores han mencionado que existe una mayor producción de metabolitos (proteasa, amilasas, etc.) de interés en fermentaciones sólidas (Barrios et al. 1988; Devi et al. 2005; Lima et al. 2019). Sin embargo, la utilización de dos sistemas de producción en donde se manejan diferentes unidades de evaluación complica bastante las comparaciones entre ambos sistemas. Es por eso que en este trabajo experimental, se decidió estimar el porcentaje de células en una población bacteriana que expresan genes reporteros asociados a la diferenciación celular en ambos sistemas. De esta manera, consideramos que son válidas las comparaciones directas.

Si bien el cultivo superficial no es igual al cultivo sólido – donde se utilizan matrices como salvado de trigo (Devi et al. 2005) - existen algunas características que lo hacen similar como: 1) que el organismo se desarrolla y se alimenta del soporte sólido, y 2) probablemente en ambos requiere la producción de una matriz extracelular para generar un bio-película (Chai et al. 2008; Mielich y López, 2015). 3) existe heterogeneidad en el acceso al oxígeno, donde están favorecidos las células en la interface sólido-aire (Vlamakis et al 2008).

Los datos de crecimiento y esporulación también son difíciles de comparar entre los sistemas de cultivo líquido y superficial. Para el caso del crecimiento, las cinéticas en cultivo líquido han sido ampliamente estudiadas y en las condiciones normales aparecen fases de crecimiento muy bien caracterizadas (lag, exponencial, transición, estacionaria) en casi cualquier fermentación (Dinorín et al. 2015). En contraste, para el caso del crecimiento en colonias en cultivo superficial, estas fases son menos evidentes, y entran en juego variables como la difusión de nutrientes, calor metabólico, acceso al oxígeno, etc. (Hesseltine, 1987). Por otro lado, los datos expresados en UFC/ml vs UFC/cm² no son comparables. Es importante que se desarrollen modelos adecuados para estudiar fenómenos de diferenciación, en donde se aislen variables (como en este caso el estado físico), y se mantengan constantes otros parámetros como los nutrientes en cultivo de cultivo, la cantidad de inóculos, etcétera. Por esto, en este trabajo utilizamos la eficiencia de esporulación para realizar comparaciones; por un lado, el cultivo líquido y el superficial tenían la misma composición química, además establecimos a la eficiencia de esporulación como una herramienta para realizar comparaciones entre ambos sistemas. Nuestros datos indican que el estado físico del cultivo no generó cambios apreciables en cuanto a la eficiencia de esporulación en entre cultivo líquido y superficial.

La esporulación es un estadio de diferenciación en *Bt*, en el cual se genera una espora que es altamente resistente a condiciones adversas. La esporulación en *Bs* depende de la actividad del regulador transcripcional *spo0A* (Phillips y Strauch, 2002; Errington, 2003; Higgins et al. 2012). Además, este factor de transcripción es capaz de activar

otros estadios de diferenciación como la formación de bio-película, competencia y motilidad (Kovács, 2016). Es por eso que el gen *spo0A* ha sido objeto de investigaciones desde sus funciones en la fisiología de las bacterias hasta su regulación genética. Dado que Spo0A~P puede activar la expresión el operón *spolIA* en los primeros estadios de esporulación, este gen ha sido utilizado como indicador del inicio de la esporulación. Veening et al 2005, diseñaron cepas con dos genes reporteros ($P_{spolIA}'yfp$ y $P_{spo0A}'cfp$) las cuales demostraron que el promotor de *spolIA* puede ser usado para monitorear la activación de Spo0A~P.

En nuestros experimentos, la cepa reportera $P_{spolIA}'gfp$ tanto en cultivo superficial como en líquido presenta un patrón de expresión en el cual un 75% de la población expresa GFP dirigida por este promotor, mientras que el resto de la población tiene reprimido este gen. Estudios de diferenciación en Bs se ha demostrado que el promotor *spolIA*, no se activa en toda la población; más bien, existen dos subpoblaciones, una que expresa *spolIA* y otra parte de la población que la no expresa (Veening et al 2005; de Jong et al. 2010; Chastanet, et al. 2010). Esta fluctuación de expresión genética se debe a las cinasas y fosfatasas dentro de fosforelevo pudieran tener una influencia en la proporción de células que expresan este promotor (Smits et al. 2006). En cultivo sólido, la proporción que expresa GFP dirigida por el promotor *spolIA* va del 25% a las 10 h hasta 60 % a los 120 h. Esto muestra que la heterogeneidad de las poblaciones es mayor en cultivo superficial.

Es interesante notar que, aunque la esporulación es alta en la población (30-80%), la subpoblación que expresa el gen *sspB* siempre se mantiene baja. Esto puede deberse a que, posterior a la maduración de la pre-espora, el bacilo debe lisarse, y la espora posteriormente pasa a un estado de actividad metabólica mínima (Veening et al. 2005). Esto implica que la transcripción de genes (incluyendo *sspB*) debe detenerse, y por lo tanto ya no detectamos fluorescencia en este punto. Además, no se pueden localizar en el citómetro de flujo, debido al tamaño inferior de las esporas en comparación con los bacilos.

Por otro lado, la cepa reportera $P_{sspB}'gfp$, demostró tener poca expresión en ambos regímenes de cultivos. Sin embargo, notamos que este gen de fases tardías de esporulación se expresó después del promotor *spoIIA* y fue visible en el microscopio de fluorescencia (Fig. 13). La expresión del promotor *sspB* se debe activar en los últimos estadios de la esporulación, ya que en la cascada de transducciones de señales de *spo0A* primero se activa *spoIIA* y posteriormente *sspB*.

Un bio-película es una comunidad compleja de células que se encuentran embebidas en una matriz extracelular de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. La regulación de la formación de bio-película en *Bs* depende del factor de transcripción Spo0A~P a baja concentración en la célula. Durante el crecimiento planctónico de *Bs*, la expresión de los operones para la biosíntesis de la matriz extracelular se encuentra bloqueada por el represor SinR, y esta represión es atenuada por SinI, permitiendo la transcripción de genes en los operones *eps* y *tapA-sipW-tas* (Chai et al. 2008; López et al. 2008; Mielich et al. 2014). En nuestro primer experimento en cultivo líquido y superficial, la cepa reportera $P_{sipW}'gfp$, mostró una alta expresión de GFP Palrededor del 80 % en la población en ambos sistemas. La cepa $P_{sinI}'gfp$ arrojó datos bastante discrepantes en cultivo superficial con respecto a la dispersión de los datos, en cultivo líquido no se observó expresión de GFP. En el segundo experimento, se obtuvo una alta expresión de la cepa reportera $P_{sipW}'gfp$ en ambos sistemas, mientras que la cepa $P_{sinI}'gfp$ no generó señal de GFP en ningún cultivo. En relación a estas discrepancias entre los dos experimentos con la cepa reportera $P_{sinI}'gfp$, se puede inferir que la cepa sufrió algún cambio durante el almacenamiento. Se necesitarían más experimentos para comprobar la actividad transcripcional de *sinI* en ambos cultivos.

Es sabido que las bacterias dentro de un bio-película son capaces de diferenciarse en subpoblaciones de células fenotípicamente distintas, pero genéticamente iguales, lo cual no necesariamente sucede en cultivo líquido (Mielich y López, 2014). Por lo tanto, esperábamos que estos genes fueran diferencialmente expresados en ambos sistemas. *Bs* ha sido el organismo modelo para estudiar estos procesos de diferenciación, sin embargo, poco se conoce sobre estas subpoblaciones en *Bt*.

Vlamakis et al. 2008, demostró por medio de fusiones transcripcionales que al menos co-existen tres distintos tipos de células en un bio-película de *Bs* maduro y que además la expresión genética es dinámica a lo largo del desarrollo del bio-película, donde existe una estricta organización espacial. La heterogeneidad espacial no puede ser observada por citometría de flujo, pero no descartamos que este fenómeno se presente en los cultivos superficiales que realizamos en Bt-HD73; en ese caso, se esperarían regiones del cultivo con más expresión de genes de diferenciación, y otras regiones del mismo cultivo con expresión menor. Por otra parte, se sabe que en un bio-película existe heterogeneidad genética, debido a la expresión bistable de los genes regulados por Spo0A~P, que incluyen a *sinI* e indirectamente a *sipW* (López et al. 2008). Con respecto a Bt, Fagerlund et al. 2014 demostraron que *sinI* y *sinR* regulan motilidad y nado al igual que en *Bs*; además *sinR* regula genes para la producción de Kurstakina; y por último, describieron que SinI/SinR regula la expresión de *hbl* (enterotoxinas), generando subpoblaciones dentro en un bio-película.

En los presentes experimentos, en ambos cultivos se expresa *sipW*, que codifica para una peptidasa encargada de cortar el péptido señal de las proteínas que serán translocadas para formar parte de los competentes de la matriz extracelular, lo cual podría estar asociado a las aglomeraciones que se presentan en ambos cultivos durante la fase de transición. Cabe resultar que no existe ningún artículo en donde se explique la regulación de este fenómeno en Bt. Por otra parte, con los experimentos de la cepa reportera $P_{sinI}::gfp$, se esperaría que este promotor se expresara en un porcentaje muy bajo de la población. Chai et al. 2007, demostró por medio fusiones transcripcionales que en *Bs* sólo el 0.02% de la población expresa *sinI*, en relación a *sinR*.

Bt se diferencia del resto de las especies del grupo *B. cereus* por su capacidad de producir proteínas con actividad entomopatógenas. En Bt, se sabe que el gen de la proteína Cry (*cryIAC*) está regulado por Spo0A (Lereclus et al. 2000; Deng et al. 2014). Por otra parte, *nprA*, es el gen que codifica a la proteasa neutra que es esencial para la supervivencia de la bacteria dentro del cadáver del insecto (Slamti et al. 2014).

Ambos estadios de diferenciación son regulados por Quorum Sensing. Con respecto a la cepa reportera $P_{cylAc}gfp$ en cultivo líquido se observó que un patrón en donde la expresión aumenta y después disminuye, en contraste con cultivo superficial se observan fluctuaciones de expresión durante el crecimiento de la bacteria. Del mismo modo sucede con la cepa reportera $P_{nprA}gfp$, en cultivo líquido se vio un patrón de puntos máximo y después un descenso en la expresión, mientras que en cultivo superficial se distinguió fluctuaciones en la detección de GFP. Estos datos pudieran estar relacionados a microambientes que se generan dentro de un bio-película que pudiera favorecer la activación de diferentes reguladores, debido a la poca dispersión de moléculas de señalización; a causa de la formación de la matriz extracelular, generando así heterogeneidad en la población.

9. CONCLUSIONES

En esta tesis se demostró que 1) En cultivo líquido y sólido aproximadamente la misma subpoblación se diferencia a esporulación, 2) una mayor cantidad de células debe activar genes de bio-película, resultando en una mayor heterogeneidad en la expresión genética relacionada a la diferenciación.

Nuestro sistema experimental que consiste en cepas reporteras de Bt con GFP que estima el porcentaje de células que expresan genes reporteros de diferenciación por medio del citómetro de flujo. Permite comparar diferentes condiciones ambientales. Además se evaluó la eficiencia de esporulación en ambos regímenes de cultivo. Nuestros datos experimentales indicaron que el estado físico no afecta de manera considerable la eficiencia de esporulación en ambos sistemas.

De igual manera, con respecto a los genes de diferenciación de esporulación no se vio una diferencia apreciable en ambos sistemas; sin embargo, en cultivo superficial se observa que el promotor *spoIIA* se expresa con mayor heterogeneidad.

En relación a los genes de bio-película, el promotor $P_{sipw}gfp$ se expresa en una subpoblación mayoritaria en ambos sistemas, lo cual podría estar relacionado con la formación de bio-película en cultivo superficial y con los agregados que se presentan en la fase de transición en cultivo líquido. Además, en cultivo superficial las cepas reporteras de virulencia presentaron ligeras diferencias con respecto al cultivo líquido, lo cual podría estar asociado a una mayor heterogeneidad genética en cultivos superficiales.

En este trabajo, logramos demostrar que en cultivo superficial existe una mayor heterogeneidad genética que pudiera estar asociado a los microambientes que se genera en este régimen de cultivo. Estas cepas reporteras son útiles para evaluar el efecto de condiciones medioambientales sobre la cantidad y calidad de biomasa en fermentaciones, en relación con la expresión de genes de diferenciación.

10. RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos en este trabajo experimental, a continuación se enumeran una serie de recomendaciones para futuros investigaciones.

- Generar de nuevo la cepa reportera $P_{sinI}^{\prime}gfp$ en Bt-HD73 y repetir experimentos de cinéticas en cultivo líquido y superficial y la evaluación de la expresión.
- Diseñar y construir cepas reporteras con fusiones transcripcionales dobles. Por ejemplo: Una misma cepa con fusiones $P_{spollA}^{\prime}gfp$ y $P_{sipW}^{\prime}yfp$ o $P_{spollA}^{\prime}gfp$ y $P_{cryIAc}^{\prime}yfp$. Con estas cepas se podría evaluar el porcentaje de células que expresan ambos genes de diferenciación o bien donde haya expresión excluyente, para estudiar interacciones ecológicas como la división de labores, cooperación, etc.
- Realizar experimentos con medios de cultivo en donde manejen las mismas unidades, por ejemplo; sobre un soporte inerte en comparación a cultivo líquido. En donde las unidades sean UFC/mL. Además, evaluar el efecto de diferentes concentraciones de componentes del medio de cultivo sobre la diferenciación por ejemplo: Fuente de carbono, nitrógeno y elementos traza, para evaluar si nuestros resultados son extrapolables a otras condiciones.
- La formación de bio-película parece ser importante durante las fermentaciones de Bt en cultivo sólido, por lo tanto, es importante estudiar este fenómeno. Para esto, proponemos generar cepas mutantes con el promotor de *sipW*, para evaluar el efecto de esta mutación sobre la aglomeración de células durante la fase de transición y otros genes reguladores como: *spo0A* y *sinI*.

11. BIBLIOGRAFÍA

Acuña, E., Gutiérrez, M., Viniegra, G., y Favela, E. (1995). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *A. niger* in submerged and solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 43(5), 808-814.

Barrios, J., Tomasini, A., Viniegra, G., y López, L. (1988). Penicillin production by solid state fermentation. *Biotechnol, Let*, 10(11), 793-798.

Agaisse, H., y Lereclus, D. (1994). Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the cryIIIA toxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol*, 13(1), 97-107.

Agaisse, H., Gominet, M., Okstad, O. A., Kolsto, A.-B., y Lereclus, D. (1999). PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol*, 32(5), 1043–1053.

Ambriz, V., Contreras-Garduño, J. A., y Pedraza-Reyes, M. (2014). Applications of flow cytometry to characterize bacterial physiological responses, *BioMed research international*, 1-14.

Anderson, I., y Jayaraman, K. (2003). Influence of carbon and nitrogen sources on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis var Galleria* for biopesticide production. *Chem. Biochem. Eng. Q*, 17(3), 225–231.

Arantes, O., y Lereclus, D. (1991). Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gen*, 108(1), 115-119.

Arcas, J., Yantorno, O., Arraras, E., y Ertola, R. (1984). A new medium for growth and delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*. *Biotechnol. Let*, 6(8), 495-500.

Aronson, A. (2002). Sporulation and δ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cell Mol. Life Sci*, 59(3), 417-425.

- Baldus, M., Green, D., Youngman, P., y Moran, P. (1994). Phosphorylation of *Bacillus subtilis* transcription factor *Spo0A* stimulates transcription from the *spoIIG* promoter by enhancing binding to weak A boxes, *J. Bacteriol*, 176(2), 296–306.
- Brehm, F., y Johnson, A. (2004). Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, 68(3), 538-559.
- Borel, B. (2017). When the pesticides run out. *Nat*, 543(7645), 302–304.
- Cairns, S., Hopley, L., y Stanley, R. (2014). Bio-película formation by *Bacillus subtilis*: new insights into regulatory strategies and assembly mechanisms, *Mol. Microbiol*, 93(4), 587-98.
- Cabrera, R., Rocha, J., Flores, V., Vázquez, L., Guarneros, G., Olmedo, G., y de la Torre, M. (2014). Regulation of sporulation initiation by NprR and its signaling peptide NprRB: molecular recognition and conformational changes, *Appl. Microbiol. Biotech*, 98(22), 9399-9412.
- Cabrera, R., Rodríguez-Romero, A., Guarneros, G., y de la Torre, M. (2016). New insights into the interaction between the quorum-sensing receptor NprR and its DNA target, or the response regulator Spo0F, *FEBS let*, 590(18), 3243-3253.
- Carrero, M., (1966). *Lucha Integrada Contra las Plagas Agrícola y Forestales*. Madrid, España: Coedición MAPA (Secretaría General Técnica) y Ediciones Mundi-Prensa.
- Chai, Y., Chu, F., Kolter, R., y Losick, R. (2008). Bistability and bio-película formation in *Bacillus subtilis*, *Mol. Microbiol*, 67(2), 254-263.
- Chastanet, A., Vitkup, D., Yuan, G. C., Norman, T. M., Liu, J. S., y Losick, R. M. (2010). Broadly heterogeneous activation of the master regulator for sporulation in *Bacillus subtilis*. *PNAS*, 107(18), 8486-8491.
- Checinska, A., Paszczynski, A., y Burbank, M. (2015). *Bacillus* and other spore-forming genera: variations in responses and mechanisms for survival. *Annu. Rev. Food Sci. Technol*, 6, 351-369.

Connors, M. J., Mason, J. M., y Setlow, P. (1986). Cloning and nucleotide sequencing of genes for three small, acid-soluble proteins from *Bacillus subtilis* spores, *J. Bacteriol*, 166(2), 417-425.

Crickmore, N., Zeigler, D., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A., y Dean, D. (2010). *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html.

Deng, C., Peng, Q., Song, F., y Lereclus, D. (2014). Regulation of cry gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Toxins*, 6(7), 2194-209.

Devi, V, Ravinder, T., y Jaidev, C. (2005). Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* by solid-state fermentation. *J. Invertebr. Pathol*, 88(2), 163-168.

de Jong, I. G., Veening, J. W., y Kuipers, O. P. (2010). Heterochronic phosphorelay gene expression as a source of heterogeneity in *Bacillus subtilis* spore formation. *J. bacteriology*, 192(8), 2053-2067.

Dignam, S. S., y Setlow, P. (1980). In vivo and in vitro synthesis of the spore-specific proteins A and C of *Bacillus megaterium*. *Int. J. Biol. Chemi*, 255(18), 8417-8423.

Dinorín, J., Delgado, J., Corona, L., Montes, M., de la Torre, M., y López, E. (2015). Reactance and resistance: main properties to follow the cell differentiation process in *Bacillus thuringiensis* by dielectric spectroscopy in real time. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99(13), 5439-5450.

Dorsch, A., Candas, M., Griko, B., Maaty, A., Midboe, G., Vadlamudi, K., y Bulla, A. (2002). Cry1A toxins of *Bacillus thuringiensis* bind specifically to a region adjacent to the membrane-proximal extracellular domain of BT-R 1 in *Manduca sexta*: involvement of a cadherin in the entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32(9), 1025-1036.

Dubois, T., Faegri, K., Perchat, S., Lemy, C., Buisson, C., Nielsen-LeRoux, C., y Lereclus, D. (2012). Necrotrophism is a quorum-sensing-regulated lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. *PLoS pathog*, 8(4), e1002629.

Dubois, T., Lemy, C., Perchat, S., y Lereclus, D. (2019). The signaling peptide NprX controlling sporulation and necrotrophism is imported into *Bacillus thuringiensis* by two oligopeptide permease systems. *Mol. Microbiol*, 112(1), 219-232.

El-Bendary, A. (2006). *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. *J. Basic Microbiol*, 46(2), 158-170.

Errington, J. (1993). *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and testigo of morphogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. R*, 57(1), 1-33.

Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol*, 1(2), 117-126.

Fagerlund, A., Dubois, T., Økstad, O. A., Verplaetse, E., Gilois, N., Bennaceur, I., y Lereclus, D. (2014). SinR controls enterotoxin expression in *Bacillus thuringiensis* biofilms. *PLoS One*, 9(1).

Foda, S., Salama, S., y Selim, M. (1985). Factors affecting growth Physiology of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 22(1), 50-52.

Faloci, M., Arcas, A., y Yantorno, M. (1985). Influence of various ions in sporulation and the formation of delta-endotoxin in *Bacillus thuringiensis* cultures. *Rev. Argent. Microbiol*. 18(2), 53-62.

Froger, A., y Hall, J. E. (2007). Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *J. Vis. Exp*, (6), e253.

Gastéllum, G., de la Torre, M., y Rocha, J. (2020). Rap Protein Paralogs of *Bacillus thuringiensis*: a Multifunctional and Redundant Regulatory Repertoire for the Control of Collective Functions. *J. Bacteriol*, 202(6).

García-Suárez, R., Verduzco-Rosas, A., Rincón-Castro, C., Délano-Frier, P., y Ibarra, E. (2017). Translocation of *Bacillus thuringiensis* in *Phaseolus vulgaris* tissues and vertical transmission in *Arabidopsis thaliana*. *J. Appl. Microbiol*, 122(4), 1092-1100.

- Gibson G., Young L., Chuang Y., Venter C., Hutchison A., y Smith O. (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods*, 6(5), 343-345.
- Gutierrez, J., Smith, R., y Pogliano, K. (2010). SpoIID-mediated peptidoglycan degradation is required throughout engulfment during *Bacillus subtilis* sporulation. *J. Bacteriol*, 192(12), 3174-3186.
- Hesseltine, C. (1987). Solid state fermentation—An overview. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 23(2), 79–89.
- Helgason, E., Økstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., y Kolstø, B. (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. One species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol*, 66(6), 2627-2630.
- Hoiczky, E., Ring, W., McHugh, A., Schwär, G., Bode, E., Krug, D., y Bode, B. (2009). Lipid body formation plays a central role in cell fate determination during developmental differentiation of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol*, 74(2), 497-517.
- Higgins, D., y Dworkin, J. (2012). Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiol. R*, 36(1), 131-148.
- Höfte, H., y Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Mol. Biol. R*, 53(2), 242-255.
- Hutchison, A., Miller, A., y Angert, R. (2016). Sporulation in bacteria: beyond the standard model. *The Bacterial Spore: from Molecules to Systems*, 87-102.
- İcgen, Y., İcgen, B., y Özcengiz, G. (2002). Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and pH. *Res. Microbiol*. 153(9), 599-604.
- Julien, B., Kaiser, A.D., y Garza, A. (2000). Spatial testigo of cell differentiation in *Myxococcus xanthus*. *PNAS*, 97(16), 9098–9103.

- Jouzani, S., Valijanian, E., y Sharafi, R. (2017). *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 101(7), 2691-2711.
- Kaltwasser, M., Wiegert, T., y Schumann, W. (2002). Construction and application of epitope- and green fluorescent protein-tagging integration vectors for *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(5), 2624–2628.
- Kovács, T. (2016). Bacterial differentiation via gradual activation of global regulators. *Curr. Genet*, 62(1), 125-128.
- Lambert, B., y Peferoen, M. (1992). Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. *BioScience*, 42(2), 112-122.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Grandvalet, C., Salamitou, S., y Gominet, M. (2000). Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *Int. J. Med. Microbiol*, 290(5), 295-299.
- Lindow, S. E. (1995). The use of reporter genes in the study of microbial ecology. *Mol. Ecol*, 4(5), 555-566.
- Lima, J., López, M., Viniegra, G., y Loera, O. (2019). Solid-state fermentation of *Bacillus thuringiensis var kurstaki* HD-73 maintains higher biomass and spore yields as compared to submerged fermentation using the same media. *Bioproc. Biosyst. Eng*, 42(9), 1527-1535.
- Lopez, D., Vlamakis, H., y Kolter, R. (2009). Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev*, 33(1), 152–163.
- López, E., y De la Torre, M. (2005). Redirection of metabolism during nutrient feeding in fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 67(2), 254-260.
- Losick, R., y Stragier, P. (1992). Crisscross regulation of celltype-specific gene expression during development in *B. subtilis*. *Nature*, 355(6361), 601–604.

- Mazid, S., Kalida, C., y Rajkhowa R. (2011) A review on the use of biopesticides in insect pest management. *Int. J. Sci. Adv. Technol*, 1(7), 169–178.
- Melo, A., Soccol, T. y Soccol, R. (2014). *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Crit. Rev. Biotechnol*. 36(2), 317-326.
- Mielich, B., y Lopez, D. (2015). Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* bio-película formation. *Environ. Microbiol*, 17 3, 555-65.
- Miller, B., y Bassler, L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol*, 55(1), 165–99.
- Moir, A. (2006). How do spores germinate? *J. Appl. Microbiol*. 101(3), 526-530.
- Muro, M., Brenes M., y Vioque, A. (2017). A combinatorial strategy of alternative promoter use during differentiation of a heterocystous cyanobacterium. *Environ. Microbiol. Rep*, 9(4), 449–458.
- Nickerson, W., y Bulla, A. (1974). Physiology of sporeforming bacteria associated with insects: minimal nutritional requirements for growth, sporulation, and parasporal crystal formation of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol*. 28(1), 124-128.
- O'Connor, K. A., & Zusman, D. R. (1991). Development in *Myxococcus xanthus* involves differentiation into two cell types, peripheral rods and spores. *J. Bacteriol*, 173(11), 3318–3333.
- Ohlsen, K. L., Grimsley, J. K., & Hoch, J. A. (1994). Deactivation of the sporulation transcription factor Spo0A by the Spo0E protein phosphatase. *PNAS*, 91(5), 1756-1760.
- Pacheco, S., Gómez, I., Gill, S., Bravo, A., y Soberón, M. (2009). Enhancement of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins by fragments of a toxin-binding cadherin correlates with oligomer formation. *Peptides*, 30(3), 583–588.
- Perego, M. (2013). Forty years in the making: understanding the molecular mechanism of peptide regulation in bacterial development. *PLoS Biol*, 11(3).

Phillips, V., y Strauch, A. (2002). *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.* 59(3), 392–402.

Pérez, D. (2016). Comparación de la esporulación de *Bacillus thuringiensis* en medio sólido o líquido. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez Chiapas, México.

Perez-Pascual, D., Monnet, V., & Gardan, R. (2016). Bacterial cell–cell communication in the host via RRNPP peptide-binding regulators. *Front. Microbiol.*, 7(706).

Rutherford, T., y Bassler, L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2(11), a012427.

Robertson, B., Gocht, M., Marahiel, A., y Zuber, P. (1989). AbrB, a regulator of gene expression in *Bacillus*, interacts with the transcription initiation regions of a sporulation gene and an antibiotic biosynthesis gene. *PNAS*, 86(21), 8457–8461.

Rocha J., Aceves E., Guarneros G., y de la Torre M. (2010). The RNPP family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87(3), 913–923.

Rocha, J., Flores, V., Cabrera, R., Soto-Guzmán, A., Granados, G., Juaristi, E., y 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(4), 1069-1078.

Sella, R., Vandenberghe, P., y Soccol, R. (2014). Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiol. Res.*, 169(12), 931-939.

Shapiro, A. (1988). Bacteria as multicellular organisms. *Sci. Am.*, 258(6), 82-89.

Silhavy, J. (2000). Gene fusions. *J. Bacteriol.*, 182(21), 5935-5938.

Slamti, L., Perchat, S., Huillet, E., y Lereclus, D. (2014). Quorum sensing in *Bacillus thuringiensis* is required for completion of a full infectious cycle in the insect. *Toxins*, 6(8), 2239-2255.

- Smits, K., Kuipers, P., y Veening, W. (2006). Phenotypic variation in bacteria: the role of feedback regulation. *Nat. Rev. Microbiol*, 4(4), 259-271.
- Strauch, M., Webb, V., Spiegelman, G., y Hoch, A. (1990). The SpoOA protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene. *PNAS*, 87(5), 1801- 1805.
- Setlow, P. (1988). Small, acid-soluble spore proteins of *Bacillus species*: Structure, synthesis, genetics, function, and degradation. *Annu. Rev. Microbiol*, 42(1), 319–338.
- Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J. Appl. Microbiol*, 101(3),514–25.
- Soberón, M., y Bravo, A. (2008). Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Una ventana al quehacer científico, Instituto de Biotecnología de la UNAM*, 25, 303-314.
- Scherrer, P., Luthy, P., y Trumpi, B. (1973). Production of δ -Endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a function of glucose concentrations. *Appl. Microbiol.* 25(4), 644–646.
- Valdivia, H., y Falkow, S. (1998). Flow cytometry and bacterial pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol*, 1(3), 359-363.
- Van Kan, A. (2006) Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophicplant pathogen. *Trends Plant Sci*, 11(5), 247–253.
- Veening, W., Hamoen W., Kuipers, P. (2005) Phosphatases modulate the bistable sporulation gene expression pattern in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 56(6),1481–1494.
- Verdugo, A., Gastélum, G., Rocha, J., y de la Torre, M. (2020). Multiple and overlapping functions of quorum sensing proteins for cell specialization in *Bacillus* species. *J. Bacteriol.*
- Verplaetse, E., Slamti, L., Gohar, M., y Lereclus, D. (2015). Cell differentiation in *Bacillus thuringiensis* population during planktonic growth, bio-película formation, and host infection. *mBio*, 6(3), 1–10.

Verplaetse, E., Slamti, L., Gohar, M., y Lereclus, D. (2017). Two distinct pathways lead *Bacillus thuringiensis* to commit to sporulation in bio-película. *Res. Microbiol*, 168(4), 388-393.

Viniegra, G. (2014). New horizons for the production of industrial enzymes by solid-state fermentation. In *Biosystems Engineering: Biofactories for Food Production in the Century XXI* (pp. 319-340). Springer, Cham.

Viniegra, G., Favela, E., Aguilar, C., de Jesús Romero, S., Díaz, G., y Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem. Eng J.* 13(2), 157-16.

Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R., y Kolter, R. (2008). Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes Dev.* 22(7), 945–953.

Vlamakis, H., Chai, Y., Beaugerard, P., Losick, R., y Kolter, R. (2013) .Sticking together: building a bio-película the *Bacillus subtilis* way. *Nature Rev. Microbiol*, 11(3), 157–168.

Waters, M., y Bassler, L. (2005). QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 21(1), 319–346.

Wakisaka, Y., Masaki, E., y Nishimoto, Y. (1982). Formation of crystalline δ -endotoxin or poly- β -hydroxybutyric acid granules by asporogenous mutants of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43(6), 1473-1480.

Yansura, D. C. & Henner, D. J. (1984). Use of the *Escherichia colilac* repressor and operator to control gene expression in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 81,439-443.

Zhang, C., Laurent, S., Sakr, S., Peng, L., y Bédu, S. (2005). Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria: a chorus of signals. *Mol. Microbiol*, 59(2), 367–375.

Zhao, S., Hu, N., Huang, J., Liang, Y., & Zhao, B. (2008). High-yield spore production from *Bacillus licheniformis* by solid state fermentation. *Biotechnol. Lett.* 30(2), 295–297.

12. ANEXOS

12.1. Medios de cultivos y solución amortiguadora (Anexo 1)

⇒ Medio BHI (Brain Infusion Agar)

Componente	Cantidad (g/L)
Infusión de cerebro y corazón (sólidos)	8
Digerido péptico de tejido animal	5
Digerido pancreático de caseína	16
Cloruro sódico	5
Glucosa	2
Fosfato disódico de hidrógeno	2.5

⇒ Medio limpio

Componente	Cantidad (g/L)
Glucosa	12
Peptona de soya	12
Extracto de levadura	2.59
MgSO₄· 7H₂O	0.2
MnSO₄	0.04
ZnSO₄· 7H₂O	0.0058
CuSO₄· 5H₂O	0.0075
KCl	3
FeSO₄· 7H₂O	0.00135
CoCl₂· 5H₂O	0.03

Fuente: (Dinorín, 2015).

⇒ Amortiguador EB

Componente	Cantidad
Sacarosa	0.625 M
MgCl₂	1 mM

12.2. Secuencias (Anexo 2)

Alineamiento de secuencia teórica vs secuencia obtenida para cada fusión transcripcional.

P_{spollA'gfp}

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2113 bits (1144)	0.0	1151/1154 (99%)	1/1154 (0%)	Plus/Plus
Query 1	TGGTGGGAGTTATTTAAAAGAAGTTTGGGATGTTTCAACATCAAATAGCGGCAAATA	60		
Sbjct 1	TGGTGGGAGTTATTTAAAAGAAGTTTGGGATGTTTCAACATCAAATAGCGGCAAATA	60		
Query 61	TTTGGCCGCTTTTCTATTCGTATGTAAGTGAATAATGCTGAAAGGTTTCACTTTATGACG	120		
Sbjct 61	TTTGGCCGCTTTTCTATTCGTATGTAAGTGAATAATGCTGAAAGGTTTCACTTTATGACG	120		
Query 121	AAATAGTTCTTCTTTTGTGTCAGCAGGAAGGATTCTTATTTTGTATCACGAAAATCTTTATG	180		
Sbjct 121	AAATAGTTCTTCTTTTGTGTCAGCAGGAAGGATTCTTATTTTGTATCACGAAAATCTTTATG	180		
Query 181	TATGTGAATAAGTAAAGTTTGTGAGCATAAGGAGGGAAGGAGATATACATATGGCTAGCAAA	240		
Sbjct 181	TATGTGAATAAGTAAAGTTTGTGAGCATAAGGAGGGAAGGAGATATACATATGGCTAGCAAA	240		
Query 241	GGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAAT	300		
Sbjct 241	GGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAAT	300		
Query 301	GGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCTACATACGAAAGCTTACC	360		

Sbjct 301 GGACACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCTACATACGGAAAGCTTACC 360

 Query 361 CTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACT 420
 |||
 Sbjct 361 CTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACT 420

 Query 421 TTGACCTATGGTGTCAATGCTTTTCCCGTTATCCGGATCATATGAAACGGCATGACTTT 480
 |||
 Sbjct 421 TTGACCTATGGTGTCAATGCTTTTCCCGTTATCCGGATCATATGAAACGGCATGACTTT 480

 Query 481 TTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAACGCACTATATCTTTCAAAGATGAC 540
 |||
 Sbjct 481 TTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAACGCACTATATCTTTCAAAGATGAC 540

 Query 541 GGGAACTACAAGACGCGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATCGTATC 600
 |||
 Sbjct 541 GGGAACTACAAGACGCGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATCGTATC 600

 Query 601 GAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTCGGACACAAACTCGAGTAC 660
 |||
 Sbjct 601 GAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTCGGACACAAACTCGAGTAC 660

 Query 661 AACTATAACTCACACAATGTATACATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGCT 720
 |||
 Sbjct 661 AACTATAACTCACACAATGTATACATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGCT 720

 Query 721 AACTTCAAATTCGCCACAACATTGAAGATGGATCCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAA 780
 |||
 Sbjct 721 AACTTCAAATTCGCCACAACATTGAAGATGGATCCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAA 780

 Query 781 CAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCGACA 840
 |||
 Sbjct 781 CAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCGACA 840

```

Query 841 CAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGCGTGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTT 900
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 841 CAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGCGTGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTT 900

Query 901 GTAAGTGTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAGCTCTACAAATAATGAATTCGAGCA 960
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||
Sbjct 901 GTAAGTGTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAGCCCTACAAATAATGAATTCGAGCA 960

Query 961 CTAGTGCAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTCCATGCAAGCTAATTCCGGTGGAAACG 1020
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct 961 CTAGTGCAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTCCATGCAAGCTAATT-CGGTGGAAACG 1019

Query 1021 AGGTCATCATTTCCTTCCGAAAAACGGTTGCATTTAAATCTTACATATGTAATACTTTC 1080
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct 1020 AGGTCATCATTTCCTTCCGAAAAACGGTTGCATTTAAATCTTACATATGTAATACTTTC 1079

Query 1081 AAAGACTACATTTGTAAGATTTGATGTTTGAGTCGGCTGAAAGATCGTACGTACCAATTA 1140
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct 1080 AAAGACTACATTTGTAAGATTTGATGTTTGAGTCGGCTGAAAGATCGTACGTACCAATTA 1139

Query 1141 TTGTTTCGTGATTG 1154
          |||||||||||
Sbjct 1140 TTGTTTCGTGATTG 1153

```

P_{sipw'gfp}

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2084 bits(1128)	0.0	1137/1141(99%)	1/1141(0%)	Plus/Plus
Query 1	TGAAATCAGAAGGTAAATAAATTACTAATAAAAAAGACTGTGTAAAATTTTGGCACAGTCT	60		
Sbjct 1	TGAAATCAGAAGGTAAATAAATTACTAATAAAAAAGACTGTGTAAAATTTTGGCACAGTCT	60		
Query 61	TTTTTCTATATTTTAAATAACTAATAATTGTAAATTTTCTTATTGCAATAACTTAAAGTT	120		
Sbjct 61	TTTTTCTATATTTTAAATAACTAATAATTGTAAATTTTCTTATTGCAATAACTTAAAGTT	120		
Query 121	CGTTATATCATTACTTGTGTTCTTGTTAAAGAACGTAAGCGGATATTGCATACTTCAAA	180		
Sbjct 121	CGTTATATCATTACTTGTGTTCTTGTTAAAGAACGTAAGCGGATATTGCATACTTCAAA	180		
Query 181	TAATATAAAACAACGGAGAGGAAGGAGATATACATATGGCTAGCAAAGGAGAAGAACTTT	240		
Sbjct 181	TAATATAAAACAACGGAGAGGAAGGAGATATACATATGGCTAGCAAAGGAGAAGAACTTT	240		
Query 241	TCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAAATTTT	300		
Sbjct 241	TCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAAATTTT	300		
Query 301	CTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCTACATACGAAAGCTTACCCTTAAATTTATTT	360		
Sbjct 301	CTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCTACATACGAAAGCTTACCCTTAAATTTATTT	360		
Query 361	GCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTGACCTATGGTG	420		
Sbjct 361	GCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTGACCTATGGTG	420		


```

          |||
Sbjct  961  CCTAATGAGCGGGCTTTTTTCCATGCAAGCTAATT-CGGTGGAAACGAGGTCATCATTT 1019

Query  1021  CTTCGAAAAAACGGTTGCATTTAAATCTTACATATGTAATACTTCAAAGACTACATTT 1080
          |||
Sbjct  1020  CTTCGAAAAAACGGTTGCATTTAAATCTTACATATGTAATACTTCAAAGACTACATTT 1079

Query  1081  GTAAGATTTGATGTTTGAGTCGGCTGAAAGATCGTACGTACCAATTATTGTTTCGTGATT 1140
          |||
Sbjct  1080  GTAAGATTTGATGTTTGAGTCGGCTGAAAGATCGTACGTACCAATTATTGTTTCGTGATT 1139

Query  1141  G 1141
          |
Sbjct  1140  G 1140

```

P_{sspB'gfp}

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2196 bits(1189)	0.0	1196/1199 (99%)	1/1199 (0%)	Plus/Plus
Query 1	TATGATGAGATTATTCAGGAAGTGAGAGGTACGGATCTTTTTGCTTCCTTAGAATGGTTT	60		
Sbjct 1	TATGATGAGATTATTCAGGAAGTGAGAGGTACGGATCTTTTTGCTTCCTTAGAATGGTTT	60		
Query 61	GGACATAATGCAAAAGAGATATTTAAAAGAAGAAATGAAAGTATTAATAAATAGAAAATTA	120		
Sbjct 61	GGACATAATGCAAAAGAGATATTTAAAAGAAGAAATGAAAGTATTAATAAATAGAAAATTA	120		
Query 121	GAAGTAGTAACTTCGTAATGTGAAATGATGTGAGAGTCTCGTTTTAGAGGCTCttttttt	180		
Sbjct 121	GAAGTAGTAACTTCGTAATGTGAAATGATGTGAGAGTCTCGTTTTAGAGGCTCTTTTTTT	180		
Query 181	ATGGTAAAAAATAACCAAAAATTTCCATGTATTTAATTTGAATTTAACACAATTTATAT	240		
Sbjct 181	ATGGTAAAAAATAACCAAAAATTTCCATGTATTTAATTTGAATTTAACACAATTTATAT	240		
Query 241	ATAAATAAGGAGGTGATGGAAGGAGATATACATATGGCTAGCAAAGGAGAAGAACTTTTC	300		
Sbjct 241	ATAAATAAGGAGGTGACGGAAGGAGATATACATATGGCTAGCAAAGGAGAAGAACTTTTC	300		
Query 301	ACTGGAGTTGTCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCT	360		
Sbjct 301	ACTGGAGTTGTCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCT	360		
Query 361	GTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCTACATACGAAAGCTTACCCTTAAATTTATTTGC	420		
Sbjct 361	GTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCTACATACGAAAGCTTACCCTTAAATTTATTTGC	420		

```

Query 421 ACTACTGGAAAACACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTGACCTATGGTGTT 480
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 421 ACTACTGGAAAACACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTGACCTATGGTGTT 480

Query 481 CAATGCTTTTCCCGTTATCCGGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATG 540
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 481 CAATGCTTTTCCCGTTATCCGGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATG 540

Query 541 CCCGAAGGTTATGTACAGGAACGCACTATATCTTTCAAAGATGACGGGAACACAAGACG 600
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 541 CCCGAAGGTTATGTACAGGAACGCACTATATCTTTCAAAGATGACGGGAACACAAGACG 600

Query 601 CGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATCGTATCGAGTTAAAAGGTATT 660
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 601 CGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATCGTATCGAGTTAAAAGGTATT 660

Query 661 GATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTCGGACACAAACTCGAGTACAACATAACTCACAC 720
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 661 GATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTCGGACACAAACTCGAGTACAACATAACTCACAC 720

Query 721 AATGTATACATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGCTAACTTCAAATTCGC 780
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 721 AATGTATACATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGCTAACTTCAAATTCGC 780

Query 781 CACAACATTGAAGATGGATCCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATT 840
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 781 CACAACATTGAAGATGGATCCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATT 840

Query 841 GGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCGACACAATCTGCCCTTTCG 900
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 841 GGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCGACACAATCTGCCCTTTCG 900

Query 901 AAAGATCCCAACGAAAAGCGTGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAAGTCTGCTGGG 960
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 901 AAAGATCCCAACGAAAAGCGTGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAAGTCTGCTGGG 960

Query 961 ATTACACATGGCATGGATGAGCTCTACAAATAATGAATTCGAGCACTAGTGCAGCCCGCC 1020
          ||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

```


P_{sinI'gfp}

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2507 bits(1357)	0.0	1369/1374(99%)	3/1374(0%)	Plus/Plus
Query 1	TTCAGCATATGCAGATTGAGTGCCAGCTCCGAATGAAAGGCCTAATACAGCTGTCAATGC	60		
Sbjct 1	TTCAGCATATGCAGATTGAGTGCCAGCTCCGAATGAAAGGCCTAATACAGCTGTCAATGC	60		
Query 61	GATTGATGACAAAAC TTTTGAACGGTTTCTTGTTTCATCCCTTATTTCTCCCCTaataa	120		
Sbjct 61	GATTGATGACAAAAC--TTTGAACGGTTTCTTGTTTCATCCCTTATTTCTCCCCTAATAA	118		
Query 121	ataaatatgtattacaaattaaattttattaaaaattcaatattttttcaatatttagtca	180		
Sbjct 119	ATAATATGTATTACAAATTAATTTTATTAAAAATTCAATATTTTTTCAATATTTAGTCA	178		
Query 181	tattatgtaatg tttttaatatatttGTAAAAATTCATAGTTAGCATACGAATATATCA	240		
Sbjct 179	TATTATGTAATGTTTTAATATATTTGTAAAAATTCATAGTTAGCATACGAATATATCA	238		
Query 241	CAATTCAACAATGTTTTCTGAAAATATTGAAAGTTTTTATCGAACAATTTATAATTTCCA	300		
Sbjct 239	CAATTCAACAATGTTTTCTGAAAATATTGAAAGTTTTTATCGAACAATTTATAATTTCCA	298		
Query 301	TAGAGGGAGTTTAATGGGGATTTTATCTTTGTTTCATCTACACAATATTTGATAATTCAC	360		
Sbjct 299	TAGAGGGAGTTTAATGGGGATTTTATCTTTGTTTCATCTACACAATATTTGATAATTCAC	358		
Query 361	TATATAAACACAAAATCGGATTTTATTATCATGTATTCTGTAGCAGCAATTATGACCGA	420		
Sbjct 359	TATATAAACACAAAATCGGATTTTATTATCATGTATTCTGTAGCAGCAATTATGACCGA	418		

P_{spac}

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1834 bits(993)	0.0	998/1000 (99%)	1/1000 (0%)	Plus/Plus
Query 1	TTGACTTTATCTACAAGGTGTGGCATAATGTGTGTAATTGTGAGCGGATAACAATTAAGG	60		
Sbjct 1	TTGACTTTATCTACAAGGTGTGGCATAATGTGTGTAATTGTGAGCGGATAACAATTAAGG	60		
Query 61	AAGGAGATATACATATGGCTAGCAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTC	120		
Sbjct 61	AAGGAGATATACATATGGCTAGCAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTC	120		
Query 121	TTGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAG	180		
Sbjct 121	TTGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAG	180		
Query 181	GTGATGCTACATACGAAAGCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTG	240		
Sbjct 181	GTGATGCTACATACGAAAGCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTG	240		
Query 241	TTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTGACCTATGGTGTTCAATGCTTTTCCCGTTATC	300		
Sbjct 241	TTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTGACCTATGGTGTTCAATGCTTTTCCCGTTATC	300		
Query 301	CGGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGG	360		
Sbjct 301	CGGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGG	360		
Query 361	AACGCACTATATCTTTCAAAGATGACGGGAACACAAGACGCGTGCTGAAGTCAAGTTTG	420		
Sbjct 361	AACGCACTATATCTTTCAAAGATGACGGGAACACAAGACGCGTGCTGAAGTCAAGTTTG	420		
Query 421	AAGGTGATACCCTTGTTAATCGTATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAA	480		

Sbjct 421 AAGGTGATACCCTTGTAAATCGTATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAA 480

Query 481 ACATTCTCGGACACAAACTCGAGTACAACATAACTCACACAATGTATAACATCACGGCAG 540
 |||

Sbjct 481 ACATTCTCGGACACAAACTCGAGTACAACATAACTCACACAATGTATAACATCACGGCAG 540

Query 541 ACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGCTAACTTCAAATTCGCCACAACATTGAAGATGGAT 600
 |||

Sbjct 541 ACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGCTAACTTCAAATTCGCCACAACATTGAAGATGGAT 600

Query 601 CCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTT 660
 |||

Sbjct 601 CCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTT 660

Query 661 TACCAGACAACCATTACCTGTCGACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGC 720
 |||

Sbjct 661 TACCAGACAACCATTACCTGTCGACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGC 720

Query 721 GTGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAAGTCTGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATG 780
 |||

Sbjct 721 GTGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAAGTCTGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATG 780

Query 781 AGCTCTACAAATAATGAATTCGAGCACTAGTGCAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTC 840
 |||

Sbjct 781 AGCCCTACAAATAATGAATTCGAGCACTAGTGCAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTC 840

Query 841 CATGCAAGCTAATTCGGTGGAACGAGGTCATCATTTCTTCCGAAAAAACGGTTGCAT 900
 |||

Sbjct 841 CATGCAAGCTAATT-CGGTGGAACGAGGTCATCATTTCTTCCGAAAAAACGGTTGCAT 899

Query 901 TTAAATCTTACATATGTAATACTTTCAAAGACTACATTTGTAAGATTTGATGTTTGAGTC 960
 |||

Sbjct 900 TTAAATCTTACATATGTAATACTTTCAAAGACTACATTTGTAAGATTTGATGTTTGAGTC 959

Query 961 GGCTGAAAGATCGTACGTACCAATTATTGTTTCGTGATTG 1000
 |||

Sbjct 960 GGCTGAAAGATCGTACGTACCAATTATTGTTTCGTGATTG 999

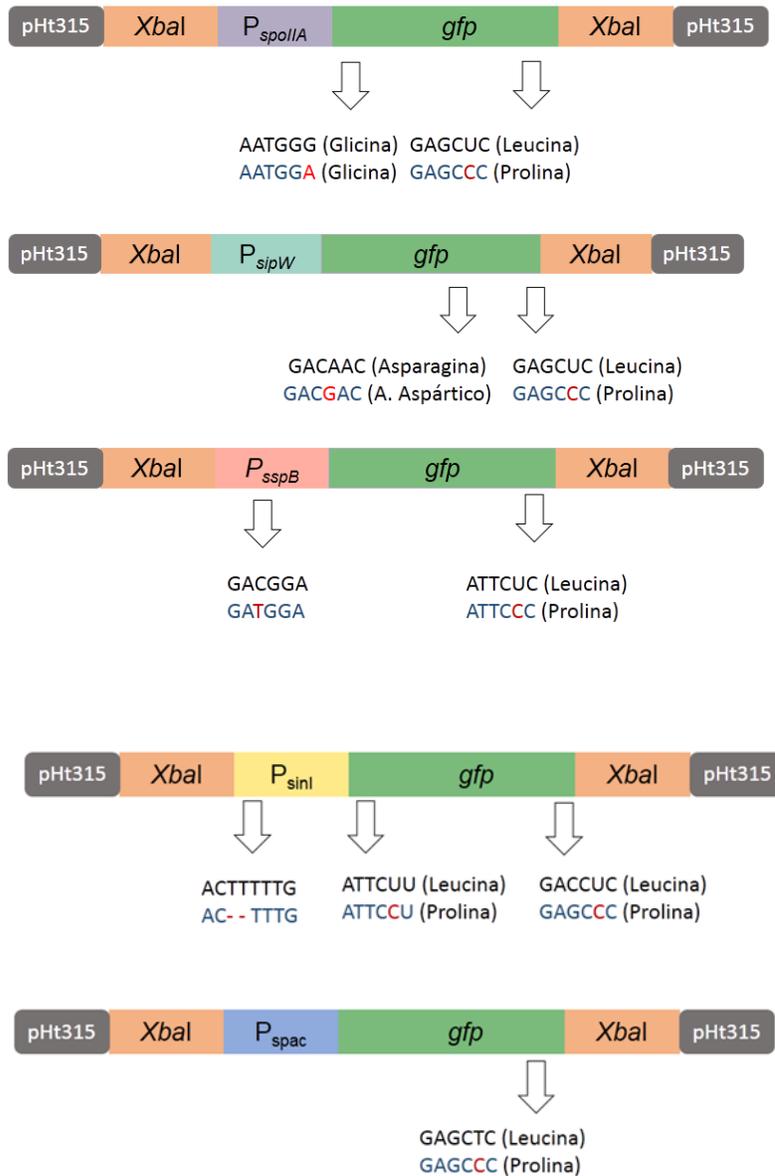


Fig. 27. Esquema de mutaciones presentadas en la secuenciación de Sanger. Se comparó la secuenciación teórica (letras negras) con la secuencia obtenida (letras azules). Las flechas indican en donde se encontró la mutación. Las líneas en rojo señalan la ausencia de nucleótidos (delección). Las letras en rojo indican en que nucleótido se presentó la mutación (sustitución). Cuando se presentó una mutación, se evaluó si el triplete codifica para otro aminoácido.

