



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

TESIS

"Morfología y fisiología de *Bacillus thuringiensis* Y<sub>15</sub> y EA<sub>3</sub> cultivados en concentraciones elevadas de glucosa: Cultivo líquido vs Cultivo sólido"

PRESENTA:

**M. Bt. Briseida Flores Tufiño**

MATRICULA:

**2163807807**

Para obtener el grado de

**Doctora En Biotecnología**

DIRECTOR:

**Dr. Octavio Loera Corral**

ASESORES:

**Dr. Gustavo Viniegra González**

**Dr. Francisco Javier Figueroa Martínez**

JURADO:

**Presidente: Dr. Marcos López Pérez**

**Secretario: Dr. Francisco Javier Figueroa Martínez**

**Vocal: Dr. Jorge Eugenio Ibarra Rendón**

**Vocal: Dr. Jorge Lima Pérez**

Ciudad de México, 10 diciembre 2021

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

Ciudad de México a \_\_\_\_ de Diciembre del 2021.

El jurado designado por la

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

**Morfología y fisiología de *Bacillus thuringiensis* Y15 y EA3 cultivados en concentraciones elevadas de glucosa: Cultivo líquido vs Cultivo sólido**

que presentó

M. Bt. Briseida Flores Tufiño

**Comité Tutorial:**

Director: Dr. Octavio Loera Corral

Asesor: Dr. Gustavo Viniegra González

Asesor: Dr. Francisco J. Figueroa Martínez

**Jurado:**

Presidente: Dr. Marcos Lopez Pérez

Secretario: Dr. Francisco Javier Figueroa Martínez

Vocal: Dr. Jorge Eugenio Ibarra Rendon

Vocal: Dr. Jorge Lima Pérez

***“Cuestionen la autoridad.*** Ninguna idea es verdadera solo porque alguien más lo dice, piensen por sí mismos, cuestionéense a sí mismos

***No crean en algo solo porque quieren creer.*** Creer en algo no lo hace verdadero,  
***Prueben sus ideas por medio de la evidencia obtenida de la observación y experimentación.***

Si una idea favorita falla una prueba bien diseñada, está equivocada, supérenlo.

***Sigan la evidencia hasta donde esta los lleve.***

Si no tienen evidencia resérvense su juicio

***Podríamos equivocarnos. Somos humanos.***

***La ciencia es una forma de evitar engañarnos a nosotros mismos y a los demás.”***

***Sin miedo a la oscuridad. Cosmos.***

## **AGRADECIMIENTOS:**

A CONACYT por la beca otorgada

Al Dr. Jorge Ibarra y al Dr. Marcos López por las observaciones realizadas al trabajo final y haber aceptado participar como sinodales de este trabajo, sus comentarios ayudaron a mejorar la tesis y sobre todo darme una visión diferente a la que pude haber tenido.

Al Dr. Gustavo Viniegra por todo el apoyo y comentarios que ayudaron en cada etapa del proyecto e impulsar la colaboración entre los estudiantes, le agradezco todas las críticas realizadas en los seminarios de grupo que me ayudaron a desarrollar habilidades de comunicación y a mejorar el proyecto con las observaciones siempre tan atinadas.

Al Dr. Octavio Loera por haberme abierto las puertas al laboratorio desde la maestría, por la paciencia y confianza que ha tenido en mí y en el proyecto, estos años han sido de mucho aprendizaje académico y profesional para mí, le agradezco mucho la oportunidad y sobre todo la ayuda a terminar lo mejor posible este proyecto. Esta oportunidad me ha permitido disfrutar mucho de trabajo experimental, de la compañía de muchas personas extraordinarias de las que siempre tuve algo que aprender. Me llegue a sentir como en casa por mucho tiempo y eso siempre le agradeceré.

Al Dr. Francisco Figueroa, Paco muchas gracias por todo el apoyo, conocimiento, paciencia y sobre todo por la amistad que pude encontrar en ti, las pláticas de ánimo me ayudaron muchísimo. Gracias por la ayuda en esos momentos de bloqueo en los que tu perspectiva ayudo mucho a mejorar este proyecto. Tiene mi gratitud eterna por que aun sin ser tu responsabilidad de has ayudado tanto.

Al Dr. Jorge Lima, primero por aceptar participar como sinodal del trabajo y las observaciones realizadas que fueron de mucha ayuda, y segundo por la amistad que me brindo por el tiempo que compartimos en el laboratorio. Sin esos momentos de des estrés y de compartir puntos de vista esto no sería posible. Muchísimas gracias.

A los compañeros de laboratorio, la Dra. Jazmín que siempre tuvo palabras de ánimo y observaciones que ayudaron siempre a mejorar este trabajo, al Dr. Miguel

por siempre llegar con toda la actitud, las pláticas entre lectura y lectura siempre ayudaban a distraer la mente. A Gera que junto a Neko y Jorge siempre era una fiesta, pláticas interminables de tantas cosas, gracias por todo el apoyo no solo académico que ayudo a continuar en este arduo trabajo. Gracias también a Emmanuel, Norberto, Daniel Solís, Daniel Torres y Héctor quienes siempre tuvieron palabras de apoyo, quienes a lo largo de este doctorado ayudaron siempre con sus observaciones en los seminarios a mejorar el proyecto, pero sobre todo por el apoyo que recibí en el laboratorio por parte de todos ustedes.

A mis queridas Pau, Liz, Viri, Sina, Ale y Jessi, todo mi amor y gratitud esta con ustedes, aunque contemplamos áreas diferentes de la biotecnología siempre estuvieron para escucharme con todas las alternativas para mejorar, rediseñar e intentar cosas nuevas, les agradeceré siempre esas comidas, esas charlas en la banca, o las papitas en los cubículos, han sido de lo mejor de esta experiencia, he aprendido muchísimo de todas ustedes y me han inspirado como no tienen idea. Realmente muchísimas gracias.

A Iván muchas gracias por convertirte en mi mejor amigo, durante esta etapa de mi vida tu amistad ha sido de los más lindo que me ha pasado, te agradezco todo el apoyo que me diste cuando menos lo pensé, estuviste y estas siempre al pie del cañón para escucharme, aconsejarme, pero sobre todo para ayudarme a mejora, mil gracias por todo.

A todos los que han estado presentes en este mi proyecto de vida, mis amigos, mi familia, todos han participado en mi crecimiento profesional y personal. Quisiera mencionar a todos, pero tampoco quiero olvidar a nadie.

En especial quiero agradecer a mis padres, Griselda y Salvador, tal vez era muy pequeña para darme cuenta de todos los sacrificios que realizaron por mí, pero ahora estoy muy agradecida con ustedes, sin ese sacrificio yo no podría estar dado este paso. Gracias por todo, pero sobre todo por siempre estar.

## Contenido

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	iii
<b>1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	1
1.2 Proceso de esporulación.....	2
1.3 Toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	6
1.4 Proteína Cry .....	7
1.5 Modo de acción.....	9
1.6 Producción de <i>B. thuringiensis</i> : Cultivo en medio líquido vs. Cultivo en medio sólido.....	11
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>15</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>18</b>
<b>5. OBJETIVO .....</b>	<b>19</b>
5.1 General .....	19
5.2 Específicos .....	19
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
6.1 Estrategia experimental .....	20
6.2 Microorganismo .....	20
6.3 Conservación de cepas.....	20
6.4 Preparación de inóculo y medios de cultivo.....	20
6.5 Cultivo en medio líquido.....	22
6.6 Cultivo en medio sólido .....	22
6.7 Cuantificación de biomasa.....	22
6.8 Cuantificación de esporas .....	23
6.9 Viabilidad de esporas .....	23
6.10 Microscopía Electrónica de Barrido.....	23
6.11 Proteína total .....	23
6.12 Expresión de proteína Cry .....	24
6.13 Bioensayo.....	24
6.14 Análisis estadístico.....	25
<b> 7. RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>

---

<b>7.1 Producción de biomasa</b> .....	26
<b>7.2 Biomasa retenida</b> .....	28
<b>7.3 Producción de esporas</b> .....	29
<b>7.4 Esporas retenidas</b> .....	31
<b>7.5 Microscopía electrónica de barrido</b> .....	33
<b>7.6 Viabilidad de esporas</b> .....	37
<b>7.7 Proteína total</b> .....	38
<b>7.8 Proteína Cry</b> .....	39
<b>7.9 Bioensayo</b> .....	49
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	51
<b>9. RESUMEN DE RESULTADOS</b> .....	64
<b>10. CONCLUSIONES</b> .....	66
<b>11. PERSPECTIVAS</b> .....	67
<b>12.REFERENCIAS</b> .....	68
<b>ANEXO: Listado de productos</b> .....	87

## RESUMEN

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria mundialmente conocida por la capacidad de producir cristales con características insecticidas, esta propiedad ha sido utilizada para la elaboración de formulados comerciales que han logrado posicionarse entre los más vendidos en el mercado de los bioinsecticidas. En la última década se ha explorado al cultivo en medio sólido como una alternativa para la producción de *B. thuringiensis*, mejorando los rendimientos de esporas y cristales que esta bacteria produce. Principalmente se han utilizado residuos agroindustriales como soporte y fuente de nutrientes para la producción de esporas y cristales, sin embargo, la comparación entre lo producido entre cultivo sólido y líquido tiene un sesgo en cuanto a la cantidad de nutrientes en los medios o soportes utilizados. El uso de soportes inertes como la espuma de poliuretano permite una comparación justa entre ambos sistemas de cultivo al poder utilizar el mismo medio.

Aunque se ha demostrado que el uso de soportes inertes como la espuma de poliuretano mejora la producción de esporas y cristales de *B. thuringiensis* aun utilizando el mismo medio de cultivo en ambos sistemas, no es claro cuáles son los factores que influyen para que esto sea posible, en el trabajo que se presenta a continuación se pretende determinar los cambios fisiológicos y morfológicos que sufre la bacteria al cultivarse en ambos medios de cultivo para identificar qué factores influyen en el aumento en la producción y calidad de las esporas y cristales.

Se utilizaron dos cepas de *B. thuringiensis*, las cuales fueron cultivadas en medios con alta concentración de glucosa, en cultivo líquido y cultivo sólido. Durante diferentes tiempos de muestreo se determinó la cantidad de biomasa y esporas producidas. Al ser una bacteria capaz de producir biopelícula se determinó si existía retención del producto en las paredes de espuma de poliuretano por microscopia electrónica de barrido y recuperación de esta con un lavado a la espuma con solución de Tween 80 o cloruro de sodio. Se realizaron pruebas de calidad a lo producido por estas cepas, se determinó la resistencia a choque térmico de las esporas, así como un bioensayo con larvas de *Galleria mellonella*. Además de ellos se corroboró la producción del cristal insecticida (Cry) en ambos sistemas de cultivo

y los cambios morfológicos que sufre la bacteria al crecer en los diferentes sistemas de cultivo por microscopia óptica.

Como se había demostrado antes, el cultivo en medio sólido mejora la producción de biomasa y esporas de *B. thuringiensis*, aun sin considerar lo retenido en la espuma de poliuretano, con microscopia electrónica de barrido se pudo observar que después de la extracción de las bacterias de la espuma de poliuretano, una gran cantidad de restos celulares quedan adheridos a las paredes de la espuma, aun después de realizar un lavado (ya sea con Tween 80 o Cloruro de sodio).

Haciendo uso de dos cepas identificadas de *B. thuringiensis*, se comprobó la producción de proteína Cry por SDS-PAGE al menos en cultivo en medio sólido. Además de corroborar por medio de electroforesis la presencia de la proteína insecticida, se realizaron observaciones en microscopio óptico identificando las formas tradicionales de estos cristales, así como de las esporas producidas por *B. thuringiensis* ambas en medio sólido. Se observó también un cambio morfológico drástico en la morfología de los bacilos producidos en cultivo líquido en comparación con la forma de crecimiento de la bacteria en cultivo sólido, se observa la producción de inclusiones irregulares en los bacilos los cuales no fueron identificados. Asimismo, se obtuvo un aumento en las características de calidad de las esporas producidas por cultivo sólido en comparación con el cultivo líquido, resistiendo mejor a un cambio drástico de temperatura y mostrando mayor infectividad contra larvas de *Galleria mellonella*.

Como conclusión, los cambios fisiológicos y morfológicos producidos por el uso de medios con alta concentración de glucosa en cultivo sólido y líquido tienen una repercusión importante en la producción y calidad de los productos de *B. thuringiensis* obtenidos. Demostrando que el cultivo en medio sólido es una alternativa para la producción de este tipo de compuestos.

**ABSTRACT**

*Bacillus thuringiensis* is a bacterium known worldwide for the ability to produce crystals with insecticidal characteristics, this property has been used for the elaboration of commercial formulations that have managed to position itself among the best sellers in the bioinsecticide market. In the last decade, solid medium culture has been explored as an alternative to produce *B. thuringiensis*, improving the yields of spores and crystals that this bacterium produces. Mainly agro-industrial waste has been used as a support and source of nutrients to produce spores and crystals, however, the comparison between what is produced between solid and liquid culture has a bias in terms of the amount of nutrients in the media or supports used. The use of inert supports such as polyurethane foam allows a fair comparison between both cultivation systems by being able to use the same medium.

Although it has been shown that the use of inert supports such as polyurethane foam improves the production of *B. thuringiensis* spores and crystals even using the same culture medium in both systems, it is not clear which are the factors that influence this to be possible. In the work presented below, it is intended to determine the physiological and morphological changes that the bacterium undergoes when grown in both culture media to identify what factors influence the increase in the production and quality of spores and crystals.

Two strains of *B. thuringiensis* were used, which were cultivated in media with high glucose concentration, in liquid culture and solid culture. During different sampling times, the amount of biomass and spores produced was determined. Being a bacterium capable of producing biofilm, it was determined whether there was retention of the product on the polyurethane foam walls by scanning electron microscopy and its recovery with washing the foam with a Tween 80 or sodium chloride solution. Quality tests were carried out on what was produced by these strains, the resistance to thermal shock of the spores was determined, as well as a bioassay with *Galleria mellonella* larvae. In addition to them, the production of the insecticidal crystal (Cry) in both culture systems and the morphological changes

suffered by the bacteria when growing in the different culture systems by optical microscopy were corroborated.

As previously demonstrated, culture in solid medium improves the production of biomass and spores of *B. thuringiensis*, even without considering what is retained in the polyurethane foam, with scanning electron microscopy it could be observed that after the extraction of bacteria from polyurethane foam, many cellular debris remain adhered to the foam walls, even after washing (either with Tween 80 or Sodium Chloride).

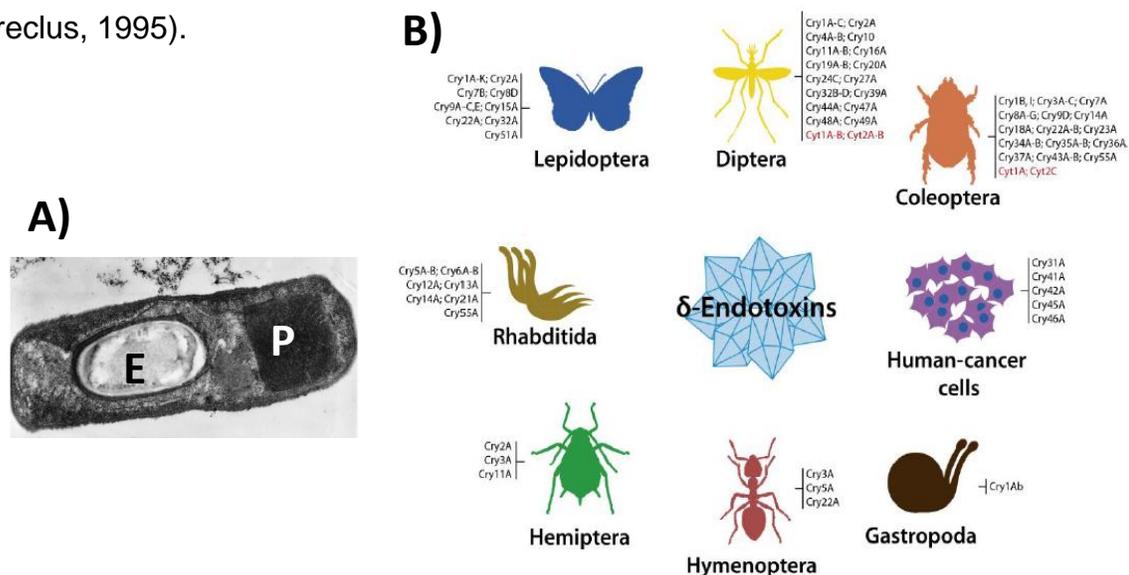
Using two identified strains of *B. thuringiensis*, Cry protein production was verified by SDS-PAGE at least in culture on solid medium. In addition to corroborating the presence of the insecticidal protein by means of electrophoresis, observations were made in light microscope identifying the traditional forms of these crystals, as well as of the spores produced by *B. thuringiensis*, both in solid medium. A drastic morphological change was also observed in the morphology of the bacilli produced in liquid culture compared to the growth form of the bacteria in solid culture, the production of irregular inclusions in the bacilli which were not identified is observed. Likewise, an increase was obtained in the quality characteristics of the spores produced by solid culture compared to liquid culture, better resisting a drastic change in temperature, and showing greater infectivity against *Galleria mellonella* larvae.

In conclusion, the physiological and morphological changes produced using media with a high concentration of glucose in solid and liquid culture have an important impact on the production and quality of the *B. thuringiensis* products obtained. Demonstrating that solid medium culture is an alternative to produce this type of compound.

## 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram positiva formadora de esporas perteneciente al grupo de *Bacillus cereus*; tiene la capacidad de producir una proteína de naturaleza cristalina denominada proteína Cry, una proteína insecticida de la cual se han reportado más de 300 holotipos (Crickmore *et al*, 2020). *B. thuringiensis* es considerado un microorganismo ubicuo por la diversidad de lugares de donde ha sido aislado, habitando normalmente en suelos (Dulmage y Aizawa, 1982). La capacidad insecticida de las proteínas producidas por *B. thuringiensis* se ha comprobado comúnmente en insectos de los órdenes Lepidóptera, Díptera (Dulmage y Aizawa, 1982) y Coleóptera (Lambert y Perferoen, 1992), sin embargo, se ha comprobado que también actúa contra algunos insectos de los órdenes Hymenóptera, Homóptera, Ortóptera, Mallophaga, y sobre nemátodos, ácaros y protozoos (Feitelson *et al*, 1992). La síntesis de estas proteínas Cry se realiza durante la fase estacionaria del crecimiento de *B. thuringiensis* acumulándose dentro de la célula vegetativa como una inclusión cristalina que puede llegar a representar el 25% del peso seco de la célula esporulada (Figura 1.1) (Agaisse y Lereclus, 1995).



**Figura 1.1.** A) Micrografía electrónica de barrido de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*: E, espora y P, cristal de proteína Cry (Agaisse y Lereclus, 1995). B) Esquema del espectro

de acción conocido de distintos holotipos de la toxina Cry de *B. thuringiensis* (Palma *et al*, 2014).

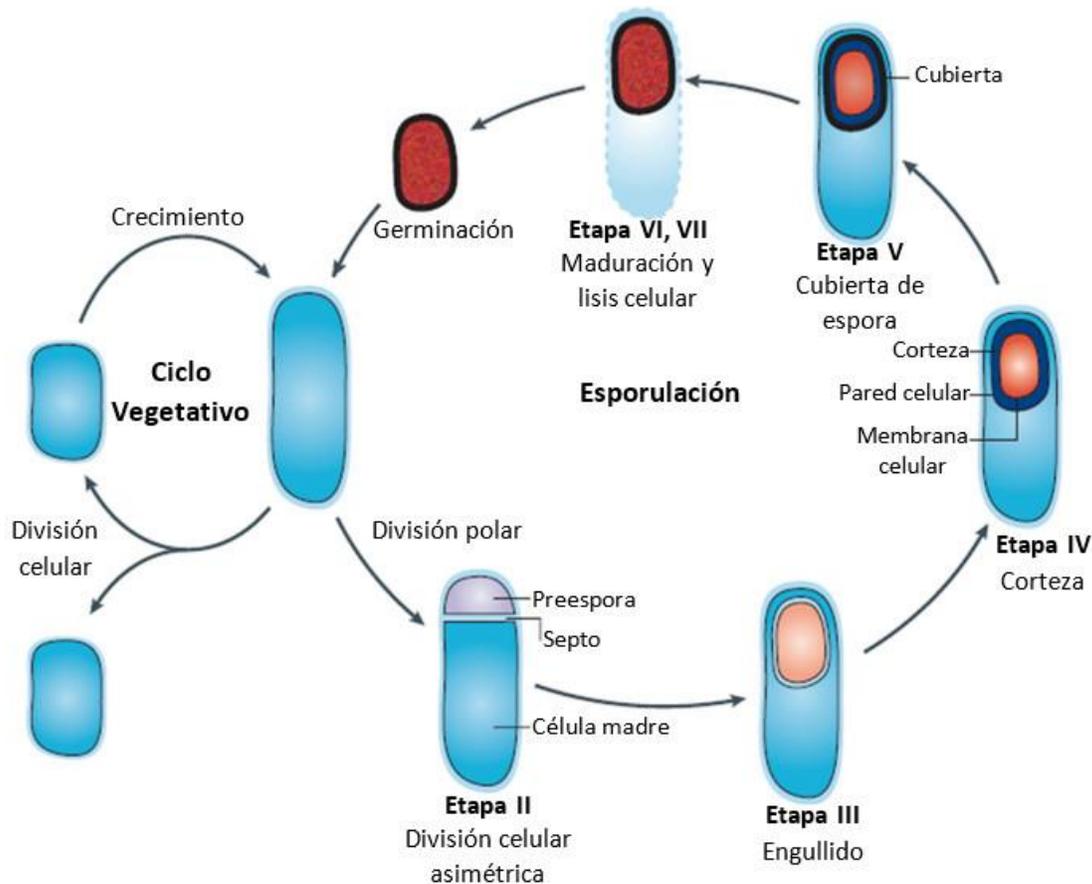
Las propiedades insecticidas de *B. thuringiensis* se han aprovechado para la producción de un gran número de formulados con base en los cristales que produce, varios de los cuales participan en el mercado de bioinsecticidas como agente de control de plagas. Este tipo de control de plagas es definido como control biológico, el cual se define como el “uso de enemigos naturales (depredadores, parásitos y patógenos de plagas) y enemigos benéficos selectos (ciertos antagonistas y alelopatas) y sus productos, para reducir poblaciones de plagas y sus efectos” (King *et al*, 1996). La diversidad de serotipos *B. thuringiensis* y sus toxinas permite la formulación de diversos bioinsecticidas para cada uno de los órdenes de insectos hacia los cuales *B. thuringiensis* es tóxico. La biología molecular y manipulación de genes ha permitido aprovechar el potencial insecticida de la proteína Cry para desarrollar especies de plantas transgénicas capaces de producirla en sus tejidos y las hacen tóxicas para algunos insectos plaga; ejemplos de ellos son los cultivos de maíz Bt, algodón Bt y tabaco, etc (Sauka y Benintende, 2008; Vaeck *et al*, 1987, Romeis *et al*, 2019).

## 1.2 Proceso de esporulación

Muchos microorganismos como las bacterias poseen la capacidad de adaptarse a diversas condiciones ambientales como estrategia de sobrevivencia a los cambios en su entorno (generalmente privación de nutrientes). Estas estrategias involucran cambios rápidos en la expresión genética que altera el fenotipo de la célula, permitiendo la sobrevivencia de éstas. El proceso de esporulación es un ejemplo de este tipo de estrategias, la cual permite a las bacterias sobrevivir a condiciones desfavorables durante largos periodos de tiempo, hasta que las condiciones del medio que la rodea sean propicias nuevamente y pueda retornar a la forma de crecimiento vegetativo (McKenney *et al*, 2013). En *Bacillus subtilis*, se ha demostrado que el proceso de esporulación está controlado por un sistema de fosforelevo que involucra un complejo multicomponente de proteínas cinasas, proteínas fosforilables y aspartil-fosfato-fosfatasas (RAP-fosfatasas o fosfatasas de



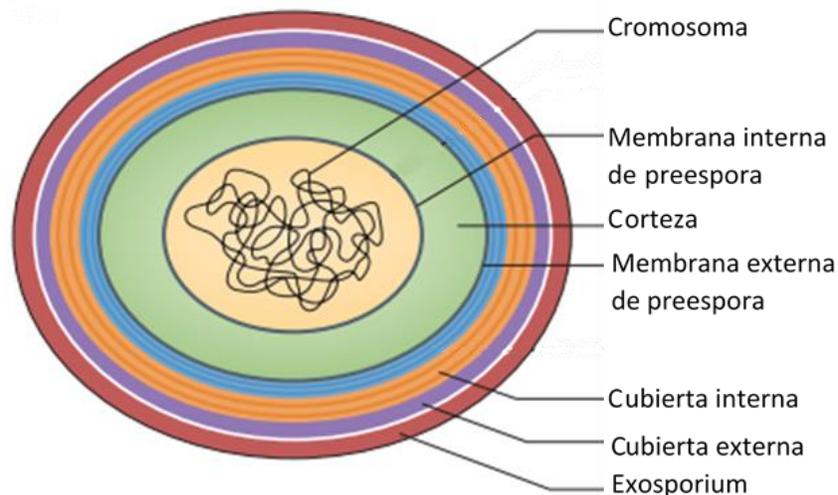
donde la formación de un septo permite la división de la célula en dos compartimentos de diferente tamaño, la célula madre y la “preespora”; una vez que se ha formado el septo la célula ya no puede regresar a la forma vegetativa, pero esto tampoco es garantía de que la célula termine el proceso de esporulación y la preespora madure. En la siguiente etapa, la preespora es engullida por la célula madre para que en las siguientes etapas las preespora sea recubierta con diferentes capas protectoras de composición distinta. Posteriormente se produce un proceso de deshidratación y maduración final de la preespora. Al final, la célula madre sufre el proceso de lisis, liberando la espora madura al medio (Figura 1.3) (Errington, 2003; McKenney *et al*, 2013).



**Figura 1.3.** Esquema general del proceso de esporulación (Modificado de Errington, 2003).

Cada género y especie de bacterias presentan diferencias en los procesos de esporulación, sin embargo, la estructura de las esporas es similar entre diferentes especies bacterianas (Checinska *et al*, 2015). En la Figura 1.4 se muestra un

esquema general de la estructura de una espora de *Bacillus subtilis*. En el centro de la espora se encuentra el material genético de la bacteria (ADN) protegido por pequeñas proteínas ácido solubles (SASPs), ribosomas y una cantidad mínima de proteínas necesarias para el proceso de germinación, todo esto deshidratado debido a la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ - ácido dipicolínico (DPA). Rodeando todo esto, se encuentra una membrana interna, que se convierte en la membrana plasmática de la célula después del proceso de germinación. La siguiente capa, denominada corteza, protege el núcleo de la espora de estrés mecánico; esta capa está hecha de peptidoglucano, similar al peptidoglucano de la pared celular de la célula vegetativa. Después de la corteza, está presente la cubierta de la espora, cuya función principal es la de proteger y preservar el genoma de la espora; las proteínas de la cubierta ordenadas en forma de retícula fortalecen la estructura de esta capa y protegen a la espora de enzimas hidrolíticas. Aunque en la mayoría de las bacterias la cubierta es la última capa de la estructura de una espora, en algunas bacterias como *B. thuringiensis* existe una capa más, llamada *exosporium*, compuesta principalmente de proteínas como superóxido dismutasa y glucoproteínas, que proporcionan una capa más de protección a la espora (Checinska *et al*, 2015; McKenney *et al*, 2013).



**Figura 1.4.** Esquema general de estructura de una espora de *Bacillus subtilis* (Modificado de McKenney *et al*, 2013)

### 1.3 Toxinas de *Bacillus thuringiensis*

El interés biotecnológico hacia *B. thuringiensis* radica en su capacidad de producir una amplia variedad de toxinas y compuestos de interés industrial. *B. thuringiensis* produce amilasas, que se secretan al medio de cultivo durante el crecimiento (Li y Yousten, 1975; Kuppusamy y Balaraman, 1990; Smitha *et al*, 2013; Awasthi *et al*, 2018), y una variedad de proteasas intra y extracelulares que son aprovechadas en diversas áreas de la industria (Brar *et al*, 2007). Entre estas últimas, *B. thuringiensis* produce metaloproteasas, serin y cistein proteasas, las cuales han sido objeto de estudio para la producción de bioplaguicidas (Kumar *et al*, 1997; Kumar *et al*, 1998; Brar *et al*, 2007).

*B. thuringiensis* también produce una gran variedad de factores de virulencia, como algunas fosfolipasas, quitinasas y  $\beta$ -exotoxinas (thuringensina) (Sauka y Benintende, 2008); algunas toxinas producidas por *B. thuringiensis* son secretadas durante la fase de crecimiento, entre ellas se encuentran las proteínas insecticidas vegetativas o Vip identificadas y clasificadas en 4 familias (Vip1, Vip2, Vip3 y Vip4), y las proteínas insecticidas secretadas o Sip (Palma *et al*, 2014). Las proteínas Vip son tóxicas hacia insectos de órdenes de Lepidóptera, Hemíptera y Coleóptera (Warren *et al*, 1998; Sattar y Maiti, 2011; Estruch *et al*, 1996), mientras las proteínas Sip sólo han demostrado acción contra larvas de Coleópteros, dicha proteína tiene secuencias similares a la proteína Mtx3 de *Bacillus sphaericus* lo que sugiere que el mecanismo de acción de este tipo de proteínas está relacionado con la formación de poros en el intestino del insecto (Palma *et al*, 2014; Donovan *et al*, 2006; Crickmore *et al*, 2020; Domínguez-Arrizabalaga *et al*, 2020). En la última década se han descrito algunas proteínas que poseen características similares a las proteínas Cry, aunque no presentan actividad insecticida, sino actividad citotóxica contra células humanas cancerígenas de varios orígenes las cuales han sido denominadas como Parasporinas (Ohba *et al*, 2009; Okumura *et al*, 2010).

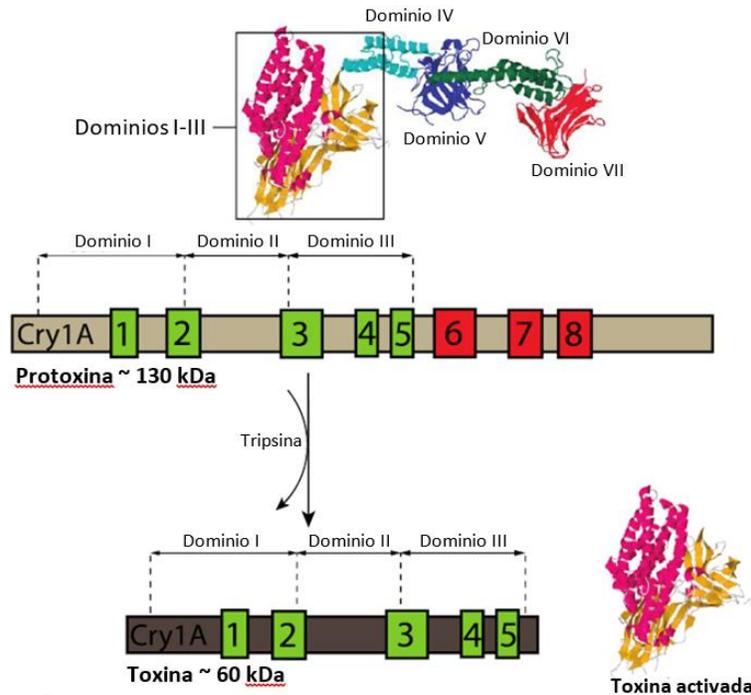
A pesar de la diversidad de toxinas producidas por *B. thuringiensis*, las dos proteínas más conocidas de dicho organismo son las  $\delta$ -endotoxinas Cyt y Cry. Las proteínas Cyt (citotóxicas) tienen actividad citolítica y hemolítica *in vitro*, y tienen

especificidad hacia dípteros *in vivo*; de hecho, las proteínas Cyt pueden actuar de forma sinérgica con las proteínas Vip y Cry, permitiendo en algunos casos disminuir la resistencia del insecto hacia algunas proteínas Cry (Sauka y Benintende, 2008; Palma *et al*, 2014; Soberon *et al*, 2013; Yu *et al*, 2012; Wang *et al*, 2020). Las proteínas Cyt pertenecen a la clase de toxinas formadoras de poro, al igual que la proteína Cry; pero esta última se ha estudiado más, incluso ya tiene aplicaciones industriales (Bravo *et al*, 2007; Melo *et al*, 2016; Jouzani *et al*, 2017).

#### 1.4 Proteína Cry

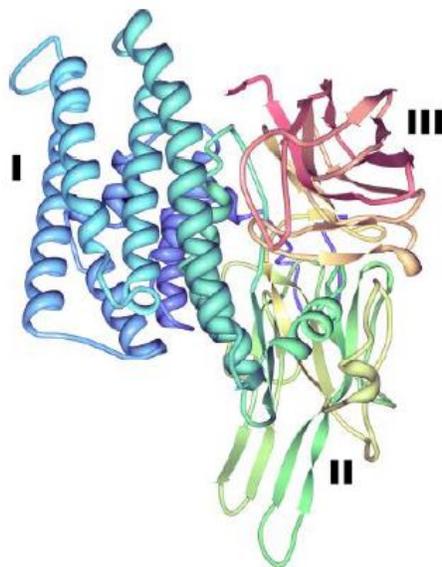
Como se ha mencionado la toxina más importante producida por *B. thuringiensis* desde el punto de vista del control biológico, es la proteína Cry. Estas proteínas se sintetizan durante la fase estacionaria del crecimiento de *B. thuringiensis* como un cristal parasporal en forma de protoxina. Las proteínas Cry han sido clasificadas por el Comité de Nomenclatura de Toxinas de *B. thuringiensis* en 73 diferentes tipos de proteínas Cry. Desde el descubrimiento de *B. thuringiensis* se han reportado más de 700 secuencias de genes *cry*, generalmente localizados en grandes plásmidos (Höfte y Whiteley, 1989; Schnepf *et al*, 1998; Crickmore *et al*, 2020; Van Frankenhuyzen, 2009; Lechuga *et al*, 2020). Para incluir una nueva toxina Cry en la nomenclatura oficial, esta debe tener una secuencia similar (95% de identidad) con una o más toxinas dentro de la nomenclatura o ser una proteína de inclusión parasporal de *B. thuringiensis* que exhiba actividad plaguicida o algún efecto tóxico verificable para un organismo objetivo (Crickmore *et al*, 2020).

Muchas de las proteínas Cry presentan claras diferencias en sus secuencias de aminoácidos, pero todas ellas comparten estructuras similares y conservadas. El alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las proteínas Cry ha revelado la presencia de 8 regiones altamente conservadas en la secuencia de la protoxina, 5 de estas regiones se encuentran conservadas dentro de los 3 dominios que usualmente se observan en la toxina en su forma activa (Figura 1.5).



**Figura 1.5.** Bloques conservados en la secuencia de la proteína Cry1Ac. Los bloques verdes son secuencias conservadas dentro de los dominios de la toxina activada (Modificado de Palma *et al*, 2014).

Cada uno de los 3 dominios de la proteína Cry en su forma activa tiene una función diferente durante el proceso de infección en el hospedero; el dominio I, con 7  $\alpha$ -hélices en su estructura, es responsable de la inserción de la toxina en la membrana del intestino del insecto, así como de la formación del poro; los dominios II y III (estructuralmente caracterizados, respectivamente, por 3 láminas  $\beta$  y por la presencia de láminas denominadas  $\beta$ -sándwich) son responsables de la unión a receptores membranales presentes en el insecto (Figura 1.6) (Li *et al*, 1991).



**Figura 1.6.** Estructura tridimensional de la toxina Cry2Aa. Los números romanos indican los 3 dominios de la proteína (Morse *et al*, 2001).

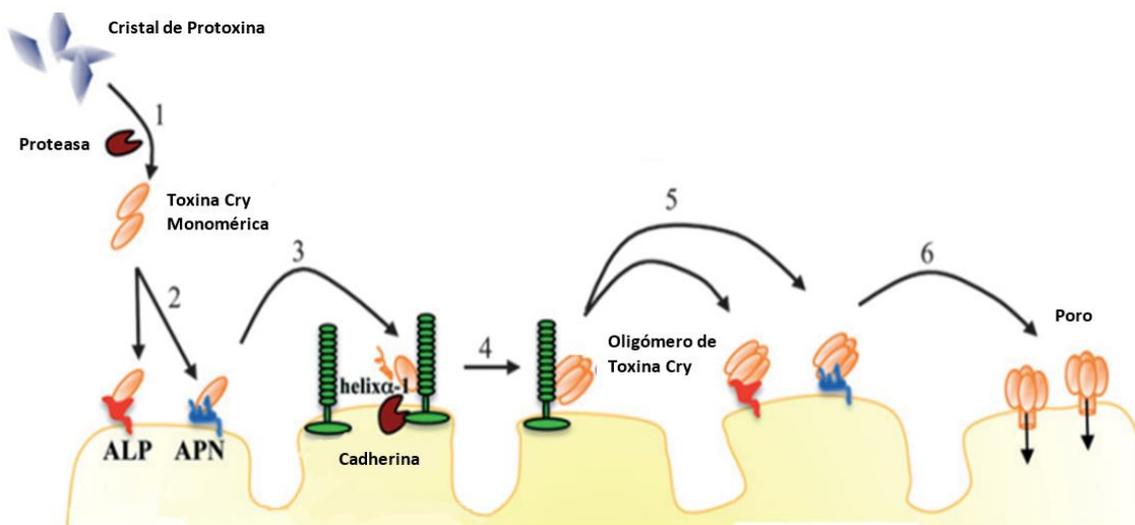
### 1.5 Modo de acción

El proceso de infección de insectos por proteínas Cry se ha caracterizado principalmente para Lepidópteros. Para este orden de insectos se han identificado 4 proteínas que funcionan como receptores de los distintos dominios de la toxina Cry: cadherina, aminopeptidasa anclada a glicosilfosfatidil inositol (GPI), fosfatasa alcalina anclada a GPI y un glicoconjugado (Bravo *et al*, 2007). El proceso de infección comienza con la ingesta de la proteína Cry en forma de protoxina y continúa de la siguiente manera:

1. La protoxina sufre una activación proteolítica por una proteasa en el intestino del insecto.
2. La forma monomérica de la toxina activa se une con baja afinidad a los receptores APN (aminopeptidasa N) o ALP (Fosfatasa alcalina).
3. La interacción con los receptores anteriores produce un aumento en la concentración de la toxina activada en las microvellosidades de las células del intestino medio lo que permite una posterior unión de alta afinidad con el receptor CAD (cadherina). En este receptor se realiza una escisión proteolítica del dominio I de la proteína.

4. Posterior a la escisión del dominio I, la proteína sufre una oligomerización (formación del pre-poro).
5. El oligómero Cry se une nuevamente a los receptores ALP y APN con mayor afinidad que la forma monomérica.
6. Los receptores ALP y APN inducen la inserción de pre-poro dentro de la membrana del intestino del insecto, formándose el poro.

En los últimos años se ha descrito que los transportadores ABC, en especial el transportador ABCC2 tienen una función en el proceso de infección de algunos lepidópteros, teniendo un papel incluso más importante que el receptor cadherina, dicho transportador funciona como receptor de las proteínas Cry que promueve la oligomerización de las proteínas y facilita la inserción del pre-poro en la membrana del intestino medio del insecto (Martínez-Solís et al, 2018; Endo et al, 2017; Sato et al, 2019; Pinos et al, 2019). La formación de este poro provoca el transporte libre de iones inorgánicos, aminoácidos y azúcares, dicha acción daña severamente el intestino medio del insecto, impidiendo la asimilación de alimento por parte del hospedero provocando la muerte (Figura 1.7) (Gill et al, 1992; Bravo et al, 2007; Palma et al, 2014; Pardo-López et al, 2013).



**Figura 1.7.** Modo de acción de proteína Cry de *B. thuringiensis* en el intestino medio del insecto objetivo. 1) Activación proteolítica. 2) Unión de Cry a receptores Fosfatasa alcalina (ALP) y Aminopeptidasa N (APN). 3) Unión de Cry en forma monomérica al receptor Caderina. 4) Oligomerización de Cry. 5) Unión del oligómero a ALP y APN. 6) Formación del poro en el intestino del insecto (Modificado de Pardo-López et al, 2013).

### 1.6 Producción de *B. thuringiensis*: Cultivo en medio líquido vs. Cultivo en medio sólido

Desde su primer aislamiento hasta la fecha, se han desarrollado diversos medios de cultivo para la producción masiva de *B. thuringiensis* y obtención de un producto funcional como los bioinsecticidas; cada medio se ha optimizado para las diferentes variedades de *B. thuringiensis* aisladas, y por cada cepa nueva se realiza un nuevo ensayo de optimización. El desarrollo de nuevos medios de cultivo para *B. thuringiensis* tienen como objetivo mejorar la producción, así como calidad de esporas y toxina de dicho microorganismo (King *et al*, 1996; Goldberg *et al*, 1980; Bing-Lan y Yew- Min, 1998; Ernandes *et al*, 2013; Dulmage y De Barjac, 1973). Sin embargo, la diversidad de metabolitos producidos por *B. thuringiensis* han propiciado el desarrollo de nuevos medios y estrategias de producción, para mejorar también la producción de enzimas de interés industrial, como amilasas y proteasas, así como polihidroxicanoatos (Smitha *et al*, 2013; Jisha *et al*, 2015; Smitha *et al*, 2018; El-Gayar *et al*, 2020; Gomma, 2012).

Aunque existe una gran cantidad de condiciones y medios de cultivo para la producción de *B. thuringiensis*, hay aspectos básicos que se deben considerar en cada uno de estos medios como: una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, elementos traza, así como las condiciones de pH, temperatura, aireación y relación carbono/nitrógeno, que dependerán del objetivo de producción del medio. Entre las principales fuentes de carbón utilizadas para la producción de *B. thuringiensis* se encuentran glucosa, almidón, glicerol y durante la última década se ha usado residuos agroindustriales como fuente carbono y otros de nutrientes. En relación con la fuente de nitrógeno, comúnmente se usan peptonas, extracto de levadura y sulfato de amonio. Muchos de los medios de cultivos propuestos contienen más elementos traza necesarios para el crecimiento de *B. thuringiensis* como lo son fosfato, carbonato, manganeso, magnesio, cobre y calcio (Patil *et al*, 2014; Posada-Uribe *et al*, 2015; Mummigatti *et al*, 1990).

El principal sistema de producción utilizado para *B. thuringiensis* ha sido mediante cultivo líquido, con un medio optimizado para cada cepa de *B. thuringiensis* que se

utilice. Cada autor propone el medio y condiciones de cultivo con las que ha logrado obtener mejores resultados con la cepa que utiliza y el rango de producción es tan amplio que varía desde  $1 \times 10^6$  hasta  $1 \times 10^{12}$  esporas o UFC/mL (Poopathi y Archana, 2012; Shojaaddini *et al*, 2010; Lima-Pérez *et al*, 2019; Alves *et al*, 1997; Avignone-Rossa y Mignone, 1993; El-Bendary, 2006; Sarrafzadeh *et al*, 2005; Zouari *et al*, 2002); Zouari y colaboradores (1998) utilizaron diferentes fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, melaza, celulosa, almidón e hidrolizado de harina de trigo) la producción de esporas con estas fuentes de carbono está en un rango de 1.9 a  $4.8 \times 10^8$  UFC/mL y de 370 a 965 mg/L de toxina. En 2008, Amin y colaboradores utilizaron lote alimentado en dos etapas para la producción de *B. thuringiensis*, al final de la segunda etapa obtienen  $2.31 \times 10^{12}$  esporas/mL y 20.1 g/L de toxina al utilizar 126.7 g/L de glucosa en lote alimentado. Dang Vu y colaboradores (2012) utilizaron 6 medios diferentes para la producción de *B. thuringiensis*, y mostraron que la producción de esporas tuvo un rango de  $1 \times 10^9$  a  $6 \times 10^9$  UFC/mL y una producción de toxina desde 0.5 hasta 1.2 g/L. En resumen, la producción de *B. thuringiensis* en cultivo líquido resulta en un amplio rango de producción de esporas y toxina, muchas veces dependiendo de las condiciones de cultivo, así como las mismas propiedades del medio,

La capacidad de *B. thuringiensis* de crecer bajo diferentes fuentes de carbono y nutrientes, así como la creciente necesidad de reutilizar una gran cantidad de residuos agroindustriales, explica que en recientes años se haya incursionado en el uso de cultivos sólidos para la producción de *B. thuringiensis*. El uso de cultivos sólidos para la producción de diversos productos, derivados de hongos y otras bacterias de interés industrial, en muchos casos ha mejorado los rendimientos de producción, en comparación con los rendimientos reportados al utilizar cultivos en medio líquido (CML), además de presentar distintas ventajas como la reducción de costos de operación (Pandey *et al.*, 2000; Mitchell *et al.*, 2000). Similar a lo que sucede con los diferentes cultivos líquidos, se ha propuesto el uso de diferentes tipos de sustrato para la producción de *B. thuringiensis* en cultivo sólido; entre los sustratos más comunes se encuentra el salvado de trigo, lodos provenientes de aguas residuales, algunas harinas, residuos de comida, salvado de arroz, residuos

de camarón, residuos de soya, muchos de ellos residuos agroindustriales (Zhang *et al*, 2013; Vimala-Devi *et al*, 2005; Rodríguez *et al*, 2019; Zhuang *et al*, 2011; Capalbo *et al*, 2001; Smitha *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2015; Wu *et al*, 2014; Patil *et al*, 2013; Chaiharn *et al*, 2013).

Aunque el uso de cultivos en sólidos (CMS) suele ser garantía de una mejora en la producción de diferentes metabolitos, puede presentar diferencias de producción dependiendo de la cepa de microorganismo que se utilice, las condiciones de cultivo y del propio sustrato; por ejemplo, Wu y colaboradores (2014) utilizaron un sustrato proveniente del cultivo de hongos para la producción de *B. thuringiensis*, el sustrato contenía salvado de trigo, cáscaras de semillas de algodón, aserrín, cal y carbonato de calcio; bajos diferentes combinaciones de este sustrato lograron producir esporas en un rango de  $2 \times 10^9$  a  $9.5 \times 10^{10}$  esporas/ g de sustrato. Vimala-Devi y colaboradores (2005) utilizaron salvado de trigo en 3 combinaciones diferentes con las cuales produjeron entre  $6.6 \times 10^{10}$  y  $9.2 \times 10^{10}$  esporas/g de sustrato. El uso de este sistema de cultivo pareciera mejorar la producción de esporas de *B. thuringiensis* en comparación de lo reportado con el uso de cultivos líquidos, sin importar el sustrato utilizado, produciendo hasta  $1 \times 10^{11}$  esporas/g de sustrato (Zhang *et al*, 2013; Zhuang *et al*, 2011; Adams *et al*, 2002; Wu *et al*, 2014; Jisha *et al*, 2015; Rodríguez *et al*, 2019; Capalbo *et al*, 2001; Smitha *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2015; Patil *et al*, 2013; Chaiharn *et al*, 2013; Lima-Pérez *et al*, 2019).

A pesar de que la producción de *B. thuringiensis* en cultivo sólido resulta conveniente, las comparaciones de producción en ambos sistemas de cultivo suelen ser tendenciosas, debido a las diferencias propias de los medios de cultivo y los soportes utilizados, pues la concentración y la naturaleza de los componentes del sustrato o del medio son claramente diferentes. Para determinar si el sistema de cultivo es el responsable del aumento en la producción de *B. thuringiensis*, y no las diferencias nutricionales, se ha propuesto el uso de soportes inertes utilizando el mismo medio de cultivo en ambos sistemas. En este sentido, se ha utilizado espuma de poliuretano y agrolita como soporte inerte para la producción de diferentes metabolitos de diferentes microorganismos, desde hongos, levaduras y bacterias,

mostrando que las características del cultivo sólido sí mejoran la producción de los diferentes metabolitos, en comparación del cultivo líquido, aun utilizando el mismo medio de cultivo en ambos sistemas (Zhu *et al*, 1994; Romero-Gómez *et al*, 2000; Baños *et al*, 2009; Hu *et al*, 2011; John *et al*, 2007; Ramadas *et al*, 2013; Lima-Pérez *et al*, 2019; Lima-Pérez *et al*, 2018; López-Pérez *et al*, 2010; Guerrero-Urrutia *et al*, 2021).

Algunos autores han estimado que el mercado de los bioinsecticidas cotizaría entre 4.5 a 6.6 mil millones de dólares entre 2020 y 2023 (Olson, 2015; Muñiz-Paredes, 2017). Los formulados basados en esporas y toxinas de *B. thuringiensis* dominan dicho mercado de bioinsecticidas, lo que explica el interés en el desarrollo de nuevos sistemas de cultivo, con la intención de mejorar los rendimientos de producción de esporas y toxinas. Sin embargo, las características de calidad de dichos productos también resultan de gran interés, pues aumentar la calidad de infección o resistencia a los factores abióticos en campo se traduciría en una competencia directa con muchos de los insecticidas químicos, dándole al agricultor alternativas de consumo menos dañinas a su salud y amigables con el medio ambiente (Kiran-Kumar *et al*, 2019; Arthurs y Dara, 2019). Debido a ello los nuevos sistemas de producción, además de enfocar su atención en la mejora de los rendimientos, deberían ser capaces de mejorar la calidad del producto, en el caso de *B. thuringiensis*, producir esporas y toxinas más resistentes a condiciones abióticas y mejores tasas de infección al insecto plaga. Muchos estudios se han enfocado en realizar modificaciones genéticas para conseguir estas mejoras tanto en producción como en características de calidad, sin embargo, el uso de sistemas de cultivo sólido ha mostrado no solo mejorar los rendimientos de producción sino también dichas características de calidad reduciendo los costos de generar organismos modificados así como las implicaciones políticas que deben cumplir estos organismos modificados genéticamente para su uso en campo que al día de hoy generan desconfianza en la población (Muñiz-Paredes *et al*, 2017; Muñiz-Paredes *et al*, 2016).

## 2. ANTECEDENTES

La capacidad de *B. thuringiensis* para producir una gran variedad de compuestos, incluyendo proteínas con características insecticidas (proteína Cry), esporas y enzimas de interés industrial, ha provocado un amplio interés biotecnológico e industrial por desarrollar medios y sistemas de cultivos óptimos para la aumentar la producción de dichos productos biotecnológicos.

Los niveles de producción de proteínas Cry, esporas y otros compuestos (enzimas), dependen de las condiciones de crecimiento de *B. thuringiensis*, por lo que desde el descubrimiento del potencial biotecnológico de este bacilo hasta la fecha se han desarrollado una gran cantidad de medios de cultivo, específicos para diferentes cepas de *B. thuringiensis* con el fin de aumentar los rendimientos de producción. Además, para mejorar dichos rendimientos, así como los costos de producción, se han explorado alternativas como el uso de cultivo sólido utilizando diferentes residuos agroindustriales, sin embargo, es muy difícil discriminar si realmente las cantidades producidas bajo cultivo sólido son mayores a las producidas por cultivo líquido, pues las diferencias en cuanto a la composición de los medios líquidos y los sustratos utilizados en cultivo sólido no permiten una justa comparación en cuanto a la producción de metabolitos de los microorganismos.

El uso de soportes inertes, como la espuma de poliuretano (PUF), suele ser una alternativa de cultivo sólido que hace posible usar el mismo medio de cultivo en ambos sistemas (sólido y líquido). Esto permite una justa comparación en cuanto a rendimientos de producción, y con ello un mejor entendimiento de los factores que producen el aumento en la producción en un sistema u otro, creando nuevas oportunidades o áreas de optimización en los diferentes procesos. Por ejemplo, en 2010, López-Pérez y colaboradores mostraron que el uso de PUF como soporte inerte mejora las condiciones de transferencia de oxígeno, produciendo un aumento en la producción de biomasa de *Pichia pastoris* en comparación con el cultivo líquido; en 2019, Lima-Pérez y colaboradores comprobaron un fenómeno similar, observando un aumento en la producción de biomasa y esporas de *B. thuringiensis* en cultivo en medio sólido en comparación del líquido, utilizando concentraciones

de glucosa de hasta 50g/L y PUF como soporte sólido. Flores-Tufiño (2016) mostró que la producción de esporas de *B. thuringiensis* en cultivo sólido era mayor en comparación con la obtenida en cultivo líquido, utilizando el mismo medio de cultivo con una alta concentración de glucosa (120g/L), concentración mucho mayor a las reportadas para ambos sistemas de cultivo; además, se observó un fenómeno de retención de biomasa en el soporte donde se llevó a cabo el crecimiento de dicho microorganismo (espuma de poliuretano PUF), sugiriendo la posible formación de biopelícula por *B. thuringiensis* dentro del soporte sólido. Además, se debe considerar que la formación de biopelículas en bacterias están relacionados con fenómenos de percepción del quórum (*Quorum sensing*), y que en *B. thuringiensis* la formación de biopelícula se inicia con la activación de un factor de transcripción involucrado también en la esporulación (Spo0A) (Cairns *et al*, 2014; Dubois *et al*, 2013; El-Khoury *et al*, 2016; Pedrido *et al*, 2013; Hamon y Lazazzera, 2001), motivo por el cual el crecimiento de *B. thuringiensis* en cultivos sólidos podría favorecer fenómenos de *Quorum sensing*, involucrados en los procesos de esporulación, siendo uno de los posibles motivos por los cuales se obtiene mayor rendimiento de esporas en cultivo sólido que en cultivo líquido.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La producción de esporas y toxinas de *B. thuringiensis* presentan un amplio interés biotecnológico e industrial, por la capacidad de producir un amplio rango de toxinas Cry con un gran número de insectos blanco. Debido a este interés biotecnológico diversos investigadores han desarrollado medios de producción para incrementar la cantidad de esporas o proteína Cry (King et al, 1996; Goldberg et al, 1980; Bing-Lan y Yew- Min, 1998; Ernandes et al, 2013; Dulmage y De Barjac, 1973; Jallouli *et al*, 2020). En años recientes se ha incursionado en la producción de esporas y proteína Cry mediante cultivos en medio sólido con resultados favorables, incluso mejorando la producción que se obtiene mediante los cultivos líquidos generalmente utilizados en la industria (Zhuang et al, 2011; Adams et al, 2002; Wu et al, 2014; Jisha et al, 2015). Aunque el uso de cultivos sólidos mejore la producción de esporas y proteína Cry de *B. thuringiensis*, es necesario comprender cuáles son los factores de este sistema de cultivo que producen el aumento en la producción.

Aunque se conocen algunos factores que promueven las mejorar de producción en cultivo sólidos, como la transferencia de oxígeno y la ausencia de represión catabólica, es necesario determinar los cambios fisiológicos y morfológicos que sufren los microorganismos al cambiar de sistema de producción, pero manteniendo el mismo medio de cultivo. Conocer estos cambios permitirá crear nuevas áreas de mejora durante el proceso de producción de esporas de *B. thuringiensis* y la toxina insecticida. En este trabajo se analizaron los cambios morfológicos y fisiológicos que experimenta *B. thuringiensis* al ser cultivado en cultivo sólido y líquido a altas concentraciones de sustrato, enfatizando la producción de biopelícula como un cambio fisiológico importante, pues al compartir señalizadores con el proceso de esporulación, el incremento en la formación de biopelícula puede estar relacionado con la mejora en la producción y calidad de esporas y toxina Cry en *B. thuringiensis*.

#### 4. HIPÓTESIS

Las diferencias fisiológicas y morfológicas de *B. thuringiensis* en cultivo en medio sólido, respecto al cultivo en medio líquido, promueven el aumento en la producción y calidad de esporas, así como las toxinas al utilizar altas concentraciones de sustrato (glucosa).

El crecimiento de *B. thuringiensis* en cultivo sólido propicia la formación de biopelícula, el cual tiene un efecto en la producción de esporas y entomotoxicidad de la proteína Cry.

## 5. OBJETIVO

### 5.1 General

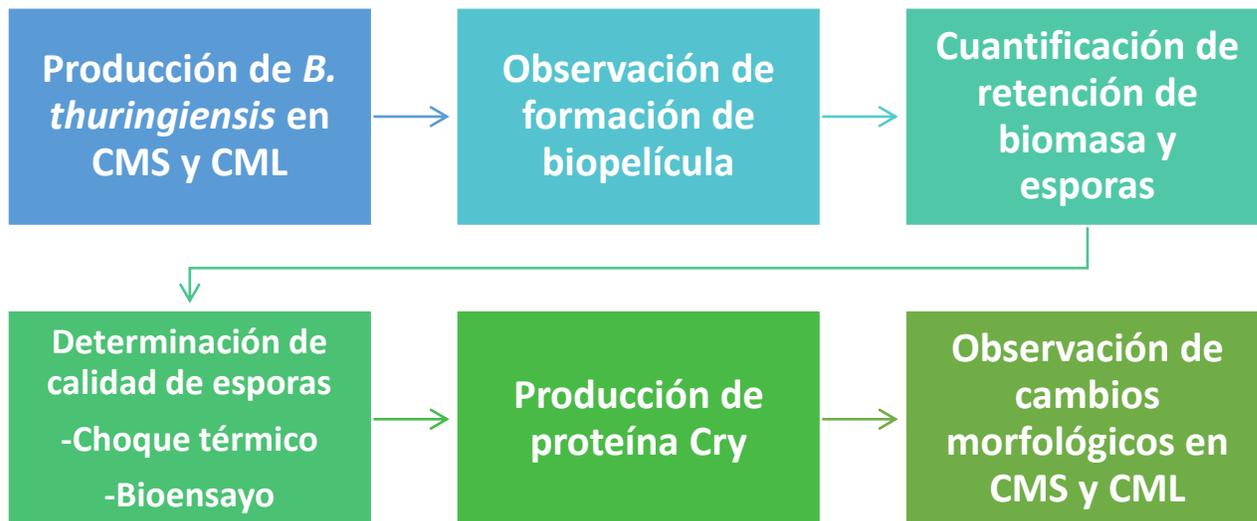
Comparar los cambios fisiológicos y morfológicos de *B. thuringiensis* en medios con alta concentración de sustrato (glucosa) tanto en cultivo en medio líquido como en sólido y el efecto que tienen en la producción de esporas y proteína Cry.

### 5.2 Específicos

- Conservar a largo plazo las cepas Y<sub>15</sub> y EA<sub>3</sub>
- Determinar la retención de biomasa y esporas en la espuma de poliuretano después de la cinética de crecimiento de *B. thuringiensis*.
- Determinar la presencia de biopelícula en el sistema sólido.
- Comparar el rendimiento de proteína Cry de *B. thuringiensis* en ambos sistemas de cultivo.
- Determinar las diferencias morfológicas de *B. thuringiensis* en CMS vs CML

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Estrategia experimental



### 6.2 Microorganismo

Alquisira- Ramírez y colaboradores (2014) aislaron cepas de *B. thuringiensis* en la región agrícola del estado de Morelos, las cepas identificadas como Y<sub>15</sub> y EA<sub>3</sub> se utilizaron para los fines que aquí se presentan. Como testigo se utilizaron las cepas *B. thuringiensis* HD73 (ATCC-35866) y *B. thuringiensis* HD1.

### 6.3 Conservación de cepas

Todas las cepas se conservaron en tiras de papel filtro, para ello se utilizaron tiras de papel filtro Whatman 1 previamente esterilizadas, posteriormente se impregnaron con una suspensión de esporas de cada una de las cepas a conservar y se dejaron secar dentro de una campana de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad; una vez secas, las tiras de papel se colocaron en tubos Eppendorf estériles y se almacenaron a 4° C hasta su uso (Sosa-López *et al*, 2011).

### 6.4 Preparación de inóculo y medios de cultivo

#### Pre-inóculo

Un pre-inóculo se obtuvo colocando un papel filtro impregnado de esporas de *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub> o EA<sub>3</sub> en un matraz con 25 mL de medio Luria Bertani (LB). Los matraces se incubaron por 12 h a 150 rpm y 30°C.

**Tabla 6.1.** Contenido del medio LB

Reactivo	Cantidad (g/L)
Bacto triptona	15
Extracto de levadura	5
NaCl	15

### Inóculo

El inóculo se obtuvo transfiriendo 5% v/v del pre-inóculo a 50 mL de medio GYS (Berbert-Molina *et al*, 2008). Este se incubó durante 6 h a 30°C y agitación a 150 rpm.

**Tabla 6.2.** Contenido del medio GYS

Reactivo	Cantidad (g/L)
Glucosa	30
Extracto de levadura	12
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0.12
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	1.5
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	0.9
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5

### Medio de producción

Para la producción de esporas y toxina Cry se utilizó 14.6 mL del medio GYS x4 (Flores- Tufiño, 2016; Berbert-Molina *et al*, 2008). El pH del medio se ajustó a 7.5 antes del proceso de esterilización. El crecimiento y producción de esporas se monitoreó en un lapso de 72 h.

**Tabla 6.3.** Contenido del medio GYS x4

Reactivo	Cantidad (g/L)
Glucosa	120
Extracto de levadura	48
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	12
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0.48
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	6
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	0.36
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6

### 6.5 Cultivo en medio líquido

Para el CML se usaron matraces de 250 mL con 14.6 mL de medio de cultivo GYS x4, los matraces con el medio se esterilizaron a 15 lb/in<sup>2</sup> a 121°C por 15 min. Las unidades experimentales se inocularon con 0.7 mL de cultivo inóculo. La incubación se realizó a 30 °C en agitación constante de 200 rpm. El muestreo se realizó durante 72 horas de cultivo con ayuda de tubos tipo Falcon de 50 mL previamente esterilizado.

### 6.6 Cultivo en medio sólido

En matraces de 250 mL se agregó 1 g de espuma de poliuretano (cubos de 0.7 cm obtenidos de láminas de espuma flexible de poliuretano, densidad 17 Kg m<sup>-3</sup>), y se esterilizó por dos ciclos en autoclave (15 min a 15 lb/in<sup>2</sup> y 121°C). Posteriormente la espuma se impregnó con 14.6 mL del medio GYS x4, previamente esterilizado e inoculado con 0.7 mL del cultivo inóculo de las cepas *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub> o EA<sub>3</sub>; la espuma y el medio agregado se homogeneizaron con una espátula estéril. Los matraces se incubaron de forma estática a 30 °C. Se monitoreo el crecimiento en distintos tiempos en un lapso de 72 h. La colecta de las muestras se realizó exprimiendo los cubos de PUF con jeringas de 60 mL en tubos Falcón de 50 mL estériles (López-Pérez *et al*, 2010). Después del proceso de extracción se realizaron lavados con solución de Tween 80 al 1% o cloruro de sodio al 0.85%, esto para extraer la cantidad de biomasa y esporas que pudieran haber quedado retenidas en los cubos de PUF.

### 6.7 Cuantificación de biomasa

Se cuantifico la producción de biomasa mediante peso seco. Para esto, 15 mL de las muestras colectadas en tubos Falcon de 50 mL fueron transferidas a tubos cónicos, previamente colocados a peso constante en estufa a 60°C, estos fueron centrifugados a 8000 rpm por 10 min (), el sobrenadante se descartó por vertido. El tubo cónico con el pellet fue colocado nuevamente a peso constante en estufa a 60°C. La biomasa producida fue cuantificada por diferencia de peso seco entre el tubo con y sin pellet.

### 6.8 Cuantificación de esporas

Se prepararon diluciones seriadas de cada muestra con solución de Tween 80 al 1% (Madigan, Martinko y Parker 2009), y se cuantificaron esporas libres mediante el conteo en cámara de Neubauer en microscopio óptico a 40X.

### 6.9 Viabilidad de esporas

La viabilidad de las esporas se realizó mediante conteo de unidades formadoras de colonia (UFC): se ajustaron suspensiones a  $1 \times 10^4$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  en Tween 80 al 1%; las esporas fueron sometidas a choque térmico en un termomixer a  $80^\circ\text{C}$  por 10 min y enfriadas en hielo por 5 min. Después, se sembraron 30  $\mu\text{L}$  (aprox. 300 células) de cada muestra por extensión en placas de LB, y se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  durante 12-18 h (Zhuang *et al*, 2011).

### 6.10 Microscopía Electrónica de Barrido

Se empleó microscopía electrónica de barrido para observar el crecimiento y formación de biopelícula de *B. thuringiensis* en los cubos de PUF. Las muestras seleccionadas se sometieron a un proceso de fijación con glutaraldehído durante 48 h, después de este tiempo se realizaron lavados con amortiguador de fosfatos (0.1 M, pH 7.2). Las muestras se sometieron a una segunda fijación con tetraóxido de osmio, después de este proceso se realizaron lavados con etanol a diferentes concentraciones (30-100%) para deshidratar las muestras. Una vez terminado este proceso las muestras se secaron a punto crítico y se fijaron en cintas de carbono y grafito. Una vez fijadas las muestras se cubrieron con oro para finalmente realizar la observación en el microscopio electrónico de barrido (Lima-Pérez, 2015).

### 6.11 Proteína total

Se cuantificó la proteína total en los sistemas líquido y sólido para ambas cepas de *B. thuringiensis* mediante el método de Bradford en microplaca, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Bio-Rad Protein Assay).

### 6.12 Expresión de proteína Cry

Para mostrar la producción de proteína Cry en los sistemas de cultivo, se realizó una electroforesis en geles de acrilamida desnaturizantes SDS PAGE (Laemmli 1970). Las muestras obtenidas de cada sistema de cultivo se centrifugaron a 8,000 rpm por 20 min, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en un volumen de 1000  $\mu$ L con agua destilada. Se tomaron 30  $\mu$ L de la suspensión, se mezclaron con 10  $\mu$ L de buffer de carga (adicionado con  $\beta$ -mercaptoetanol) y se incubó la muestra a 90 °C por 7 min. Al finalizar la incubación, se centrifugó la muestra a 12,000 rpm por 8 min, y se tomaron 30  $\mu$ L para cargar el gel de acrilamida/bisacrilamida (se utilizó una concentración de 4% para el gel concentrador y de 8% para el gel de resolución); el gel corrió a 110V por 1:30 horas. Después de este tiempo, el gel se tiñó en solución de azul de Coomassie durante la noche. Como control positivo, se utilizaron las cepas identificadas *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD1 y HD73, pues estas producen diversas proteínas Cry. La cepa HD1 produce las proteínas Cry 1Ac (133 kDa), Cry 1Ab (130 kDa) y Cry 2Ab (71 kDa) (Azzouz et al, 2014; Zhang et al, 2013; Crickmore et al, 2020; Ugur et al, 2015). La cepa HD73 produce la proteína Cry 1Ac (133 kDa) (Farrera et al, 1998; Liu et al, 2013; Zhou et al, 2015; Crickmore et al, 2020).

La producción de proteína Cry también se corroboró mediante la observación de la biomasa recuperada de los sistemas de cultivo sólido y líquido con medio GYSx4 en el microscopio de contraste de fases (Olympus BH2-RFCA); nuevamente se utilizaron las cepas HD1 y HD73 como control positivo para la producción de Cry.

### 6.13 Bioensayo

La capacidad infectiva de ambas cepas se determinó utilizando larvas de entre 1 y 2 cm de largo del insecto modelo *Galleria mellonella*, adquiridas con la empresa Petmmal S.A. de C.V., fabricante y comercializadora de alimentos y accesorios para mascotas. El diseño experimental fue modificado de Fedhila y colaboradores (2010), cada tratamiento se realizó por triplicado, y cada unidad experimental consistió en 10 larvas colocadas en una caja Petri. En cada unidad experimental se

colocó 0.1 g de algodón impregnado con 1 mL de una suspensión de esporas-cristal, obtenidas a partir de cultivo líquido o sólido, en una concentración de  $1 \times 10^8$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ . Este procedimiento se realizó utilizando esporas de ambas cepas de *B. thuringiensis* de manera independiente. Como control negativo, en uno de los triplicados se colocó 0.1 g de algodón impregnado con 1 mL de Tween 80 al 1%. Las larvas fueron incubadas a  $26^\circ\text{C}$  por 6 días con periodos de 12h/12h (luz/oscuridad). Posterior al tiempo de incubación, el número de larvas muertas en cada tratamiento fue cuantificado.

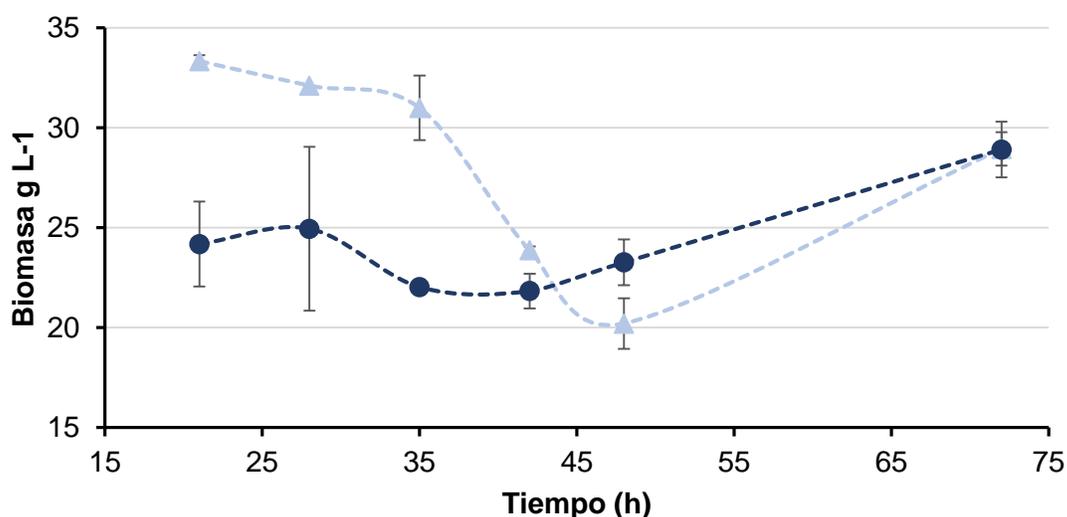
### **6.14 Análisis estadístico**

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, los datos son presentados en gráficos con medias y desviación estándar. El tiempo de máxima producción de biomasa y esporas, así como la diferencia de recuperación de biomasa y las diferencias entre la sobrevivencia del bioensayo fue determinado por Análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, utilizando la prueba Tukey como criterio de comparación de medias. Para la comparación de producción de esporas entre CMS y CML, la comparación de esporas recuperadas con lavado de Tween 80 al 1% o NaCl al 0.85%, la producción de proteína total y viabilidad de esporas se utilizó la prueba *t*-Student, donde un valor de  $P < 0.05$  fue considerado como significativo.

## 7. RESULTADOS

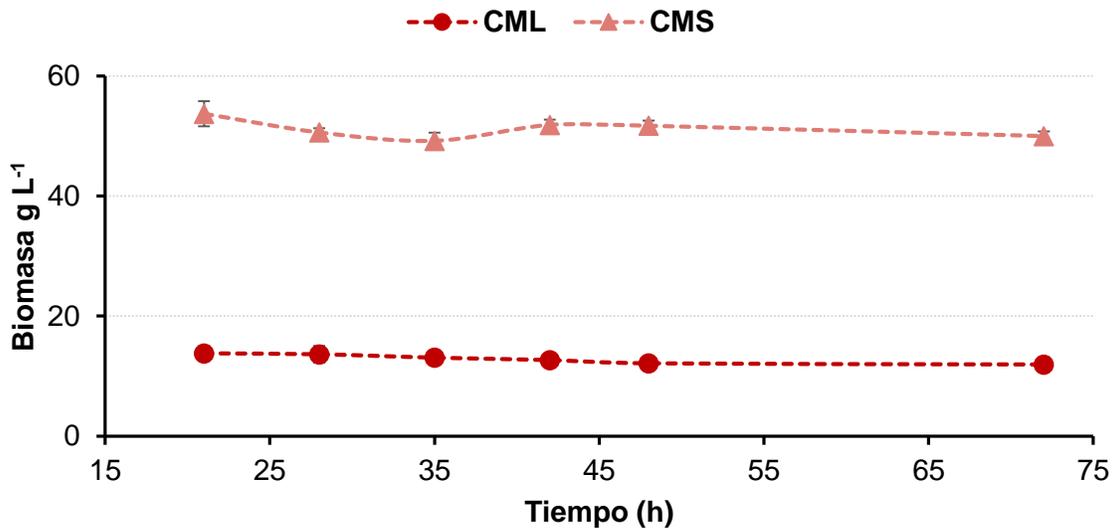
### 7.1 Producción de biomasa

Uno de los indicadores del crecimiento de *B. thuringiensis* es la producción de biomasa, dicha concentración podría reflejar la producción de esporas y proteína Cry. En las Figuras 7.1 y 7.2 se muestra la producción de biomasa a partir de las 20 horas de cultivo y hasta las 72 horas de las cepas de *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub> y EA<sub>3</sub> respectivamente.



**Figura 7.1.** Producción de biomasa durante el cultivo de *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub> en medio GYSx4: Cultivo en medio líquido (círculos azul marino), cultivo en medio sólido (triángulos azul cielo).

En la Figura 7.1 se observa que la mayor producción de biomasa, para la cepa *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub>, se obtiene en cultivo en medio sólido, alcanzando un máximo de  $33 \pm 0.3 \text{ g L}^{-1}$  a las 21 horas de cultivo, mientras en cultivo en medio líquido la mayor producción de biomasa se obtiene a las 72 horas con  $28.9 \pm 1.4 \text{ g L}^{-1}$ . En esta misma figura se observa que en CMS la cantidad de biomasa tiende a disminuir a partir de las 35 h, lo que indica la posible lisis celular para la liberación de esporas, mientras en CML la producción de biomasa se mantiene casi constante alrededor de  $25 \text{ g L}^{-1}$ .



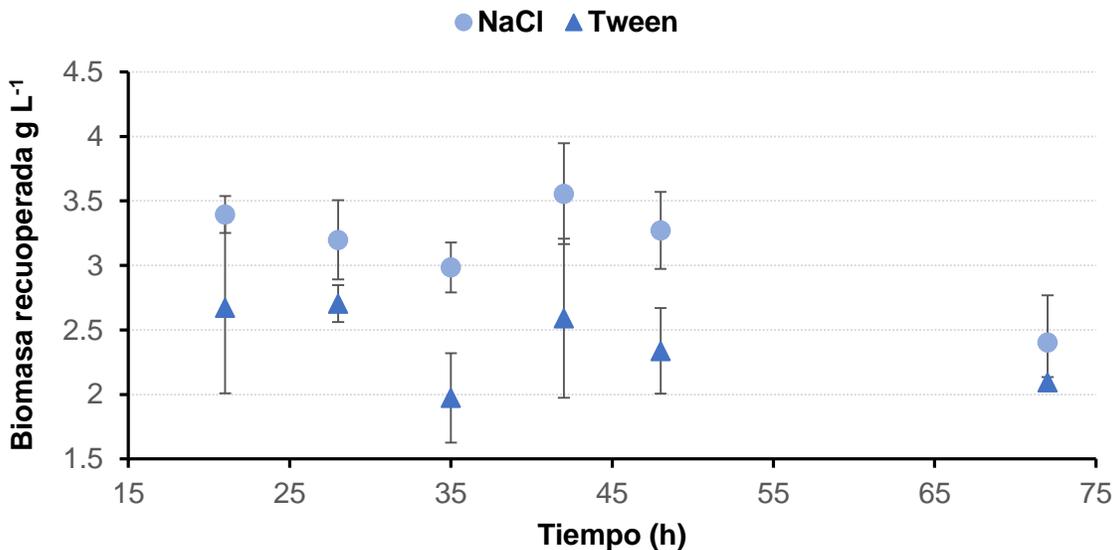
**Figura 7.2.** Producción de biomasa durante el cultivo de *B. thuringiensis* EA<sub>3</sub> en medio GYSx4: Cultivo en medio líquido (círculos color vino), cultivo en medio sólido (triángulos rosa oscuro).

Respecto a la producción de biomasa de la cepa de *B. thuringiensis* EA<sub>3</sub>, en la Figura 7.2 se observa mayor producción de biomasa en CMS ( $51.6 \pm 0.87 \text{ g L}^{-1}$ ), 3.7 veces superior respecto a la observada en CML ( $13.8 \pm 1.2 \text{ g L}^{-1}$ ). En esta cepa, no se observa una tendencia clara de lisis celular o aumento en la producción de biomasa en ninguno de los dos sistemas de cultivo.

De acuerdo con Flores-Tufiño (2016) la mayor producción de biomasa para las cepas Y<sub>15</sub> y EA<sub>3</sub>, al utilizar  $120 \text{ g L}^{-1}$  de glucosa inicial, se obtiene en CMS, con  $13.3 \text{ g L}^{-1}$  y  $12.7 \text{ g L}^{-1}$  respectivamente para cada cepa, contra  $10.1 \text{ g L}^{-1}$  y  $5.1 \text{ g L}^{-1}$  obtenidos en CML para la cepa Y<sub>15</sub> y EA<sub>3</sub> respectivamente. Utilizando la cepa de *B. thuringiensis* HD73 y una concentración de  $50 \text{ g L}^{-1}$ , Lima-Pérez y colaboradores (2019) obtienen una producción de biomasa ( $30.73 \text{ g L}^{-1}$ ) utilizando CMS, similar a lo producido por la cepa Y<sub>15</sub> en el mismo sistema, sin embargo, es menor a lo producido por la cepa EA<sub>3</sub>. La concentración de biomasa obtenida en estudios previos, en condiciones de cultivo similares es superada en este estudio, al menos para la cepa EA<sub>3</sub>.

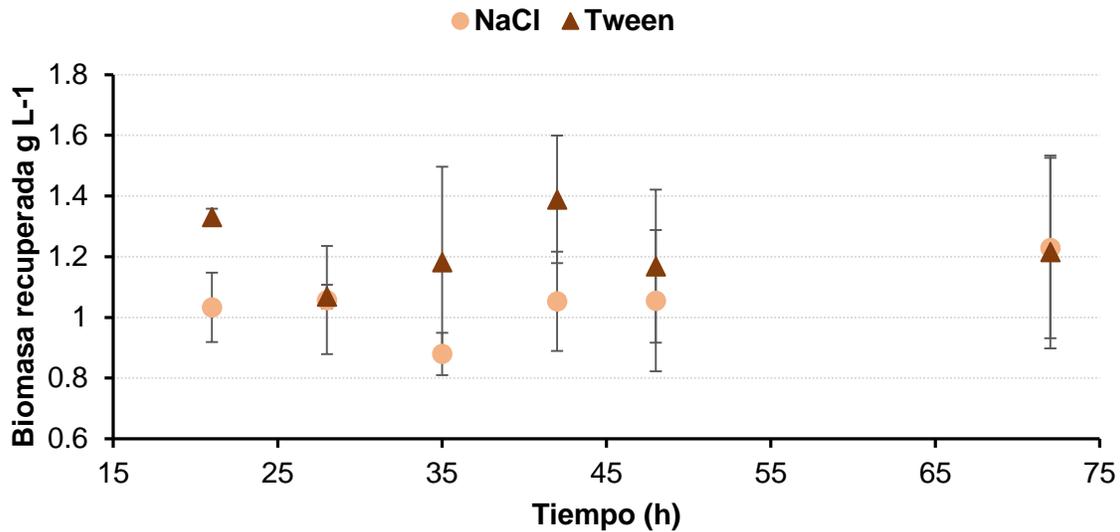
## 7.2 Biomasa retenida

Se observó que durante el proceso de extracción de biomasa del cultivo en medio sólido había la posibilidad de que esta quedara retenida entre las trabéculas de los cubos de espumas de poliuretano. Debido a ello, se planteó el lavado de PUF utilizado como soporte sólido con dos soluciones: Tween 80 al 1% y Cloruro de sodio al 0.85%, para tratar de destruir las interacciones entre la biomasa generada y el PUF. En las Figuras 7.3 y 7.4 se muestran los valores de biomasa recuperada, mediante los lavados, a cada uno de los tiempos muestreados para las cepas, *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub> y EA<sub>3</sub> respectivamente.



**Figura 7.3.** Biomasa recuperada de la cepa *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub> con el lavado realizado: Lavado con solución de Cloruro de sodio al 0.85% (Círculos azul cielo), Lavado con solución de Tween 80 al 1% (Triángulos azul rey).

En la Figura 7.3 se muestra la cantidad de biomasa recuperada para la cepa *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub>, varía entre 2 y 3.5 g L<sup>-1</sup> sin diferencia significativa, independientemente de que el lavado se realice con solución de NaCl al 0.85% o Tween 80 al 1%, destacando que al tiempo de máxima producción de esporas (48 h) se recupera mayor cantidad de biomasa al utilizar NaCl respecto a Tween 80 (3.27 ± 0.29 g L<sup>-1</sup> vs 2.33 ± 0.33 g L<sup>-1</sup> respectivamente) y que la cantidad de biomasa recuperada a las 72 h es menor que en todos los otros tiempos de muestreo.



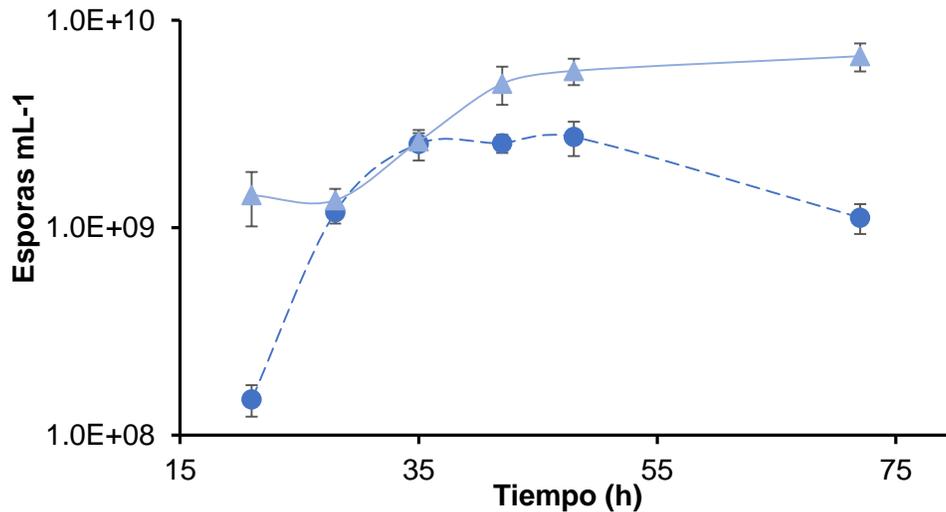
**Figura 7.4.** Biomasa recuperada de la cepa *B. thuringiensis* EA<sub>3</sub> con el lavado realizado: Lavado con solución de Cloruro de sodio al 0.85% (Círculos color salmón), Lavado con solución de Tween 80 al 1% (Triángulos color café).

Un resultado similar se obtiene para la cepa EA<sub>3</sub> (Fig. 7.4), no existe diferencia significativa en la recuperación de biomasa respecto a la solución de lavado utilizada. La biomasa recuperada mediante los lavados varía entre 0.8 y 1.4 g L<sup>-1</sup> para esta cepa y a diferencia de los observado en la cepa Y<sub>15</sub>, no se observa diferencia en la cantidad de biomasa recuperada al tiempo máximo de producción de esporas (48h).

### 7.3 Producción de esporas

Uno de los productos principales de *B. thuringiensis* son las esporas, por lo que se determinó la producción de esporas en cada cepa a distintos tiempos de cultivo. Para la cepa *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub> (Figura 7.5) se observa que en CMS hay un aumento en la producción de esporas respecto al tiempo, que es consistente con la disminución de biomasa observada en la Figura 7.1, pero no se observa un cambio significativo en la producción de esporas después de las 42 h. En contraste, en CML no se muestra diferencia significativa en la producción de esporas a partir de las 36 h de cultivo hasta las 48h, pero se observa una marcada disminución en producción

de esporas a las 72 h. A las 48 h, la producción de esporas es 2 veces mayor en CMS respecto al cultivo en medio líquido ( $5.70 \times 10^9 \pm 8.25 \times 10^8$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  y  $2.73 \times 10^9 \pm 5.15 \times 10^8$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente).

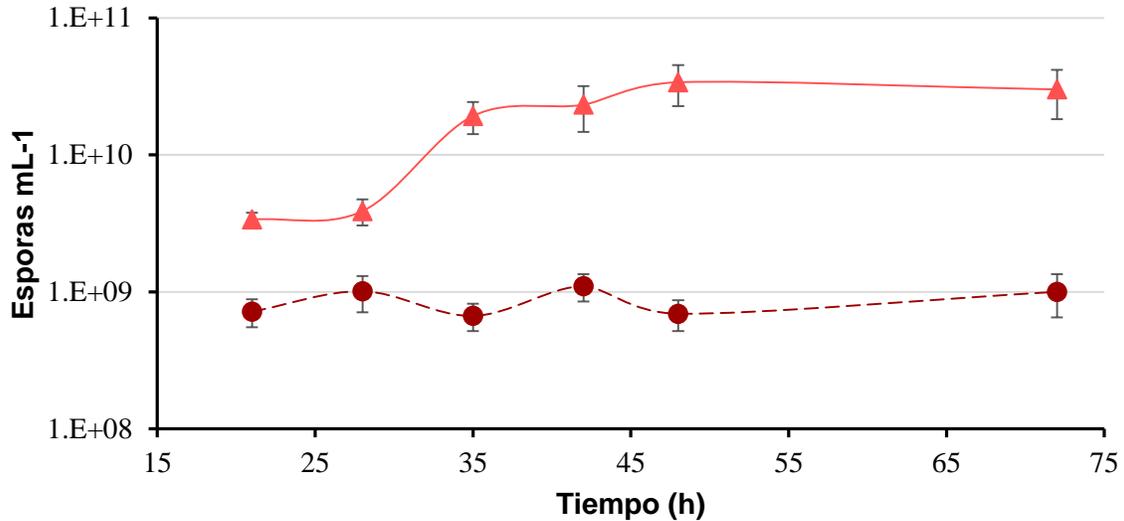


**Figura 7.5.** Producción de esporas durante el cultivo de *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub> en medio GYSx4: Cultivo en medio líquido (círculos), cultivo en medio sólido (triángulos).

En la Figura 7.6 se muestra la producción de esporas para la cepa de *B. thuringiensis* EA<sub>3</sub>, la producción en CMS supera hasta en un orden de magnitud la producción obtenida en CML. A diferencia de lo que se observa en la cepa Y<sub>15</sub> (una disminución en la cantidad de biomasa al mismo tiempo en que la cantidad de esporas va en aumento), la cantidad de biomasa de la cepa EA<sub>3</sub> no presenta ninguna tendencia pues no hay diferencia significativa en la cantidad de biomasa producida en los diferentes tiempos de muestreo.

La producción máxima de esporas en CMS fue alcanzada a las 48 h, y se mantiene estable hasta las 72 h, en el caso de CML no hay diferencia significativa en ninguno de los tiempos muestreados, aunque se observó un máximo a las 42h. Al comparar la producción de esporas en ambos sistemas se observó que el cultivo en medio sólido aumentó la producción de esporas hasta 30 veces, en comparación con

cultivo en medio líquido ( $3.39 \times 10^{10} \pm 1.12 \times 10^{10}$  esporas mL<sup>-1</sup> y  $1.10 \times 10^9 \pm 2.50 \times 10^8$  esporas mL<sup>-1</sup>, respectivamente).

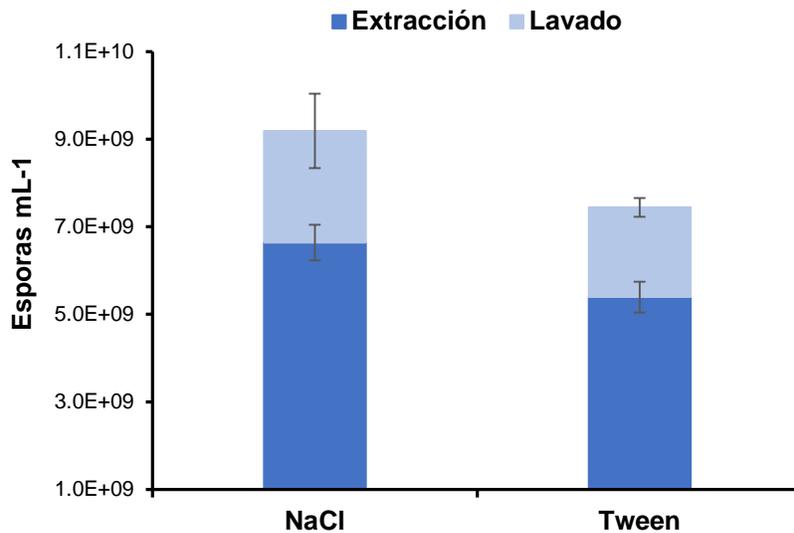


**Figura 7.6.** Producción de esporas durante el cultivo de *B. thuringiensis* EA<sub>3</sub> en medio GYSx4: **CML** (círculos), **CMS** (triángulos).

Considerando estos resultados y los obtenidos para la cepa Y<sub>15</sub>, se consideró que la máxima producción de esporas en ambos sistemas ocurre a las 48 h, por lo que todos los ensayos posteriores se realizaron con esporas cosechadas a este tiempo de cultivo.

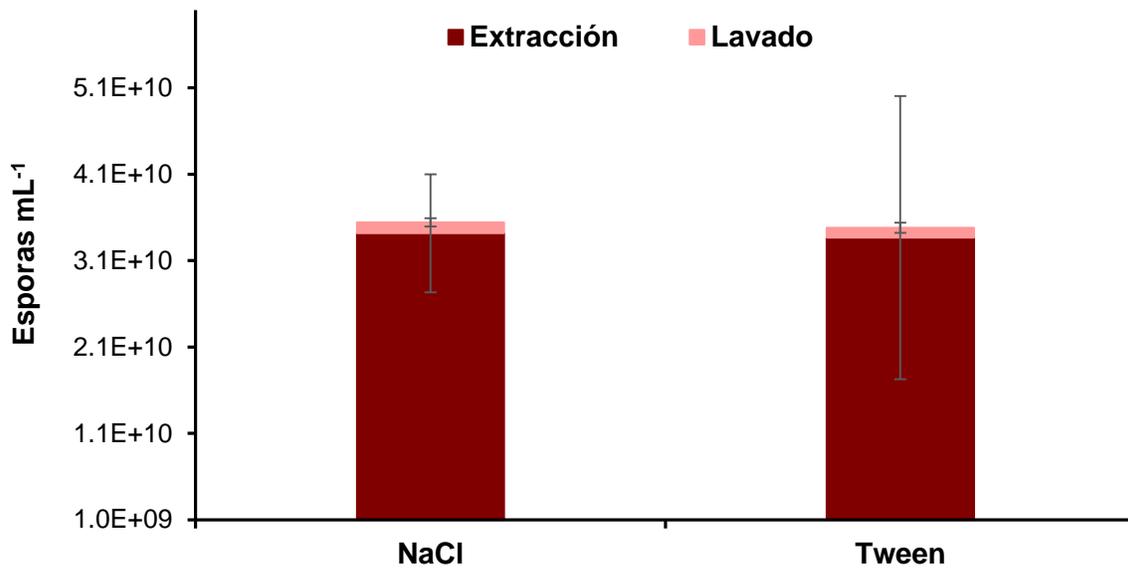
#### 7.4 Esporas retenidas

Considerando que se demostró que entre el 10 y 20% de la biomasa de la cepa Y<sub>15</sub> y aproximadamente el 3% de la cepa EA<sub>3</sub> quedaban retenidas en el PUF, se investigó la cantidad de esporas retenidas después de la cosecha de esporas por compresión del PUF.



**Figura 7.7.** Esporas de la cepa *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub> en el tiempo máximo de producción: Barra azul marino representan la cantidad de esporas recuperadas exprimiendo la espuma de poliuretano (ver materiales y métodos), Barra azul cielo representa las esporas recuperadas después de los lavados.

En la Figura 7.7 se muestra la cantidad de esporas obtenidas al tiempo máximo (48h) de producción de la cepa Y<sub>15</sub> en CMS (barra azul marino) así como la cantidad de esporas recuperadas con cada lavado realizado (barra azul cielo) con las soluciones de NaCl y Tween 80. La cantidad recuperada con los lavados en ambos casos es aproximadamente 35% del total de esporas mL<sup>-1</sup> con Tween 80 y NaCl (2.55x10<sup>9</sup> ± 8.51x10<sup>8</sup> esporas mL<sup>-1</sup> con NaCl y 2.05x10<sup>9</sup> ± 2.14x10<sup>8</sup> esporas mL<sup>-1</sup> con Tween 80), respecto a la cantidad que se extrajo con la fuerza mecánica ejercida por la jeringa (6.64x10<sup>9</sup> ± 4.07x10<sup>8</sup> esporas mL<sup>-1</sup> y 5.39x10<sup>9</sup> ± 3.50x10<sup>8</sup> esporas mL<sup>-1</sup>), sin mostrar diferencia significativa entre ambos lavados.



**Figura 7.8.** Producción de esporas de la cepa *B. thuringiensis* EA<sub>3</sub> en el tiempo máximo de producción (48h): La barra color vino representan la cantidad de esporas recuperadas exprimiendo la espuma de poliuretano (ver materiales y métodos), La barra color rosa representa las esporas recuperadas después de los lavados.

En la Figura 7.8 se muestra la cantidad de esporas en el tiempo de máxima producción (48h) para la cepa EA<sub>3</sub> (barras color vino) así como la cantidad de esporas recuperadas con el correspondiente lavado (Barra color rosa). A diferencia de la cepa Y<sub>15</sub>, el porcentaje de recuperación de esporas de la cepa EA<sub>3</sub> es de aproximadamente 3.5%, 10 veces menor a lo recuperado por la cepa Y<sub>15</sub>, sin embargo, la sola producción de esporas de la cepa EA<sub>3</sub> es 5 veces mayor que la producción de la cepa de *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub>. Para esta cepa tampoco hay diferencia significativa entre la cantidad de esporas recuperadas con el lavado con NaCl o Tween 80 ( $1.25 \times 10^9 \pm 4.82 \times 10^8$  esporas mL<sup>-1</sup> y  $1.13 \times 10^9 \pm 5.99 \times 10^8$  esporas mL<sup>-1</sup> respectivamente).

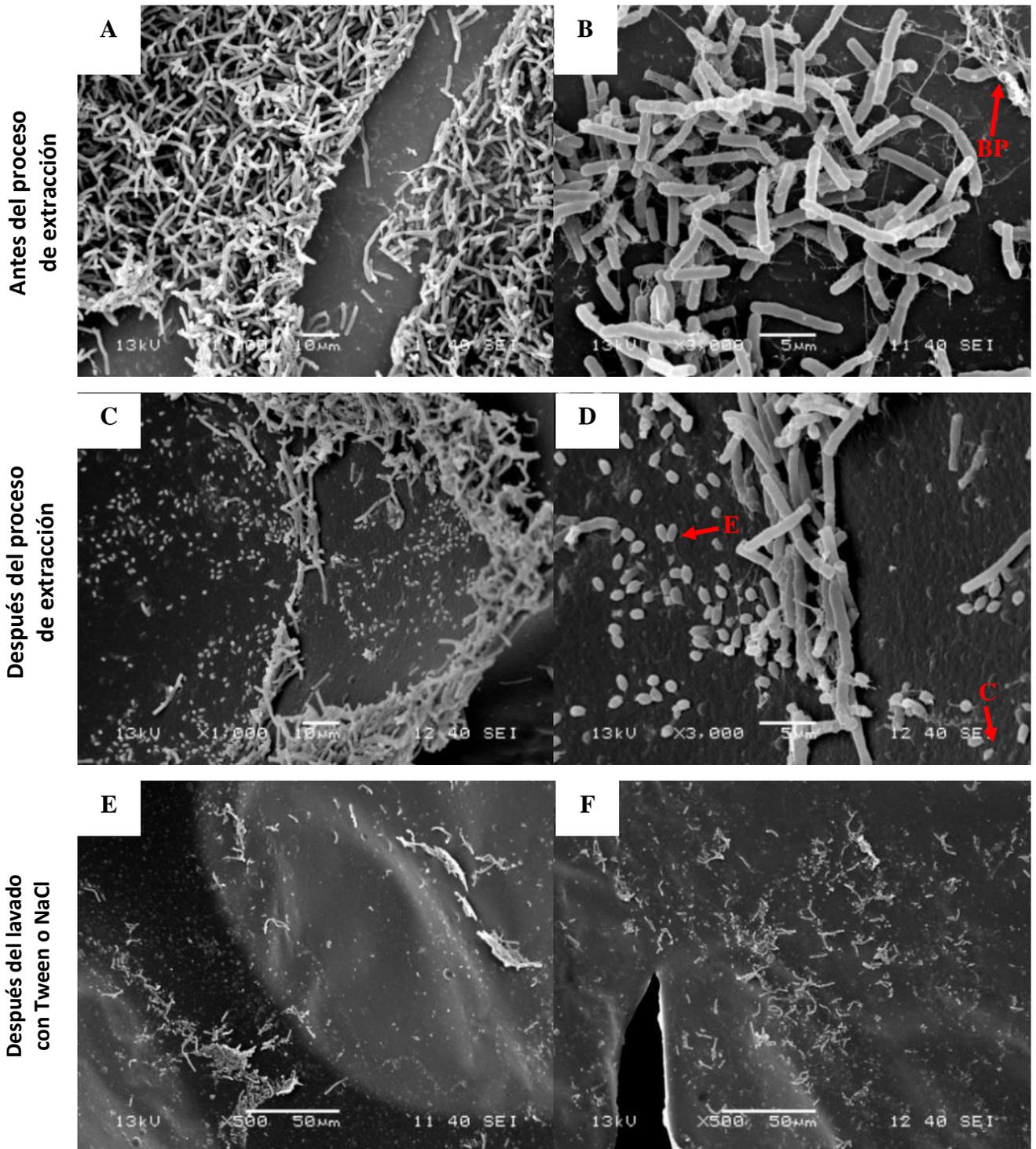
### 7.5 Microscopia electrónica de barrido

Con el objetivo de observar el crecimiento de *B. thuringiensis* sobre espuma de poliuretano antes y después del proceso de extracción, así como después del proceso de lavado se realizó la observación de un cubo de la espuma por cada cepa utilizando microscopía electrónica de barrido. En la Figura 7.9 se muestran las

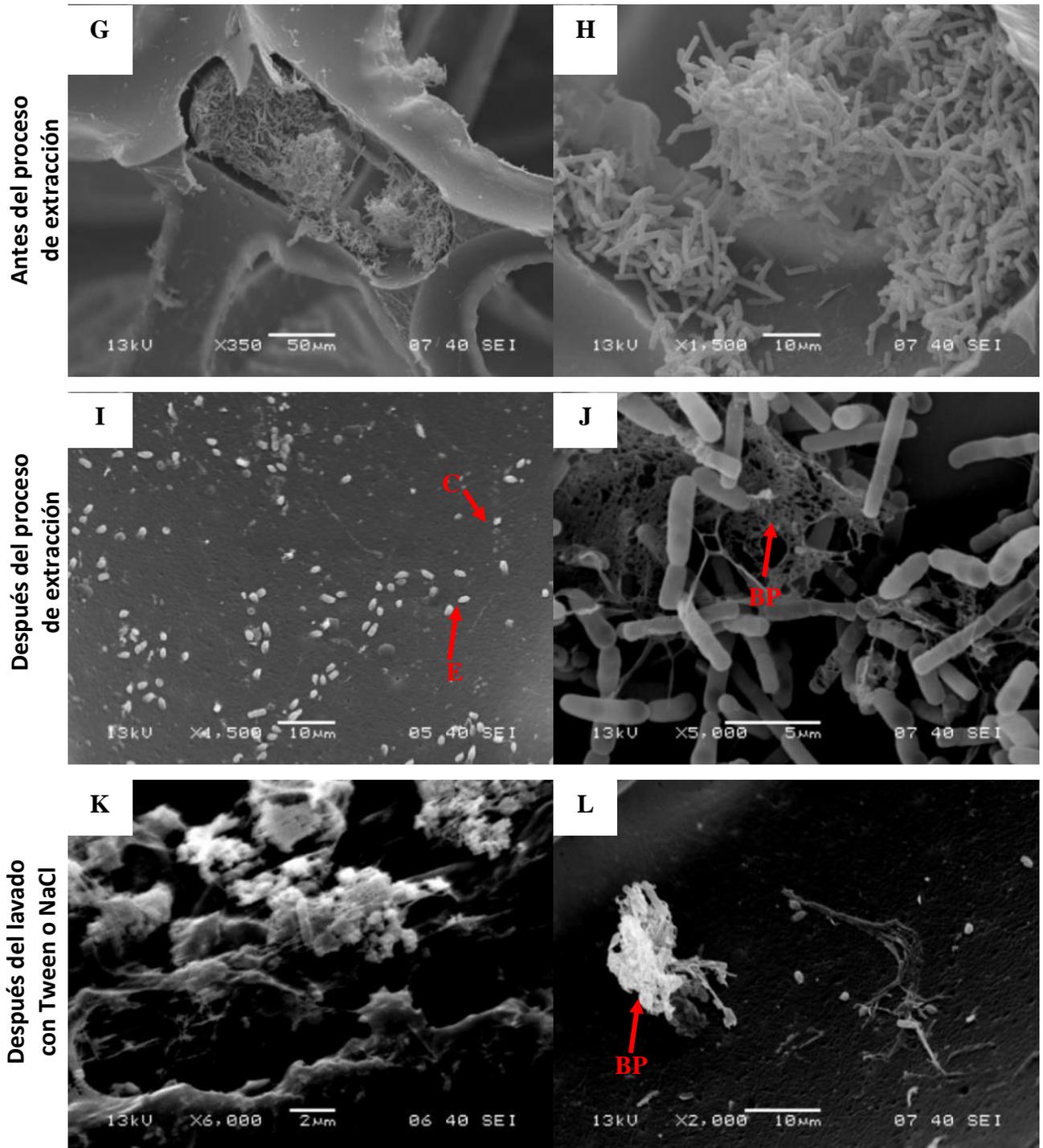
micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido, de las diferentes etapas por las que pasa la espuma de poliuretano en el tiempo de máxima producción de biomasa de la cepa de *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub> y EA<sub>3</sub>.

En la Figura 7.9 A, B, G y H se observa que las células bacterianas se conglomeran sobre las paredes de PUF para ambas cepas de *B. thuringiensis*, así mismo, se pueden observar (Figura 7.9 H) estructuras parecidas a telarañas, que podrían ser exopolisacáridos, componente principal de biopelículas (Branda *et al*, 2005; Branda *et al*, 2006; Flemming y Wingender, 2010). Estas estructuras pueden ser observadas antes del proceso de extracción y después del mismo. La producción de biopelícula en CMS puede ser una de las causas por las cuales la biomasa (incluyendo esporas) quedan retenidas en la espuma de poliuretano, lo que no se había reportado. En las mismas imágenes podemos observar no sólo bacilos formando agregados, sino también esporas libres que han quedado retenidas en las paredes del material y en algunos lugares se observan estructuras que podrían ser los cristales de la proteína Cry producida por esta bacteria (C, D, I y J). En las micrografías de la Figura 7.9 E, F, K y L podemos observar que, a pesar de realizar el proceso de lavado, existen restos celulares en las paredes del PUF, por lo que debe considerarse que podría subestimarse la producción de esporas en este sistema.

Y<sub>15</sub>



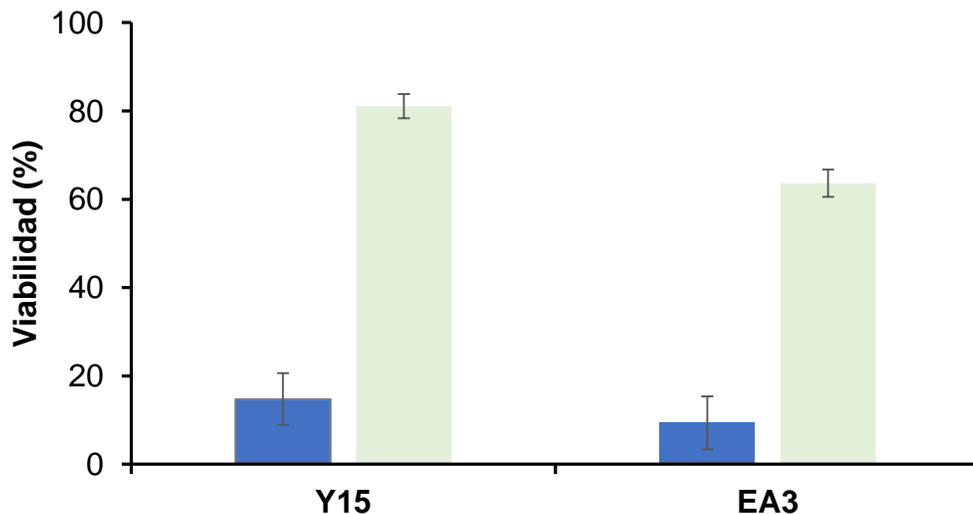
EA<sub>3</sub>



**Figura 7.9.** Microscopía Electrónica de Barrido: Crecimiento de *B. thuringiensis* Y15 y EA<sub>3</sub> en paredes de PUF (A, B, G y H); esporas y bacilos retenidos en las paredes de PUF después de la extracción (C, D, I y J); restos celulares después de realizar lavado con la solución de Tween 80 o NaCl (E, F, K y L).

### 7.6 Viabilidad de esporas

Unos de los principales retos para los bioinsecticidas es que los principios activos de sus formulados (esporas y toxina) sean viables al momento de la aplicación en campo, esto quiere decir que el principio activo pueda matar al insecto (toxina) y crecer en él (esporas), sin que esta capacidad disminuya con el paso del tiempo (almacenaje después de la producción) o por los factores ambientales del lugar en que se aplica (Behle y Birthisel, 2014; Brar *et al*, 2006). La prueba de viabilidad se utiliza para comparar la resistencia de las esporas de *B. thuringiensis* al estrés ocasionado por el incremento súbito de temperatura por un determinado periodo de tiempo (ver materiales y métodos). En la Figura 7.10 se muestra la viabilidad de las esporas producidas en ambos sistemas para las dos cepas de *B. thuringiensis*, después de un someterlas a un proceso de choque térmico.



**Figura 7.10.** Viabilidad de esporas posterior a choque térmico; CML (barras azules), CMS (barras verdes).

Las esporas producidas en CMS de ambas cepas son más resistentes a un cambio brusco en la temperatura, en comparación con las esporas producidas en CML (Figura 7.10). En el caso de la cepa Y<sub>15</sub>, 81% de las esporas producidas en cultivo en medio sólido resisten sobreviven un choque térmico, 5.5 veces más que las esporas producidas en cultivo en medio líquido (14.7%). En cuanto a la cepa EA<sub>3</sub> el

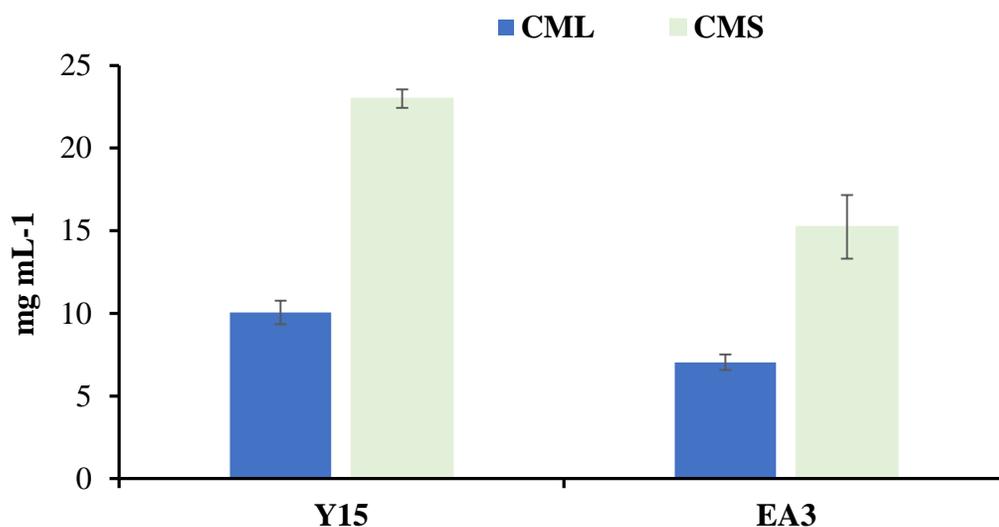
64% de las esporas producidas en cultivo en medio sólido sobreviven al choque térmico, 7 veces más que las producidas en cultivo en medio líquido (9.3%). Además de la diferencia notable en la viabilidad de las esporas producidas en ambos sistemas, también existen diferencias en la viabilidad de las esporas de cada cepa, de hecho, las esporas de la cepa Y<sub>15</sub> en CMS son más resistentes a cambios de temperatura en comparación con las esporas de la cepa EA<sub>3</sub>, posiblemente debido a las características individuales de cada cepa. Sin embargo, las esporas de ambas cepas podrían ser candidatas a la aplicación en campo mientras su producción sea bajo cultivo en medio sólido.

En diversos estudios se han reportado la viabilidad de las esporas de *B. thuringiensis* como resistencia a choque térmico. Zhuang y colaboradores (2011) mostraron viabilidades desde 65% hasta 88% de resistencia a choque térmico dependiendo del medio que se haya utilizado. Zhang y colaboradores (2015) obtienen aproximadamente un 90% de viabilidad en un sistema semi-sólido.

### 7.7 Proteína total

La principal característica de *B. thuringiensis* es la producción de proteína Cry durante la fase de esporulación (Aronson, 2002; Bechtel y Bulla, 1976). De acuerdo con los resultados de producción de esporas se puede esperar que en cultivo en medio sólido se obtenga una mayor producción de proteína Cry que en CML. En la Figura 7.11 se muestra la producción de proteína total, en ambos sistemas de cultivo para las dos cepas de *B. thuringiensis*, obtenida al tiempo de máxima producción de esporas (48 h). Esta cuantificación nos da un panorama de lo que podría observarse respecto a la producción de proteína Cry, que es una de las proteínas de mayor abundancia en el crecimiento de *B. thuringiensis* llegando a representar hasta el 25% del peso seco de la célula esporulada; se han caracterizado diversos mecanismos por los cuales *B. thuringiensis* es capaz de acumular tal concentración de proteínas dentro de la célula destacando el uso de promotores fuertes que aumentan la expresión de estas proteínas, así como el aumento en el número de copias del gen de la proteína Cry y la propia estabilidad de la proteína que al cristalizarse disminuye su susceptibilidad a la acción de proteasas, generando así

que la abundancia relativa de la proteína Cry sea mayor a otras proteínas producidas durante esta misma fase de crecimiento (Deng et al, 2014; Agaisse y Lereclus, 1995; Aronson, 2002).



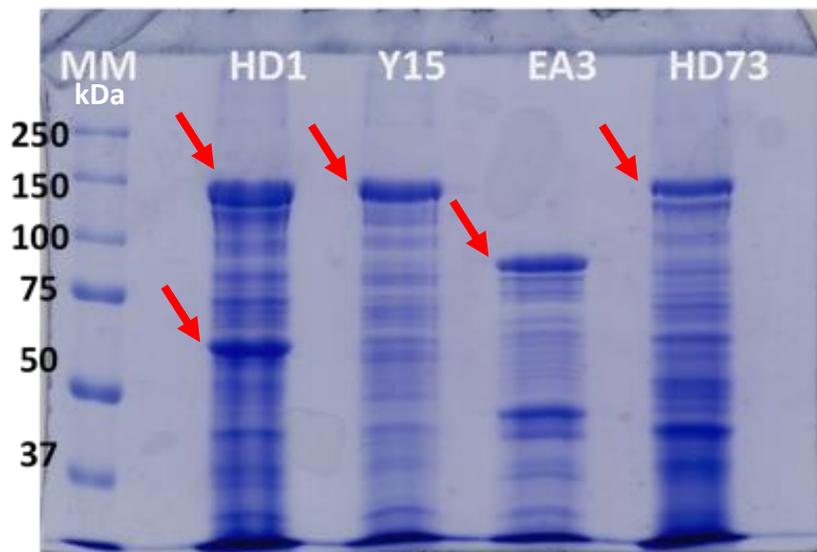
**Figura 7.11.** Producción de proteína total. CMS (barras verdes) y CML (barras azules).

La proteína total producida por las cepas *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub> y EA<sub>3</sub> en CMS (22.9 ± 1.9 µg mL<sup>-1</sup> y 15.2 ± 0.56 µg mL<sup>-1</sup> respectivamente) es aproximadamente el doble de la producida en CML (10.05 ± 0.47 µg mL<sup>-1</sup> y 7.03 ± 0.7 µg mL<sup>-1</sup> por *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub> y EA<sub>3</sub> respectivamente) (Figura 7.11), sin embargo, la cepa Y<sub>15</sub> produce más proteína total que la cepa EA<sub>3</sub> en ambos sistemas. El aumento de proteína total en cultivo en medio sólido es consistente con la mayor producción de biomasa y esporas en este sistema en comparación con el cultivo en medio líquido, aun sin considerar la cantidad de proteína que queda retenida en la espuma de poliuretano, lo que podría aumentar considerablemente la cantidad de proteína total producida en CMS.

### 7.8 Proteína Cry

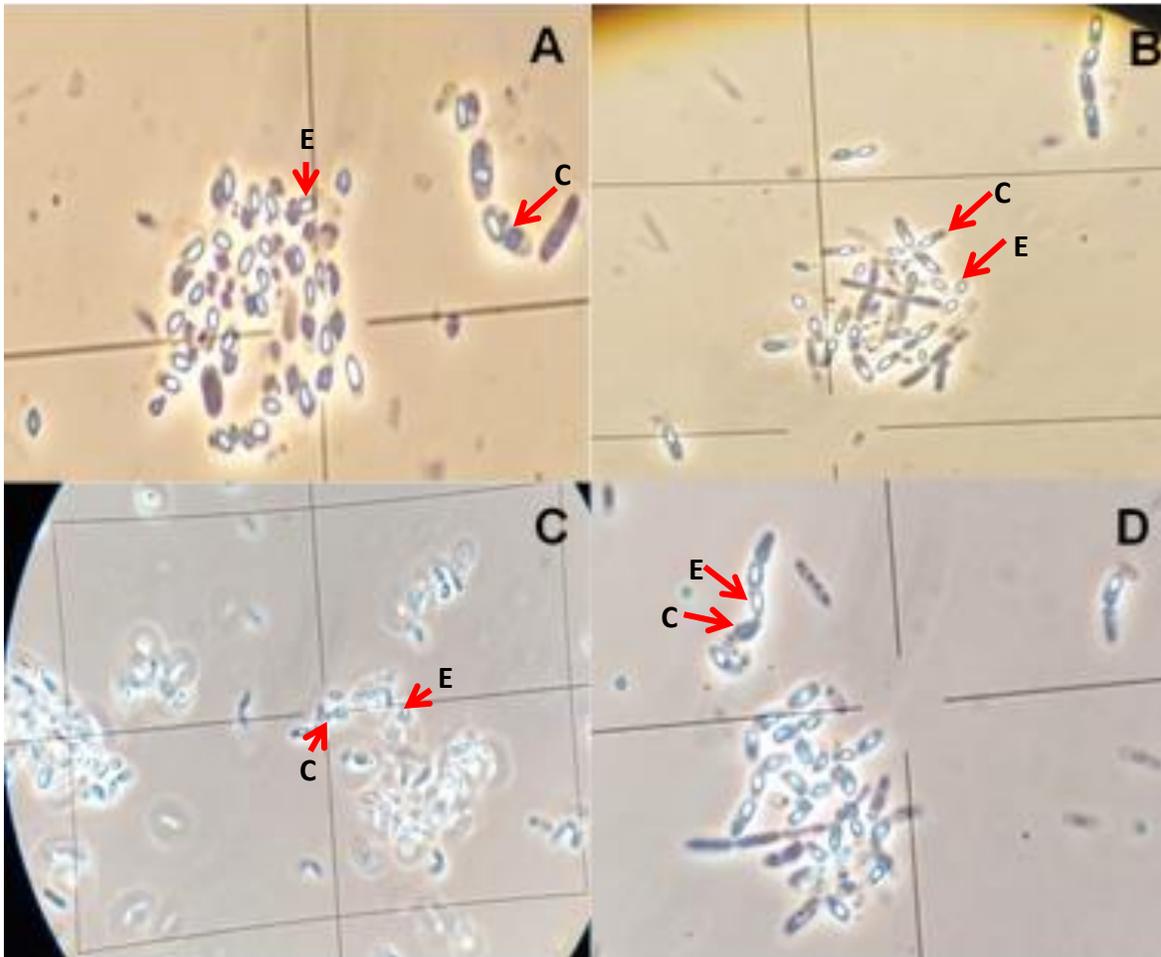
Se realizaron geles de poliacrilamida como una forma rápida de determinar la producción de proteína Cry en los sistemas de cultivo; se utilizaron las muestras de 48 h de cultivo, tiempo de máxima producción de esporas para ambas cepas. Primero se corroboró que las cepas en estudio produjeran Cry en matraces de 250





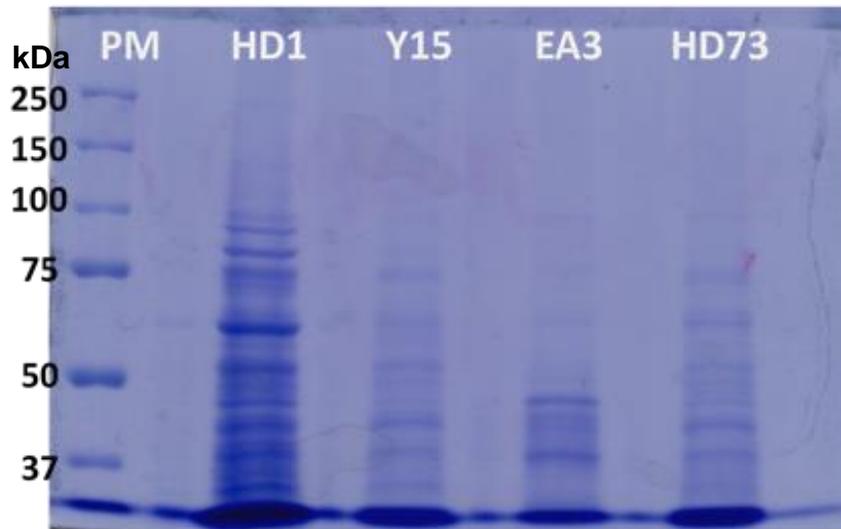
**Figura 7.12.** Electroforesis en Gel de poliacrilamida al 8% para determinar la producción de proteína Cry. Las muestras se obtuvieron de cada una de las diferentes cepas de Bt en medio LB líquido a las 72 h. Cepas de estudio: Y<sub>15</sub> y EA<sub>3</sub>; cepas de referencia: HD1 y HD73. Bandas correspondientes a proteína Cry de cada cepa están indicadas por una flecha roja.

Para determinar la morfología de las cepas de *B. thuringiensis* y el cristal de la proteína Cry que producen, se observaron en un microscopio de contraste de fases. La Figura 7.13 muestra las micrografías de las cuatro cepas de *B. thuringiensis* después de 72 h de cultivo en medio LB, se observa la presencia de los bacilos esporulados, esporas libres y una estructura amorfa. Ambas estructuras pueden ser diferenciadas por la forma y el color; bajo contraste de fases, las esporas (indicados como E) se observan como estructuras ovaladas bien definidas de color blanco brillante, mientras los cristales se observan como estructuras amorfas en un color azul opaco (indicados como C). También se observa que las células están en diferentes estados de desarrollo, las micrografías muestran la presencia de células en estado vegetativo, células esporuladas sin producción de Cry, células esporuladas con cristales de la proteína Cry, así como esporas y cristales de la proteína Cry libres (provenientes de células que sufrieron el proceso de lisis celular).



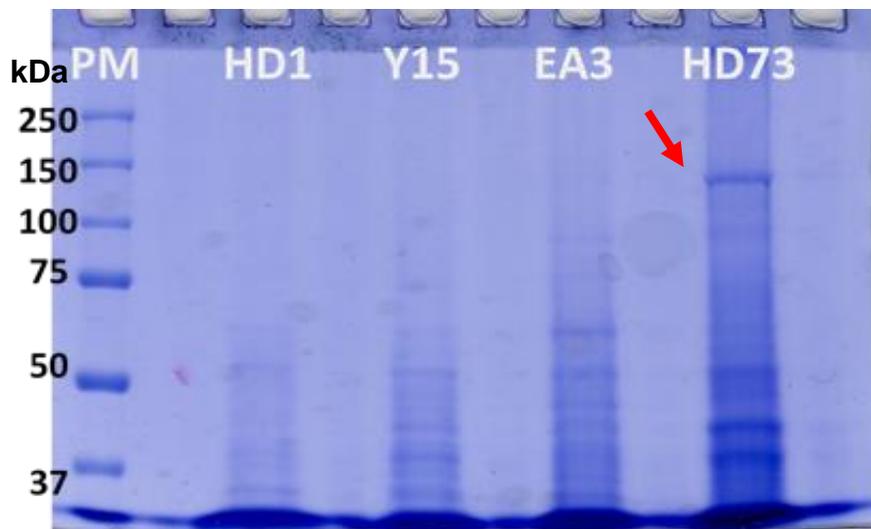
**Figura 7.13.** Micrografías en medio LB de cepas de *B. thuringiensis*: A) *B. thuringiensis* HD1, B) *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub>, C) *B. thuringiensis* EA<sub>3</sub> y D) *B. thuringiensis* HD73. Esporas (E) y Cristales (C). Objetivo a 100X. Las flechas rojas indican las esporas (E) y proteínas Cry (C).

Una vez que se demostró la producción de proteína Cry en todas las cepas en medio LB, se investigó la capacidad de producción de los cristales en medio GYSx4 en cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido a las 48 h de cultivo (Tiempo para máxima producción de esporas Figuras 7.5 y 7.6). Al igual que en el experimento anterior, se incluyeron las cepas control (HD1 y HD73) en el estudio. En la Figura 7.14 se muestran los perfiles proteicos de las 4 cepas de *B. thuringiensis* durante su crecimiento en cultivo en medio líquido GYSx4, se observa que ninguna de las cepas produce proteína Cry utilizando altas concentraciones de sustrato.



**Figura 7.14.** Perfil proteico de *B. thuringiensis* en CML a 48h de crecimiento en medio GYSx4.

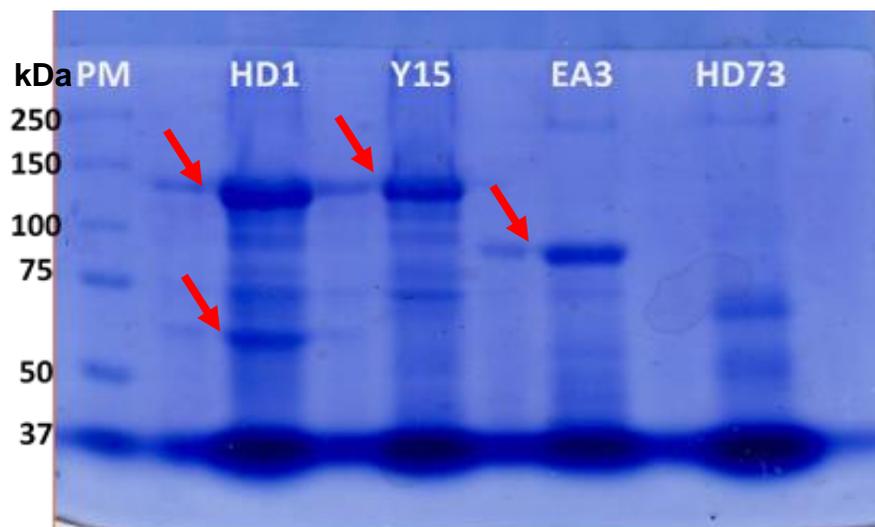
En la Figura 7.15 se muestran los perfiles proteicos de las cuatro cepas de *B. thuringiensis* cosechadas (exprimiendo el PUF con una jeringa) a las 48h de crecimiento en cultivo en medio sólido; se puede observar que, bajo estas condiciones, sólo la cepa HD73 produce una proteína Cry de entre 100 y 150 kDa (señalada con una flecha roja), sin embargo, la producción de proteína Cry en este medio es aparentemente menor a la obtenida en medio LB.



**Figura 7.15.** Perfil proteico de *B. thuringiensis* en CMS a 48h de crecimiento en medio GYSx4. Flecha roja indica proteína Cry.

Considerando que se demostró por microscopía electrónica de barrido que una parte de la biomasa se queda adherida al soporte del CMS (ver Figura 7.9) se realizó un lavado con solución de NaCl 0.85% para recuperar esporas y cristales Cry que quedaron adheridas en el soporte.

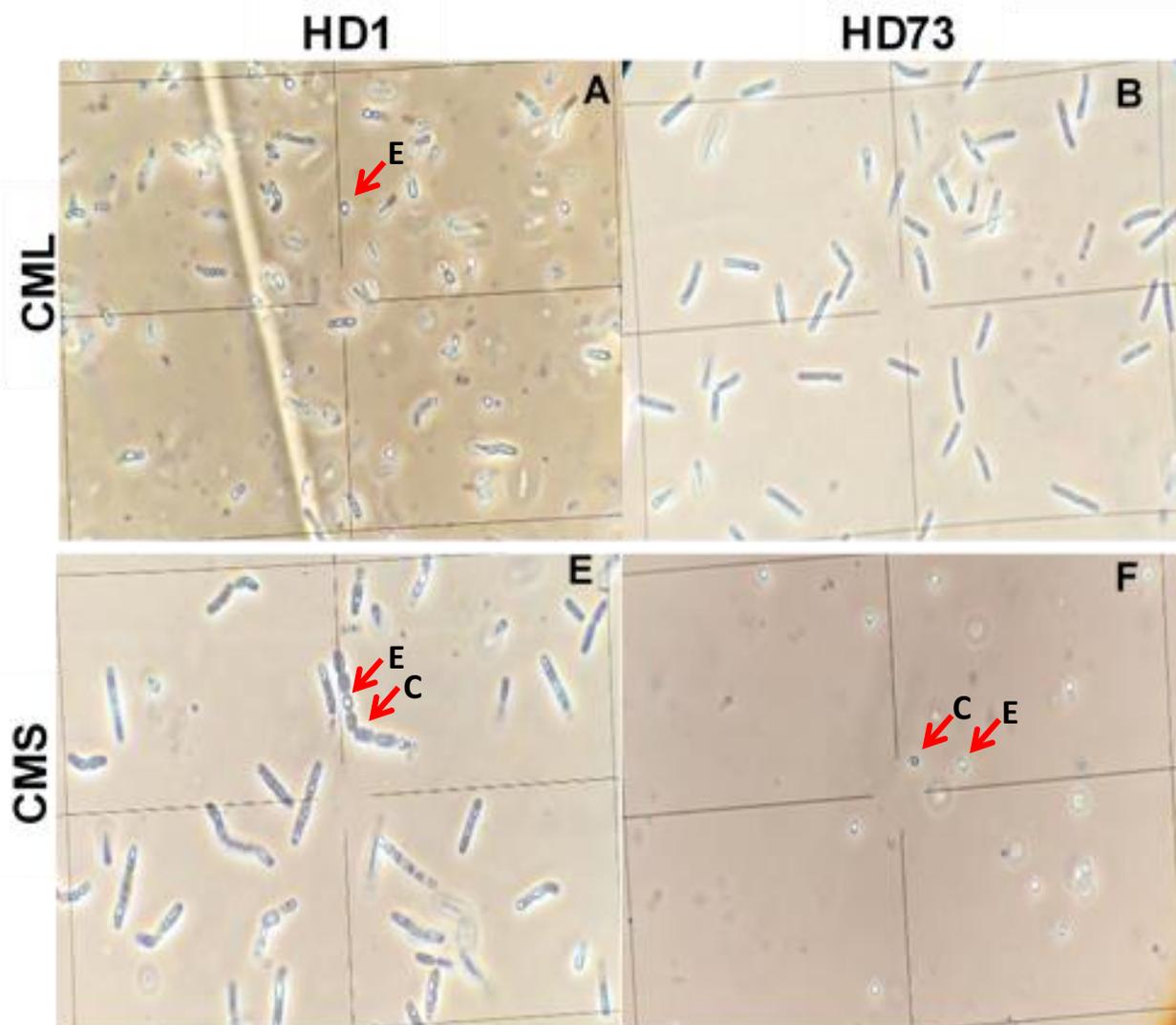
En la Figura 7.16 se muestran los perfiles proteicos de las cepas de *B. thuringiensis* posterior al lavado del soporte de CMS. Se observa que las cepas HD1, Y<sub>15</sub> y EA<sub>3</sub> producen sus correspondientes proteínas Cry (flechas rojas); en el caso de la cepa HD1, que produce más de una proteína, al utilizar medio GYSx4 en cultivo en medio sólido se producen predominantemente las proteínas Cry de alto peso molecular. A pesar de que la cantidad de biomasa y esporas retenidas representa del 3.5 al 35% de lo recuperado inicialmente parece ser que la gran mayoría de la proteína Cry producida queda adherida al soporte; esto demuestra también que el uso de CMS con altas concentraciones de sustrato permite la producción de estos metabolitos de interés industrial a diferencia del CML, donde no se observa la producción de la proteína Cry a las altas concentraciones de sustrato.

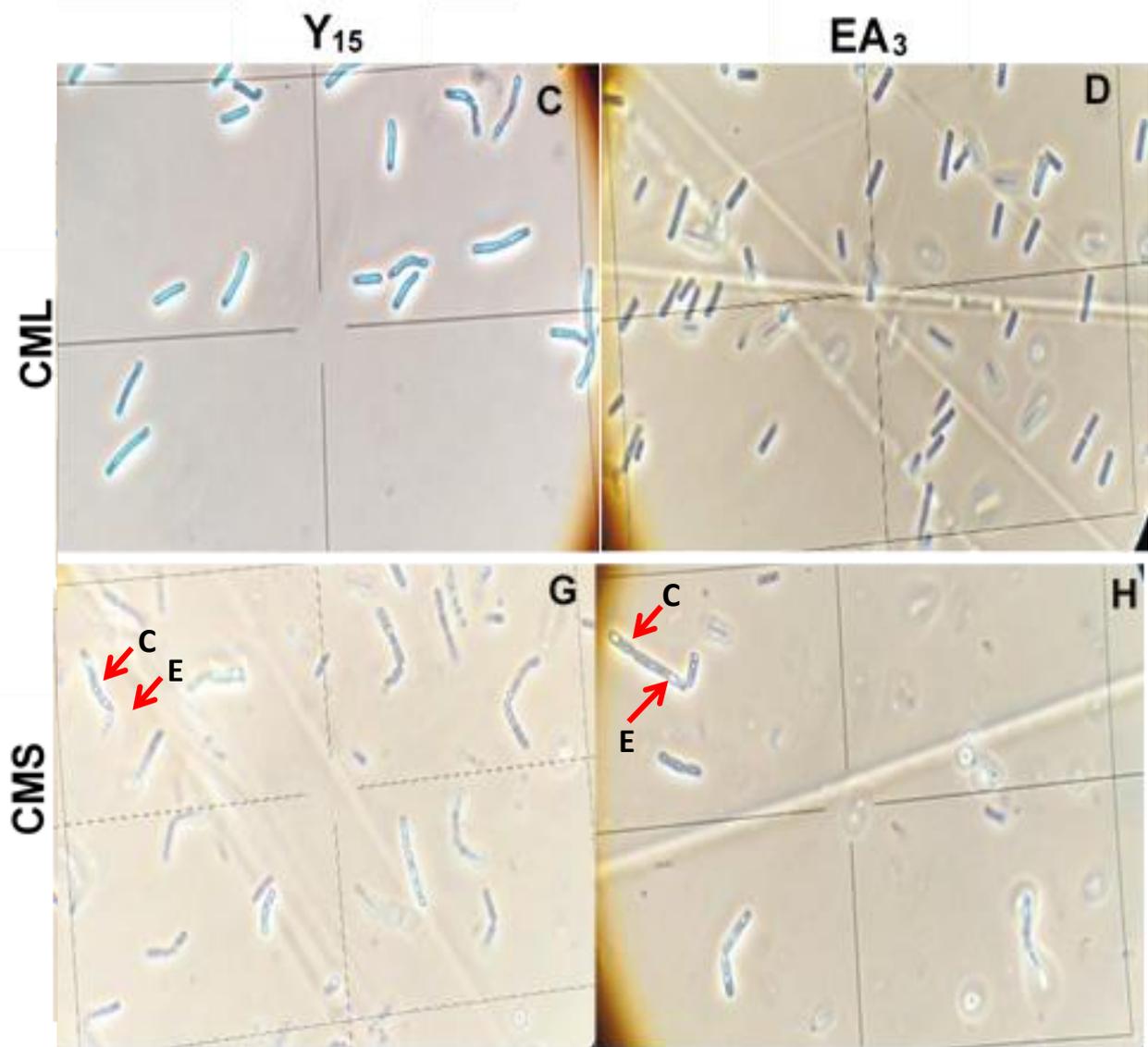


**Figura 7.16.** Perfil proteico de *B. thuringiensis* del lavado de la PUF con solución de NaCl al 0.85%. Flechas rojas indican proteínas Cry.

Al observar las cepas provenientes de cada uno de los cultivos en GYSx4 bajo el microscopio de contraste de fases, se observa un cambio de morfología para todas

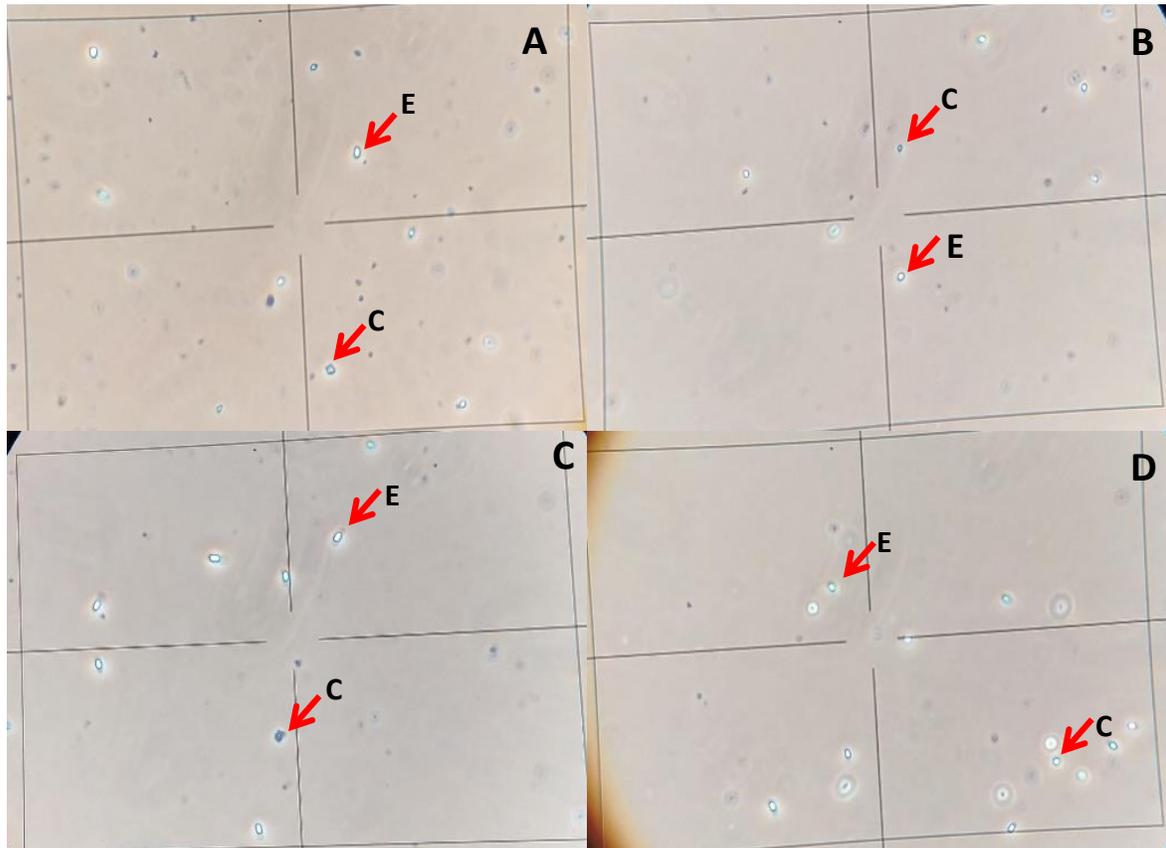
las cepas (Figura 7.17), en comparación a la morfología observada con el crecimiento en medio LB (Figura 7.13). En CML las 4 cepas de *B. thuringiensis* presentan la formación de más de una inclusión con diferente morfología a las observadas en medio LB lo que indicaría la presencia de un metabolito diferente a la proteína Cry en este sistema, y se observa que la formación de esporas es mínima. En el caso de CMS, se observan las mismas inclusiones en todas las cepas (en menor cantidad que en CML), es posible confirmar la presencia de producción de esporas (indicadas con una flecha y la letra E) y en algunos casos se observan estructuras similares a la proteína Cry (indicadas con una flecha y la letra C). A diferencia de las otras cepas, en la cepa HD73 es posible observar esporas y cristales libres a las 48 h de cultivo en medio sólido; esto podría estar relacionado con el hecho de que es posible corroborar la presencia de esta proteína por SDS-PAGE (Figura 7.15) antes de realizar el lavado al soporte sólido.





**Figura 7.17.** Micrografías de contraste de fases de las 4 cepas de *B. thuringiensis* utilizadas en la caracterización de proteína Cry en medio GYSx4. Objetivo a 100X. Las flechas rojas indican las esporas (E) y proteínas Cry (C).

Por otra parte, cuando se examina por microscopia de contraste de fases el material extraído del soporte sólido mediante los lavados con NaCl se observa que los principales productos recuperados son esporas libres (indicadas con una flecha y la letra E) y otras estructuras que corresponden a cristales de proteína Cry (indicadas con una flecha y la letra C) (Figura 7.18). De acuerdo con lo observado, es probable que durante la primera extracción se recuperan las partes superficiales de los cúmulos de *B. thuringiensis* formados en PUF, en su mayoría son células vegetativas con inclusiones varias (Figura 7.17), y el lavado ayuda a recuperar las partes intermedias y las que están cercanas a las paredes de PUF, las cuales son células en su mayoría esporuladas, esporas libres y proteína Cry liberada, la cual es fácilmente detectable en los geles de poliacrilamida (Figura 7.16).

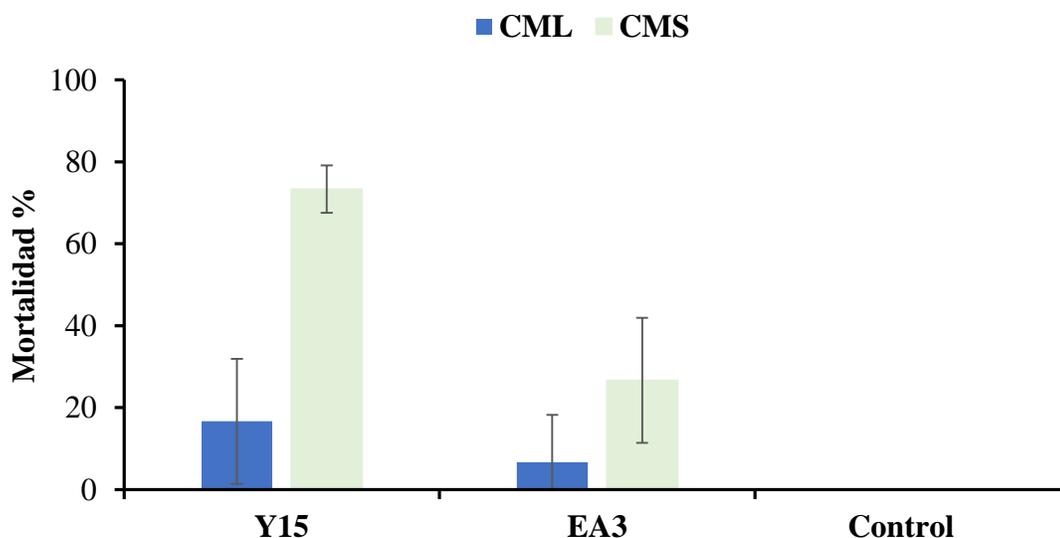


**Figura 7.18.** Micrografías del lavado de la PUF con solución de NaCl al 0.85%: A) *B. thuringiensis* HD1, B) *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub>, C) *B. thuringiensis* EA<sub>3</sub> y D) *B. thuringiensis* HD73 en medio GYSx4. Objetivo a 100X. Las flechas rojas indican las esporas (E) y proteínas Cry (C).

De acuerdo con los resultados, el uso de altas concentraciones de sustrato provoca cambios morfológicos en las cepas de *B. thuringiensis* como la posible producción de polihidroxicanoatos, la baja esporulación de las células y la nula producción de proteína Cry en cultivo en medio líquido. Sin embargo, el uso de cultivo en medio sólido mejora la producción de esporas y posiblemente la producción de proteína Cry respecto a medio LB o GYS ya reportados en el mismo sistema de cultivo (Flores-Tufiño, 2016).

### 7.9 Bioensayo

Además de la producción de esporas y proteína es necesario corroborar que los productos obtenidos son útiles como método de control de plagas, por eso se realizó un bioensayo utilizando *Galleria mellonella* (Lepidóptero) como insecto modelo para evaluar la infectividad de las cepas de *B. thuringiensis* de estudio. En la Figura 7.19 se muestran los porcentajes de sobrevivencia después de 6 días de consumo de una suspensión de  $1 \times 10^8$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  (ver materiales y métodos).



**Figura 7.19.** Porcentaje de sobrevivencia de lavas de *G. mellonella* al consumo de *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub> y EA<sub>3</sub>. CMS (barras verdes), CML y control.

Después de 6 días de proceso de infección las esporas producidas en cultivo en medio sólido de la cepa Y<sub>15</sub> provocan una mortalidad de aproximadamente el 74% de las larvas utilizadas en el bioensayo, 4.3 veces mayor a la mortalidad provocada con las

esporas obtenidas del cultivo en medio líquido (17%). En el caso de la cepa EA<sub>3</sub> a pesar de observarse mayor mortalidad con las esporas producidas en CMS, no existe diferencia significativa entre la mortalidad producida por las esporas de ambos sistemas de cultivo, de hecho, no existe diferencia significativa en la mortalidad de las larvas de *G. mellonella* tratadas con las esporas de *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub> producidas en cultivo en medio líquido, las esporas de *B. thuringiensis* EA<sub>3</sub> producidas en ambos sistemas de cultivo y el uso de Tween 80 como control negativo.

Una alta viabilidad de las esporas puede mejorar la infectividad hacia los insectos, posiblemente por ello la mortalidad observada por la cepa EA<sub>3</sub> utilizando esporas producidas en CMS es baja respecto a las esporas producidas en CMS por la cepa Y<sub>15</sub>, se observa en la Figura 7.10, la viabilidad de las esporas producidas por la cepa EA<sub>3</sub> en CMS es menor en comparación con las esporas producidas por la cepa Y<sub>15</sub> en el mismo sistema de cultivo, y aunque esta viabilidad es mayor que la obtenida por esporas producidas en CML puede ser insuficiente durante el proceso de infección de esta cepa.

Además, el bioensayo fue realizado con las esporas recuperadas durante el primer proceso de extracción, y como se observa en la Figura 7.15 no se recupera una cantidad observable o cuantificable de la proteína Cry producida para ambas cepas, esta proteína se vuelve observable y cuantificable posteriormente al proceso de lavado con NaCl (Figura 7.16), posiblemente la baja cantidad de proteína recuperada en el primer proceso de extracción es insuficiente para completar el proceso de infección en las larvas utilizadas para el bioensayo utilizando la cepa EA<sub>3</sub>, y quizá estamos subestimando también la mortalidad que se obtiene cuando se utiliza la cepa Y<sub>15</sub>.

## 8. DISCUSIÓN

La capacidad insecticida de *B. thuringiensis* lo ha colocado como uno de los más importantes bioinsecticidas en el mercado. Debido a ello se trabaja en mejorar los procesos de producción de esporas y toxina Cry de este microorganismo. Una de las alternativas de producción de *B. thuringiensis* es el cultivo en medio sólido, el cual se ha explorado durante años para la producción de diversos metabolitos tanto de hongos como bacterias. Además, se han buscado nuevas cepas de *B. thuringiensis* y nuevas toxinas con la finalidad de obtener una amplia variedad de cepas que puedan utilizarse en campo, para limitar la aparición de resistencia de plagas por el constante uso de un solo tipo de cepa o toxina Cry (Pardo-López *et al*, 2013) y para ampliar el espectro de insectos que se pueden controlar con este bioinsecticida. En este trabajo se muestran características fisiológicas y morfológicas del crecimiento de dos cepas *B. thuringiensis*, aisladas del estado de Morelos (Alquisira- Ramírez *et al*, 2014), tanto en cultivo en medio líquido como en cultivo en medio sólido utilizando el mismo medio de cultivo en ambos sistemas de cultivo, el cual además tiene altas concentraciones de sustrato.

Con la finalidad de mejorar la producción de *B. thuringiensis* se han desarrollado diversos medios de cultivo, optimizándolos a las condiciones que más favorecen a las cepas que se utilizan, o favoreciendo la producción del producto que más les interese ya sea proteína Cry o de esporas. Además, el uso de CMS como alternativa a la producción de *B. thuringiensis* ha traído la implementación de nuevos medios de cultivo utilizando únicamente residuos agroindustriales o suplementados con medios líquidos ya probados en el laboratorio (Rodríguez *et al*, 2019; Zhuang *et al*, 2011; Capalbo *et al*, 2001; Smitha *et al*, 2013), siempre buscando mejorar la producción de las diversas cepas de *B. thuringiensis* que existen. Sin embargo, la comparación directa para determinar cuál de los dos sistemas de cultivo es más adecuado para incrementar la productividad de *B. thuringiensis* se dificulta debido la diferencia en la propia composición de los soportes sólidos y los medios utilizados; por esta razón, en este trabajo se propuso el uso de la espuma de poliuretano (PUF) como un soporte

inerte que permitirá hacer uso del mismo medio de cultivo tanto en el sistema sólido como en el sistema líquido.

Bajo las condiciones y con las cepas que se utilizaron en este trabajo, el CMS mostró ser una mejor opción para la producción de biomasa de *B. thuringiensis* en comparación del CML (Figuras 7.1 y 7.2), alcanzando una producción desde 30 hasta 50 g L<sup>-1</sup> de biomasa dependiendo de la cepa, notablemente mayor a la biomasa producida en CML (desde 13 hasta 28 g L<sup>-1</sup>). En 2016, Flores-Tufiño utilizó la misma metodología y aunque obtuvo un resultado similar en el sentido de que la mayor producción de biomasa se obtuvo en CMS (12-13 g L<sup>-1</sup>), que, en términos reales, es mucho menor a la alcanzada en este trabajo, utilizando el mismo sistema de cultivo (33 y 51 g L<sup>-1</sup>), y sin considerar la cantidad de biomasa retenida en PUF que fue recuperada mediante los lavados del soporte; las discrepancias entre ambos trabajos pueden ser debido a diversos factores como la calidad del inóculo utilizado, la calidad del soporte (PUF) o hasta las variaciones en los equipos (incubadoras) que se utilizan.

Lima-Pérez y colaboradores (2019) compararon la producción de *B. thuringiensis* HD73 en CMS y CML utilizando una metodología similar a la seguida en este trabajo, utilizando concentraciones máximas glucosa de 50 g L<sup>-1</sup>, bajo estas condiciones la biomasa alcanzó una concentración de 30.7 g L<sup>-1</sup> en cultivo en medio sólido, dos veces más de lo producido en CML. También observaron que el consumo de glucosa al final de la fermentación en CMS era total, mientras en CML hubo ≈10% de glucosa residual. Con estos resultados, los autores consideran que en CMS el destino final del sustrato metabolizado por *B. thuringiensis* es la producción de biomasa, mientras que en CML parte del sustrato metabolizado no se destina a la producción de biomasa, sino a la producción de otros metabolitos no esenciales para el crecimiento de *B. thuringiensis*.

En 2008 Berbert-Molina y colaboradores realizaron un estudio de fisiología de crecimiento de *B. thuringiensis* utilizando diferentes concentraciones de glucosa en medio líquido, incluyendo un ensayo con medio GYS modificado con 124 g de glucosa L<sup>-1</sup>, concentración muy similar a la utilizada en nuestro trabajo; bajo estas condiciones los autores obtuvieron una concentración de biomasa de 15.4 g L<sup>-1</sup>, producción similar a la obtenida en este trabajo con la cepa EA<sub>3</sub> (13.8 ± 1.2 g L<sup>-1</sup>), e inferior a la observada

para la cepa Y<sub>15</sub> ( $28.9 \pm 1.4 \text{ g L}^{-1}$ ) en CML. La mayor producción de biomasa que observamos en la cepa Y<sub>15</sub>, respecto a la reportada, puede ser debido a cambios fenotípicos o genéticos que condicionan la fisiología de crecimiento de la cepa, pero no se puede descartar que en el trabajo de Berbert-Molina únicamente incrementaron la concentración de glucosa, sin alterar la concentración del resto de los componentes del medio GYS, provocando un desbalance en la relación C/N del medio que podría haber afectado la producción de biomasa (Farrera *et al*, 1998).

Además, Berbert-Molina y cols. (2008) también observaron que en medio líquido la tasa específica de crecimiento de *B. thuringiensis* disminuye conforme aumentan la cantidad de sustrato, por lo que la inhibición por sustrato puede estar involucrada en el bajo crecimiento de la bacteria. De acuerdo diversos autores, las concentraciones ideales de glucosa para una máxima producción de biomasa sin presentar inhibición por sustrato van de los  $10 \text{ g L}^{-1}$  a los  $56 \text{ g L}^{-1}$ , dependiendo de la variedad de *B. thuringiensis* utilizada (Anderson y Jayaraman, 2003; Arcas *et al*, 1987; Holmberg *et al*, 1980; Duarte-Neto *et al*, 2020). La inhibición del crecimiento causada por las concentraciones elevadas de sustrato se puede deber a diversas causas, incluyendo la falta de un componente del medio, distinta a la fuente de carbono, que limite el crecimiento de la bacteria; por ejemplo, Khanh y colaboradores (2009) utilizaron 4 compuestos diferentes para el control de pH en medio líquido, observaron que los compuestos que contenían amonio provocaban una disminución en el crecimiento, esporulación y síntesis de toxina Cry. En este caso las condiciones de pH, así como los nutrientes adicionados al medio tuvieron un efecto negativo en el crecimiento de *B. thuringiensis*, lo mismo podría pasar con otros factores como la temperatura de incubación, la concentración de oxígeno disuelta en el medio y la concentración de solutos (Ballardo *et al*, 2017). La adición de medios muy concentrados al soporte del CMS (PUF) suele funcionar como un lote alimentado. El crecimiento de *B. thuringiensis* sobre las trabéculas de PUF, donde el efecto de gradiente de sustrato simula al lote alimentado y evita la inhibición por sustrato que se observa en CML, lo que permite el consumo de la totalidad la glucosa administrada en el medio (Lima-

Pérez *et al*, 2019) y, una mejor oxigenación el CMS, e incrementa la producción de biomasa (Figuras 7.1 y 7.2).

La optimización de medios que aumenten la producción de biomasa no garantiza el aumento de la producción de esporas o toxina Cry, por ello es importante optimizar los medios y sistemas utilizados para el producto de interés. En este trabajo además de la cuantificación de biomasa se determinó la cantidad de esporas, la viabilidad, la cantidad de proteína total y se verificó que hubiera producción de proteína Cry. La búsqueda de estrategias para mejorar los rendimientos de producción de esporas y toxina Cry incluye fermentaciones en estado sólido utilizando diferentes residuos agroindustriales y soportes, con los cuales se obtienen mejores rendimientos de los metabolitos de interés en comparación con los obtenidos en CML pues mientras que en cultivos líquidos probados u optimizados para diferentes cepas de BT se han producido títulos de esporas que van de  $1 \times 10^5$  hasta  $2 \times 10^9$  CFU o esporas  $\text{mL}^{-1}$  (Shojaaddini *et al*, 2010; Liu y Tzeng, 1999; Lima-Pérez *et al*, 2019; Avignone-Rossa *et al*, 1992; Ghribi *et al*, 2007); en cultivo sólido se han alcanzado títulos de entre  $6.28 \times 10^6$  y  $2.23 \times 10^{11}$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  (Zhang *et al*, 2015; Smitha *et al*, 2013). Smitha y colaboradores (2013), por ejemplo, compararon la producción de *B. thuringiensis* en CMS utilizando harina de papa como sustrato y con la producción en CML utilizando medio LB; observaron que en CMS se alcanzaban mejores rendimientos de esporas ( $6.28 \times 10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ) y toxina Cry (6.5 mg de toxina  $\text{mL}^{-1}$ ) en comparación del CML ( $2.12 \times 10^5$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  y 0.38 mg de toxina  $\text{mL}^{-1}$ ). Aunque estos resultados muestran la misma tendencia que lo observado en nuestros sistemas de cultivo (mejores niveles de producción en CMS), las cantidades totales del producto son muy diferentes, pues en nuestro sistema en CMS se llega a obtener hasta 5 órdenes de magnitud más esporas que la reportada por estos autores. Otros autores han obtenido también mejor producción de esporas utilizando CMS con diversos sustratos

En 2015, Zhang y colaboradores utilizaron fermentaciones semisólidas utilizando desperdicios de comida como sustrato para la producción de *B. thuringiensis*, obteniendo alrededor de  $2.23 \times 10^{11}$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  y 862  $\mu\text{g}$  de toxina  $\text{mL}^{-1}$ , comparativamente mayor a lo producido por nuestro sistema de cultivo. Zhang y

colaboradores (2013) obtuvieron alrededor de  $5.01 \times 10^{10}$  UFC  $g^{-1}$  de *B. thuringiensis* utilizando residuos de cocina adicionados con salvado de trigo y elementos traza. Vimala-Devi y colaboradores (2005) también utilizaron salvado de trigo suplementado con minerales, con lo cual obtuvieron  $6.6 \times 10^{10}$  esporas  $g^{-1}$ . El-Bendary y colaboradores (2016) utilizaron diferentes sustratos para la producción de *B. thuringiensis* variedad *israelensis*, con los cuales obtuvieron un rango de esporas de  $2.8 \times 10^9$  hasta  $2.22 \times 10^{10}$  UFC  $g^{-1}$  de sustrato. En un sistema de CMS similar al que utilizamos en este trabajo, Lima-Pérez y colaboradores (2019) obtuvieron alrededor de 1 a  $6 \times 10^9$  esporas  $mL^{-1}$ , dependiendo de la cantidad de sustrato inicial en el medio; aunque a la concentración más alta que probaron ( $50 g L^{-1}$ ) solamente encontraron esporas en CMS; los autores de este último estudio atribuyen este resultado a que la limitación de oxígeno en CML produce una inhibición en el proceso de esporulación.

El aumento en la concentración de sustrato en el medio, la producción de biomasa y diversos metabolitos por *B. thuringiensis* producen una disminución en la cantidad de oxígeno disuelto. En este sentido, Popovič *et al*, (1979) mostraron que la producción de penicilina y otros compuestos por diferentes microorganismos, así como la concentración de los componentes del medio, disminuyen la solubilidad de oxígeno en el medio de cultivo (Papapostolou *et al*, 2019; Meier *et al*, 2016). En medios tan concentrados como el que se usó en este trabajo, la baja disponibilidad de oxígeno disuelto se convierte en un factor limitante para el crecimiento de *B. thuringiensis*, pues la demanda bioquímica de oxígeno aumenta en estos medios concentrados. En diversos estudios se ha mostrado que el uso de altas tasas de aireación en CML pueden mejorar el crecimiento y producción de esporas de *B. thuringiensis*, pero la etapa del crecimiento en la que se aplica tiene diferentes efectos en el crecimiento, esporulación y producción de proteína Cry (Dulmage, 1981; Avignone-Rossa y Mignone, 1995; Morris *et al*, 1996; Flores *et al*, 1997).

Viniegra y colaboradores (2003) reportaron una comparación en cuanto el área específica de un cultivo sólido utilizando como soporte espuma de poliuretano. De acuerdo con estos autores, el CMS tiene un área específica hasta 100 veces mayor, en comparación con el área específica presente en CML y esto se traduce en un

aumento en la difusión de oxígeno que, a su vez incrementa la producción de *B. thuringiensis* sin necesidad de un sistema de aireación externo. El uso de CMS en este trabajo mejoró la producción de *B. thuringiensis* en comparación con el CML, pues el aumento en la difusión de oxígeno en CMS favoreció la metabolización de la glucosa por *B. thuringiensis* aún con la concentración de sustrato utilizada ( $120 \text{ g L}^{-1}$ ), superando el fenómeno de inhibición por sustrato que limita el crecimiento de *B. thuringiensis* en CML (Berbert-Molina *et al.*, 2008). En escalas mayores como la producción industrial, la tecnología de lote alimentado facilita el uso de concentraciones elevadas de sustrato para poder aumentar las concentraciones de producto, sin la generación de metabolitos secundarios no deseados y evitando la limitación de oxígeno en el medio (Chang *et al.*, 2018; Shang *et al.*, 2003); sin embargo, este sistema de cultivo eleva los requerimientos energéticos para el funcionamiento eficiente del sistema.

Aunque la aireación tiene un papel importante en el proceso de esporulación, este factor no siempre tiene efectos benéficos durante la producción de esporas y en la síntesis de toxina Cry. Se ha descrito que altas tasas de aireación o de oxígeno disuelto mejora la producción de esporas, sin embargo, esto dependerá de la subespecie de *B. thuringiensis* y la etapa donde se aplique esta aireación. De acuerdo con Avignone-Rossa y Mignonen (1992) el efecto negativo o positivo de la aplicación de oxígeno en el medio se debe al punto en el cual se agregue esa aireación, siendo mejor suministrar oxígeno durante la fase de crecimiento exponencial, donde existe la mayor tasa de crecimiento y consumo de sustrato. Por ejemplo, Sarrafzadeh y Navarro (2006) mencionan que una saturación de oxígeno durante el periodo de formación de esporas (a las 24 h de cultivo) disminuye en un 48% la esporulación de Bt en comparación con un cultivo en el cual no se agregó o se limitó el oxígeno, aunque, la mayor toxicidad se obtiene en las condiciones con saturación de oxígeno, sugiriendo el uso de dos etapas de cultivo, una etapa inicial con una limitación de oxígeno para aumentar la esporulación seguido de una etapa de aireación para activar la producción de proteína Cry. Efectos similares han sido obtenidos por otros autores, donde el aumento en la oxigenación del medio disminuye la cantidad de esporas producidas,

pero mejoran la producción de toxina o la toxicidad de esta (Boniolo Fabrízio *et al*, 2012; Ghribi *et al*, 2007), sin embargo, existen trabajos que han mostrado efectos contrarios; por ejemplo, da Silva y colaboradores (2011), observaron que bajo condiciones de aireación la esporulación incrementa en 50%, pero la toxicidad obtenida no era la mejor. En nuestro trabajo se mostró que la mejor difusión de oxígeno en CMS mejora la producción de esporas (Figura 7.5 y 7.6), aun sin considerar las esporas retenidas en el soporte, así como la producción de proteína Cry (Figuras 7.15 y 7.16); por lo que se debe considerar que las características de cada una de las cepas que se utilizan tienen diversas reacciones a diferentes estímulos, entre ellos la aireación u oxigenación, por ello cada nueva cepa debe pasar por el proceso de selección, optimización y escalamiento del medio, y las condiciones y sistema de cultivo deben ser enfocados en el principal metabolito de interés o en la mejora de las propiedades de calidad.

Además de la mejor difusión de oxígeno en CMS, también se debe considerar que la forma de crecimiento de *B. thuringiensis* sobre la espuma de poliuretano; la formación de agregados celulares en diferentes zonas de la espuma (Figura 7.9) también puede estar relacionada con la mejor producción de esporas en CMS, ya que no solo presenta ventajas para soportar las altas concentraciones de sustrato, sino también pueden favorecer la activación de procesos modulados por *Quorum sensing* (percepción del quórum), como la formación de biopelículas y la esporulación, al permitirle un incremento local en las moléculas que permiten la percepción del quórum. Esto último podría jugar un papel importante si además consideramos que la formación de biopelícula y esporulación comparten señalizadores en sus rutas de activación (Cairns *et al*, 2014; Dubois *et al*, 2013; Hamon y Lazazzera, 2001; Rocha-Estrada *et al*, 2010; Rocha-Estrada *et al*, 2012).

Aunque nuestros resultados claramente indican que el CMS favorece el crecimiento y esporulación de *B. thuringiensis*, se debe considerar que probablemente se subestima la producción total de biomasa, esporas y proteína Cry (Fig. 7.3,7.4, 7.7, 7.8 y 7.16) debido a la retención de estos en la espuma de poliuretano, ya sea por propias interacciones electrostáticas o por la formación de biopelícula sobre las paredes de

PUF como se observa en la Figura 7.9. La hidrofobicidad es una de las características que presentan las esporas de varias especies de bacterias, entre ellas *B. thuringiensis*. Esta característica les confiere la capacidad de adherencia a diferentes superficies permitiendo a la bacteria la propagación y adaptación en diferentes nichos de crecimiento (Doyle *et al*, 1984). En el sistema de estudio las esporas de *B. thuringiensis* se encuentran en contacto con la superficie de la espuma de poliuretano, la cual es de naturaleza hidrófoba y esto permite una mayor interacción entre las esporas y la superficie; esta interacción hidrofóbica además de la producción de biopelícula, podrían explicar que las esporas quedan retenidas en el soporte. Para la liberación de estas esporas de la espuma de poliuretano se recurrió al uso de precipitación tipo *salting in/salting out* y a la emulsificación con el uso de solución de Cloruro de sodio (NaCl) y Tween 80, respetivamente. En la primera las sales rompen interacciones electrostáticas entre las esporas y la espuma de poliuretano, en este trabajo una solución de NaCl al 0.85% fue suficiente para liberar a las esporas, puesto que las interacciones hidrofóbicas entre la espuma y la espora se rompieron; en el segundo método, las partes hidrofóbicas de las moléculas de Tween 80 interactúan con las partes hidrofóbicas de las esporas, interrumpiendo su interacción con la espuma, formando micelas que liberan a las esporas permitiendo su recuperación. De acuerdo con los resultados obtenidos, el uso de Tween 80 o NaCl no produce diferencias significativas en la recuperación de esporas entre ambas soluciones, posiblemente las características de hidrofobicidad de las esporas de las cepas *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub> y EA<sub>3</sub> no sean muy diferentes, y el mayor factor de retención de estas esporas sea las diferencias en producción de biopelícula como se observa en la Figura 7.9.

La mejora en la producción de esporas y toxina Cry son una parte importante para la implementación en un proceso a escala industrial, no obstante, los productos obtenidos deben tener ciertas características de calidad que le permitan resistir las condiciones ambientales en campo. En este trabajo se probó la calidad de esporas mediante la resistencia a un choque térmico y la capacidad infectiva en bioensayos utilizando insectos de *Galleria mellonella*. De acuerdo con los resultados obtenidos el

uso de CMS mejora la calidad de las esporas sometidas a choque térmico en comparación con el cultivo líquido (Figura 7.10). En varios trabajos se ha descrito que la resistencia de las esporas de *B. thuringiensis* depende de factores como el contenido de agua, la cantidad de minerales presentes en las esporas y el nivel de maduración de estas (Ghosh *et al*, 2011; Bender y Marquis, 1985). Khorramvatan y colaboradores (2014) determinaron la viabilidad de esporas de *B. thuringiensis* al someterlas a radiaciones UV durante 7 días, mostrando que las esporas libres reducen su viabilidad un 60% después de 7 días de exposición; sin embargo, si las esporas eran microencapsuladas en alginato de sodio, la viabilidad final de las esporas solo disminuía un 20% respecto a la viabilidad inicial. Adjallé y colaboradores (2011) obtuvieron porcentajes de viabilidad de esporas mayores al 90% después de un proceso de choque térmico en los dos medios que utilizaron durante su estudio. Estos porcentajes de viabilidad son similares a los obtenidos en este trabajo aun sin tener un medio optimizado para las cepas que se están utilizando, por lo que se infiere que la optimización del medio y realizar formulaciones con estos productos podría aumentar la viabilidad de las esporas de estas cepas. En 2011, Sánchez-Salas y colaboradores mostraron que las esporas que son liberadas de forma temprana (esporas inmaduras) son menos resistentes a choques de temperatura, en comparación con esporas que realizaron todo el proceso de maduración, debido a que las esporas inmaduras presentan deficiencias en la estructura del córtex de la espora. Además de los factores antes mencionados, diversos autores han descrito que la expresión de diferentes proteínas chaperonas y proteínas, denominadas SASP, también cumplen con una función de resistencia a diferentes condiciones adversas entre ellas el cambio a temperaturas (Movehedi y Waites, 2000; Setlow y Setlow, 1994). Como se mostró en la sección de resultados, las esporas producidas en CMS son más resistentes a la aplicación de un choque térmico, aunque se desconoce el motivo por el cual son más resistentes, las posibles razones se mencionaron anteriormente. Para conocer con más detalle las razones de esta ventaja que el CMS brinda a las esporas de *B. thuringiensis*, tendría que hacerse los diferentes estudios para determinar qué factor es el que mejora la resistencia de estas esporas.

La capacidad infectiva del producto obtenido en CMS, de la cepa Y<sub>15</sub>, tiene una mortalidad del 75% aproximadamente, en comparación con la mortalidad obtenida utilizando el producto de CML; en el caso de la cepa EA<sub>3</sub> se observa que no existe diferencia significativa entre la mortalidad alcanzada por el producto del CMS y CML. Las diferencias de mortalidad entre ambas cepas, puede ser atribuida a diferentes factores, por ejemplo, las cepas de *B. thuringiensis* experimentales, Y<sub>15</sub> y EA<sub>3</sub>, no están completamente caracterizadas por lo que se desconoce el tipo de proteína Cry que producen, debido a ello, una posibilidad a la baja mortalidad obtenida por la cepa EA<sub>3</sub> es que la proteína Cry que se está produciendo no sea efectiva contra *Galleria mellonella* (lepidóptero), de hecho, existe la posibilidad de que no tenga actividad insecticida y pueda presentar actividad citotóxica contra células cancerígenas, como ya se ha mostrado en otros estudios (Ohba *et al*, 2009; Melo *et al*, 2016; Mendoza-Almanza *et al*, 2020). Entonces, es necesario determinar el tipo de proteínas Cry que ambas cepas de *B. thuringiensis* producen, y realizar otro bioensayo con insectos blancos más adecuados al tipo de proteína producida.

Otro factor que podría afectar la capacidad insecticida, al menos de *B. thuringiensis* EA<sub>3</sub> y aumentar la infectividad de la cepa Y<sub>15</sub>, es la cantidad de proteína Cry presente en la suspensión de esporas. El bioensayo se realizó utilizando muestras provenientes del primer proceso de extracción, que de acuerdo con la Figura 7.15, no contiene proteína Cry o la contiene en cantidades por debajo del límite de detección de la tinción con azul de Comassie, por lo cual es necesario realizar el bioensayo utilizando lo extraído después del lavado, para que la suspensión de esporas contenga también los cristales de la proteína Cry. En 1987, Li y colaboradores, determinaron que al usar *Galleria mellonella* como insecto modelo, es necesaria la presencia de células vegetativas, esporas y proteína Cry, para tener una virulencia completa contra el insecto. Sin embargo, Buisson y colaboradores (2019) demostraron que el uso de esporas y células vegetativas, sin contener proteína Cry, también tiene capacidad insecticida aunque, en este último trabajo, la forma en la que se llevó a cabo la infección fue por inyección directa al hemocele del insecto; Fedhila y colaboradores (2010) realizaron un experimento similar, pero usando una ingesta oral y otros agentes

patógenos para determinar si *Galleria mellonella* era adecuada como insecto modelo para la infección por dichos microorganismos; ellos observaron que, aunque las esporas y células vegetativas de *B. thuringiensis* producen cierto nivel de mortalidad, la adición de proteína Cry incrementa la mortalidad. En ambos estudios mencionan que la capacidad infectiva de *B. thuringiensis* va más allá de la sola presencia de la proteína Cry, donde factores como el regulador transcripcional PlcR, involucrado en la activación de factores de virulencia, necesarios para obtener una mayor patogenicidad por las bacterias. Aunque se comprobó que en CMS se produce proteína Cry, es necesario considerar las características de crecimiento de *B. thuringiensis* sobre PUF para recuperar tanto esporas como proteína Cry, con esto se podría realizar un bioensayo en mejores condiciones a las que se tuvieron en este trabajo, y obtener una mejor idea de la infectividad de las cepas de Bt EA<sub>3</sub> y Y<sub>15</sub>

Además de corroborar los cambios fisiológicos que sufre *B. thuringiensis* al crecer en medio líquido o sólido, también es importante conocer los cambios morfológicos, además de la formación de biopelícula, que presentan las cepas de *B. thuringiensis* en ambos sistemas de cultivo, esperando que dichos cambios morfológicos tengan también una repercusión en la productividad y en las características de calidad de las esporas y proteínas Cry obtenidas. Para ello fue necesario realizar una comparación con cepas ya caracterizadas, como lo son las cepas HD1 y HD73. Dichas cepas producen al menos una proteína Cry, y de las cuales se conoce la morfología de crecimiento, en medios comerciales como el medio de cultivo LB. Conociendo lo anterior podemos observar, primero, que las cuatro cepas producen al menos una proteína Cry en medio LB, medio óptimo para el crecimiento de *B. thuringiensis* en cultivo líquido sin que existan limitantes de difusión de oxígeno por la cantidad de sustrato inicial. Bajo estas condiciones, las cepas de referencia HD1 y HD73 producen las inclusiones paraesporales junto a la espora, ambas características de *B. thuringiensis* durante la fase de esporulación, lo cual fue corroborado por microscopia de contraste de fases y SDS-PAGE (Fig 7.13 y 7.12 respectivamente).

Diversos autores han utilizado microscopia de contraste de fases para caracterizar la morfología y número de cristales producidos bajo diferentes condiciones, también

como una forma rápida de caracterizar a una cepa de *B. thuringiensis* (Ammouneh et al, 2011; Gebramariam et al, 2021). Aunque es una técnica simple y rápida, muchas veces se completa con la tinción de las muestras con Azul de Commasie para una mejor definición en la forma específica de los cristales formados (Ammons et al, 2002). En general cada cristal formado por las proteínas Cry presentan diferentes formas asociadas, muchas veces al tipo de proteínas Cry ya identificadas, por ello se han descrito cristales de proteína Cry esféricos, bipiramidales, amorfos, cuadrados, rectangulares, etc. Las cepas usadas de referencia en general presentan cristales bpirámidales, amorfos o cuadrados como se pueden observar en la Figura 7.13, mientras que las cepas experimentales presentan formas amorfas o cuadradas (Fig 7.13) bajo las mismas condiciones de cultivo. En contraste al usar un medio con concentraciones elevadas de glucosa observamos cambios morfológicos de *B. thuringiensis* en ambos sistemas de cultivo (Fig 7.17 y 7.18), lo más notable es que en CML no se observa la morfología de crecimiento utilizando medio LB, más bien se observa que las células vegetativas de *B. thuringiensis* producen esporas, y en muchas otras inclusiones irregulares no comparables con las inclusiones producidas por las proteínas Cry, posiblemente el estrés osmótico producido por las cantidades elevadas de sustrato en el medio conducen a *B. thuringiensis* a producir compuestos como los polialcanoatos (PHA), como una medida para almacenamiento de sustrato. Por otro lado, en CMS las características morfológicas de crecimiento tiene un cambio menor, en comparación con la morfología obtenida con el medio comercial. Utilizando altas concentraciones de glucosa se observa la producción evidente de esporas y las inclusiones paraesporales, correspondientes a las proteínas Cry, aunque la forma final del cristal no es tan clara como en el medio comercial. Sin embargo, se corroboró por SDS-PAGE que en cultivo en medio sólido se produce proteína Cry, en contraste con el cultivo en medio líquido (Fig 7.15-16 y 7.14), aunque es importante mencionar que para lograr recuperar los cristales de la proteína es necesario hacer lavados con una solución salina o con un agente tensoactivo para lograr separarlos del soporte sólido.

De acuerdo con los resultados, el uso de CMS para la producción de esporas y Cry de *B. thuringiensis* mejora considerablemente el rendimiento y calidad de estos

productos, en relación con lo que se produce en CML bajo las condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo. Además de las ventajas en cuanto a producción, es necesario realizar un análisis de costo de producción para corroborar hasta qué punto el uso de CMS disminuiría los costos de operación, al no necesitar recursos adicionales como el uso de turbinas para la mezcla y aireación del medio. Se abre así la posibilidad de utilizar residuos agroindustriales, en este caso melazas como fuente de carbono, que aún con las cantidades altas de sustrato no provocarían inhibición en el crecimiento de *B. thuringiensis*. Sin embargo, una desventaja del uso de PUF para la producción de *B. thuringiensis* es la retención de esporas y toxina en el soporte (Figura 7.9), además la producción de biopelícula puede influir en la recuperación de estas esporas antes y después de los lavados, una biopelícula lábilmente formada permitirá una mayor recuperación de producto, como se observó con la cepa *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub> que aparentemente produce menor biopelícula que la cepa *B. thuringiensis* EA<sub>3</sub>. Para esta última cepa, la recuperación de esporas y toxina puede ser más complicada o se requieran más lavados para una recuperación casi total del producto, aunque en este trabajo se demostró que un simple lavado con solución salina permite la recuperación de estos compuestos.

Desde el descubrimiento de *B. thuringiensis* y hasta la fecha, diversos autores se han dedicado al aislamiento de nuevas cepas de *B. thuringiensis* en la búsqueda de nuevas proteínas Cry o nuevas proteínas que presenten actividad insecticida igual o mayor a las proteínas ya reportadas, también se ha optado por la búsqueda de toxinas con diferentes propiedades a las insecticidas, como las parasporinas; esta búsqueda ha sido inicialmente impulsada por el desarrollo de resistencia en insectos plaga por el uso de pocas variedades de proteínas Cry. Bajo esta premisa el trabajo presente ha demostrado que los dos aislados de *B. thuringiensis* tiene la capacidad de producir toxinas Cry con actividad insecticida, candidatas a producirse a escala industrial para su aplicación en campo.

## 9. RESUMEN DE RESULTADOS

Durante la realización de este trabajo se comparó la capacidad del cultivo sólido y el cultivo líquido para la producción de biomasa y esporas de dos cepas de *B. thuringiensis*, las diferencias morfológicas del crecimiento y las características de calidad de los productos obtenidos en los dos sistemas de cultivo. Tanto la producción de biomasa y la producción de esporas de ambas cepas se favoreció en cultivo sólido. En términos de biomasa se tuvo un aumento de hasta 3.7 veces respecto a lo producido en cultivo líquido; respecto a la producción de esporas se obtuvo un aumento de 2 (Cepa1) a 30 (cepa x) veces en CMS dependiendo de la cepa utilizada.

De acuerdo con las micrografías de microscopía electrónica de barrido se observó que dentro de las paredes de la espuma de poliuretano *B. thuringiensis* crecía en forma de agregados celulares facilitando la formación de biopelículas, influyendo en la retención tanto de biomasa como de esporas en el soporte. Al realizar un lavado al soporte se logró recuperar del 3.5 al 35% de esporas respecto a lo recuperado inicialmente, sin embargo, después del lavado las micrografías muestran que aún quedan residuos en las paredes del soporte. Además del aumento de biomasa y esporas en el sistema de cultivo sólido se observó que la cantidad de proteína total también aumenta en este sistema de cultivo, independientemente de la cepa de *B. thuringiensis* que se utilice.

Además de las diferencias en producción, la morfología de las cepas de *B. thuringiensis* cambian dependiendo del sistema de cultivo en el que están creciendo, mientras los bacilos producidos en CMS presentan de forma definida la espora y el cristal, en los bacilos producidos en CML no está bien definida la presencia de la espora y el cristal, pues dentro de las bacterias se formaron varios gránulos posiblemente de polihidroxicanoatos, lo mismo sucede en las dos cepas de estudio de este trabajo y dos cepas de referencia utilizadas. Respecto a la proteína Cry producida por estas cepas, se observó que las cepas de estudio, Y<sub>15</sub> y EA<sub>3</sub>, producen al menos una proteína Cry de aproximadamente 130kDa y 90 kDa, respectivamente, además se observa que, cuando se utiliza un medio de cultivo con alta concentración de sustrato, solo se observa la producción de proteína Cry en CMS, además estas

proteínas quedan retenidas en la espuma de poliuretano, siendo necesario realizar un lavado para recuperarlas.

Por último, las características de calidad que se determinaron en este trabajo fueron la viabilidad de las esporas producidas y la capacidad infectiva de las mismas en larvas de *Galleria mellonella*. La aplicación de un choque de temperatura reduce en un 90% la viabilidad de las esporas producidas por ambas cepas en medio líquido, mientras las esporas producidas por CMS mantienen una viabilidad superior al 60%. La capacidad de infectar a larvas de *G. mellonella* también se favoreció en las esporas producidas por CMS, obteniendo una mortalidad de hasta el 74% después de 6 días de infección, mientras las esporas producidas por CML producen una mortalidad de hasta 17%. Los resultados anteriores habían sido similares en ambas cepas, *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub> y EA<sub>3</sub>, sin embargo, en términos de capacidad infectiva las esporas de la cepa EA<sub>3</sub> producidas en CMS no presentan diferencia significativa con las producidas por CML.

## 10. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo indican que el CMS es la mejor alternativa para la producción de *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub> y EA<sub>3</sub> en medios altamente concentrados, porque en este sistema se mejoró la producción de esporas, su calidad y la producción de toxina Cry. La formación de biopelícula en la PUF podría permitir a las células vegetativas de *B. thuringiensis* adaptarse, crecer y diferenciarse a espora de forma exitosa en medios altamente concentrados, lo que explicaría la mejora en sus rendimientos de productos. Además, el CMS es muy atractivo debido a que los costos de operación pueden ser reducidos porque el sistema sólido no se agita como el CML.

Aunque se conoce el resultado del uso de cultivo sólido para la producción de *B. thuringiensis*, sería importante también considerar los factores metabólicos, así como la expresión de genes que conducen a *B. thuringiensis* aumentar la esporulación y mejorar las condiciones de calidad de estas esporas. El uso de espuma de poliuretano como soporte inerte permite realizar este tipo de análisis, sin interferencia del medio como ocurriría si se utilizan residuos agroindustriales como soporte y sustrato. Es importante recalcar que estos resultados podrían ser semejantes en cualquier cepa de *B. thuringiensis*, haciendo del cultivo sólido un excelente candidato a la aplicación industrial para la obtención de bioinsecticidas a partir de esporas y proteínas Cry de *B. thuringiensis*.

## 11. PERSPECTIVAS

- Identificar el tipo de proteína Cry que producen las cepas de *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub> y EA<sub>3</sub> por secuenciación.
- Analizar de las proteínas producidas por las cepas de *B. thuringiensis* Y<sub>15</sub> y EA<sub>3</sub> en búsqueda de proteínas con actividad insecticida diferentes a las proteínas Cry.
- Comparar la actividad tóxica de las proteínas Cry producidas por las cepas Y<sub>15</sub> y EA<sub>3</sub> con una cepa comercial, además de utilizar un insecto modelo más susceptible a la acción de las proteínas Cry como *Manduca sexta* o algún insecto que sea blanco de acción de la proteína Cry ya identificada.
- Determinar la cantidad de proteína Cry producida en cultivo en medio sólido.
- Realizar un análisis comparativo en la estructura y composición de las esporas producidas en ambos sistemas de cultivo, buscando las diferencias que confieren mayor resistencia al calor a las esporas producidas en CMS.
- Cuantificar la producción de biopelícula en cultivo en medio sólido.
- Realizar un análisis del transcriptoma de *B. thuringiensis* en ambos sistemas de cultivo, antes de comenzar el proceso de esporulación y posiblemente iniciado el proceso de esporulación.
- Analizar la producción de proteínas de *quorum sensing* en ambos sistemas de cultivo.

## 12.REFERENCIAS

1. Aceves-Diez A.E. (2005). Aislamiento de péptidos señal putativos de *Bacillus thuringiensis* y estimulación de la esporulación por los pentapéptidos NprRB y CSF (Tesis de maestría). Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo, A.C. Hermosill, Sonora. Consultada en: <http://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1006/413> el 12 de junio del 2020
2. Adams, T.T.; Eiteman, M.A. y Hanel, B.M. (2002). Solid state fermentation of broiler litter for production of biocontrol agents. *Bioresour Technol*; 82: 33–41. DOI: [10.1016/s0960-8524\(01\)00153-5](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(01)00153-5)
3. Adjalle, K.D., Vu, K.D., Tyagi, R.D., Brar, S.K., Valero, J.R., Surampalli, R.Y., 2011. Optimization of spray drying process for *Bacillus thuringiensis* fermented wastewater and wastewater sludge. *Bioprocess Biosyst. Eng*; 34: 237–246. DOI: [10.1007/s00449-010-0466-y](https://doi.org/10.1007/s00449-010-0466-y)
4. Agaisse H y Lereclus D. (1995). How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal cristal protein?. *J Bacteriol*; 177 (21): 6027-6032
5. Alquisira-Ramírez, E. V.; Paredes- González, J. R.; Hernandez- Velazquez, V. M.; Ramirez- Trujillo, J. A. y Peña- Chora, G. (2014). In vitro susceptibility of *Varroa destructor* y *Apis mellifera* to native strains of *Bacillus thuringiensis*. *Apidologie*; 45:707–718. DOI: [10.1007/s13592-014-0288-z](https://doi.org/10.1007/s13592-014-0288-z)
6. Alves, L.F.A.; Alves, S.B.; Pereira, R.M. y Capalbo D.M.F. (1997). Production of *Bacillus thuringiensis* Berliner var. Kurstaki grown in alternative media. *Biocontrol Sci Techn*; 7: 377-383.
7. Amin, G.; Alotaibi, S.; Youssef, N.A. y Saleh W. D. (2008). Optimization of fermentation process for bioinsecticides production by *Bacillus thuringiensis*. *World J Microbiol Biotechnol*; 24: 2465-2471. DOI: [10.1007/s11274-008-9816-1](https://doi.org/10.1007/s11274-008-9816-1)
8. Ammons, D.; Rampersad, J. y Khan, A. (2002). Usefulness of staining parasporal bodies when screening for *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol.*; 79(3):203-4. DOI: [10.1016/s0022-2011\(02\)00018-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2011(02)00018-6)
9. Ammouneh, H.; Harba, M.; Idris, E. y Makee, H. (2011). Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Syrian soil and testing

- their insecticidal activities against some insect pests. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 35: 421-431. DOI: [10.3906/tar-1007-1117](https://doi.org/10.3906/tar-1007-1117)
10. Anderson, R.K.I. y Jayaraman, K. (2003). Influence of carbon and nitrogen sources on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var. galleriae for biopesticide production. *Chem Biochem Eng Quarterly*; 17(3): 225–231
  11. Arcas, J.; Yantorno, G. y Ertola, R. (1987). Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* cultures. *Biotechnol Lett*; 9 (2):105–110
  12. Aronson, A. (2002). Sporulation and delta-endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cell Mol Life Sci*; 59: 417–425. DOI: [10.1007/s00018-002-8434-6](https://doi.org/10.1007/s00018-002-8434-6)
  13. Arthurs, S. y Dara, S.K. (2019). Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States. *J Invertebr Pathol*; 165: 12-21. DOI: [10.1016/j.jip.2018.01.008](https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.008)
  14. Avignone-Rossa, C. y Mignone, C. (1993).  $\delta$ -endotoxin activity and spore production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol Lett*; 15, 295–300. DOI: [10.1007/BF00128322](https://doi.org/10.1007/BF00128322)
  15. Avignone-Rossa, C. y Mignone, C.F. (1995). *Bacillus thuringiensis* growth and toxicity – basic applied considerations. *Mol Biotechnol*; 4: 55–71. DOI: [10.1007/BF02907471](https://doi.org/10.1007/BF02907471)
  16. Avignone-Rossa, C., Arcas, J. y Mignone, C. (1992). *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and delta-endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. *World J Microb Biot*; 8: 301–304. DOI: [10.1007/BF01201884](https://doi.org/10.1007/BF01201884)
  17. Awasthi, M.K.; Wong, J. W. C.; Kumar, S.; Awasthi, S.K.; Wang, Q.; Wang, M.; Ren, X.; Zhao, J.; Chen, H.; y Zhang, Z. (2018). Biodegradation of food waste using microbial cultures producing thermostable  $\alpha$ -amylase and cellulase under different pH and temperature. *Bioresour Technol*; 248 (B): 160-170. DOI: [10.1016/j.biortech.2017.06.160](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.160)
  18. Azzouz H, Kebaili-Ghribi J, ben Farhat-Touzri D, Daoud F, Fakhfakh I, Tounsi S. y Jaoua S. (2014). Selection and characterization of an HD1-like *Bacillus thuringiensis* isolate with a high insecticidal activity against *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag Sci*; 70: 1192–1201. DOI: [10.1002/ps.3661](https://doi.org/10.1002/ps.3661)

19. Ballardo, C.; Barrena, R.; Artola, A.; y Sánchez, A. (2017). A novel strategy for producing compost with enhanced biopesticide properties through solid-state fermentation of biowaste and inoculation with *Bacillus thuringiensis*. *Waste manag*; 70, 53–58. DOI: [10.1016/j.wasman.2017.09.041](https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.09.041)
20. Baños, J.G.; Tomasini, A.; Szakács, G. y Barrios-González, J. (2009). High lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation on polyurethane foam: An artificial inert support. *J Biosci Bioeng*; 108 (2): 105-110. DOI: [10.1016/j.jbiosc.2009.03.006](https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.03.006).
21. Bechtel D.B. y Bulla L.A. JR. (1976). Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol*; 127 (3): 1472-1481. DOI: [10.1128/jb.127.3.1472-1481.1976](https://doi.org/10.1128/jb.127.3.1472-1481.1976)
22. Behle R., Birthisel T. Chapter 14: Formulation of entomopathogens as bioinsecticides. J.A. Morales-Ramos, M. Guadalupe Rojas, D.L. Shapro-Ilan (Eds.), *Mass Production of Beneficial organisms*, Elsevier, Amsterdam (2014), pp. 483-517
23. Bender GR. y Marquis RE. (1985). Spore heat resistance and specific mineralization. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:1414–1421. DOI: [10.1016/C2011-0-04576-3](https://doi.org/10.1016/C2011-0-04576-3)
24. Berbert-Molina M. A; Prata A. M. R.; Pessanha L.G. y Silveira M.M. (2008) Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis growth on high glucose concentrations. *J Ind Microbiol Biot*; 35: 1397-1404. DOI: [10.1007/s10295-008-0439-1](https://doi.org/10.1007/s10295-008-0439-1)
25. Bing-Lan, L. y Yew-Min, T. (1998). Optimization of growth medium for the production of spores from *Bacillus thuringiensis* using response surface methodology. *Bioprocess Eng*; 16: 413-418.
26. Boniolo Fabrízio, S., Rodrigues Raphael, C., Prata Arnaldo, M.R., López Maria, L., Jacinto, T., da Silveira, M.M. y Berbert-Molina, M.A. (2012). Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentations: bringing new insights on their impact on sporulation and  $\delta$ -endotoxin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol*; 94: 625–636. DOI: [10.1007/s00253-011-3746-9](https://doi.org/10.1007/s00253-011-3746-9)
27. Branda S.S; Chu F.; Kearns D.B; Losick R. y Kolter R. (2006). A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol Microbiol.* 59 (4): 1229-1238. DOI: [10.1111/j.1365-2958.2005.05020.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05020.x)

28. Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L., Kolter, R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol*; 13: 20–26. DOI: [10.1016/j.tim.2004.11.006](https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006)
29. Brar S. K.; Verma M.; Tyagi R.D. y Valéro J.R. (2006). Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochem*; 41: 323-342. DOI: [10.1016/j.procbio.2005.07.015](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.07.015)
30. Brar S.K.; Verman M.; Tyagi R.D.; Surampalli R.Y.; Barnabé S. y Valéro J.R. (2007). *Bacillus thuringiensis* proteases: Production and role in growth, sporulation and synergism. *Process Biochem*; 42: 773-790. DOI: [10.1016/j.procbio.2007.01.015](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.01.015)
31. Bravo A.; Gill SS y Soberón M. (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*; 49(4): 423–435. DOI: [10.1016/j.toxicon.2006.11.022](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022)
32. Buisson, C.; Gohar, M.; Huillet, E.; & Nielsen-LeRoux, C. (2019). *Bacillus thuringiensis* Spores and Vegetative Bacteria: Infection Capacity and Role of the Virulence Regulon PlcR Following Intrahaemocoel Injection of *Galleria mellonella*. *Insects*, 10(5), 129. DOI: [10.3390/insects10050129](https://doi.org/10.3390/insects10050129)
33. Cairns, L.S.; Hogley, L. y Stanley-Wall, N.R. (2014). Biofilms formations by *Bacillus subtilis*: newinsights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Mol Microbiol*; 93 (4): 587-598. DOI: [10.1111/mmi.12697](https://doi.org/10.1111/mmi.12697).
34. Capalbo, D. M. F.; Valicente, F. H.; Oliveira Moraes, I. y Pelizer, L. H. (2001). Solid-state fermentation of *Bacillus thuringiensis* tolworthi to control fall armyworm in maize. *Electron J Biotechnol*; 4(2): 9-10.
35. Chaiharn, M.; Lumyong, S.; Hasan, N. y Plikomol, A. (2012). Solid-state cultivation of *Bacillus thuringiensis* R 176 with shrimp shells and rice straw as a substrate for chitinase production. *Ann Microbiol*; 63: 1-8. DOI: [10.1007/s13213-012-0488-6](https://doi.org/10.1007/s13213-012-0488-6).
36. Chang, Y.H.; Chang, K.S.; Chen, C.Y.; Hsu, C.L.; Chang, T.C. y Jang, H.D. (2018) Enhancement of the Efficiency of Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* via Gradually Batch-Wise and Fed-Batch Increasing the Glucose Concentration. *Fermentation*; 4(2): 45. DOI: [10.3390/fermentation4020045](https://doi.org/10.3390/fermentation4020045)

37. 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. DOI: [10.1146/annurev-food-030713-092332](https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092332)
38. Crickmore, N.; Berry, C.; Paneerselvam, S.; Mishra, R.; Connor, T. R. y Bonning, B. C. (2020). A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. *J. Invertebr. Pathol.* DOI: [10.1016/j.jip.2020.107438](https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107438)
39. da Silva, M., Furigo Jr., A., Furlan, A.S., Souza, O., 2011. Production of bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* var. israelensis in semi continuous processes combined with batch processes for sporulation. *Braz. Arch. Biol. Technol*; 54 (1),45–52. DOI: [10.1590/S1516-89132011000100006](https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000100006)
40. Dang Vu, K.; Tyagi, R.D.; Surampalli, R.Y. y Valéro, J.R. (2012). Mathematical relationships between spore concentrations, delta-endotoxin levels, and entomotoxicity of *Bacillus thuringiensis* preparations produced in different fermentation media. *Bioresour Technol*; 123: 303-311. DOI: [10.1016/j.biortech.2012.07.110](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.110)
41. Deng, C.; Peng, Q.; Song, F. y Lereclus, D. (2014). Regulation of *cry* genes expression in *Bacillus thuringiensis*. *Toxins*; 6: 2194-2209. DOI [10.3390/toxins6072194](https://doi.org/10.3390/toxins6072194).
42. Domínguez-Arrizabalaga, M.; Villanueva, M.; Escriche, B.; Ancín-Azpilicueta, C., y Caballero, P. (2020). Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Proteins against Coleopteran Pests. *Toxins*: 12(7), 430. DOI: [10.3390/toxins12070430](https://doi.org/10.3390/toxins12070430)
43. Donovan, W.P.; Engleman, J.T.; Donovan, J.C.; Baum, J.A.; Bunkers, G.J.; Chi, D.J.; Clinton, W.P.; English, L.; Heck, G.R.; Ilagan, O.M.; Krasomil-Osterfeld C.K.; Pitkin J.W.; Roberts J.K. y Walters M.R. (2006). Discovery and characterization of Sip1A: A novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. *Appl. Microbiol. Biotechnol*; 72: 713–719. DOI: [10.1007/s00253-006-0332-7](https://doi.org/10.1007/s00253-006-0332-7)
44. Doyle, R.J.; Nedjat-Haiem, F. y Singh, J.S. (1984). Hydrophobic characteristics of *Bacillus* spores. *Curr Microbiol*; 10: 329-332.

45. Duarte Neto, J.M.W.; Wanderley, M.C.d.A.; da Silva, T.A.F.; Viana-Marques, D.A.; da Silva, G.R.; Fernandes-Gurdel, J.; Oliviera, J.P. y Porto, A.L.F. (2020). *Bacillus thuringiensis* endotoxin production: a systematic review of the past 10 years. *World J Microbiol Biotechnol*; 36, 128. DOI: [10.1007/s11274-020-02904-4](https://doi.org/10.1007/s11274-020-02904-4)
46. Dubois, T.; Perchat, S.; Verplaetse, E.; Gominet, M.; Lemy, C.; Aumont-Nicaise, M; Grenha, R.; Nessler, S. y Lereclus, D. (2013). Activity of the *Bacillus thuringiensis* NprR–NprX cell–cell communication system is co-ordinated to the physiological stage through a complex transcriptional regulation. *Mol Microbiol*; 88(1): 48-63. DOI: [10.1111/mmi.12168](https://doi.org/10.1111/mmi.12168)
47. Dulmage, H.T. y Aizawa K. (1982). Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. pp. 209- 237. En E. Kurstak (ed.), Microbial and viral pesticides. Marcel Dekker, Inc., New York.
48. Dulmage, H.T. y De Barjac. H. (1973). HD-187, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* that produce high yields of 8-endotoxin. *J Invert Path.* 22:273-277.
49. Dulmage, T. H. (1981). Production of bacteria for biological control of insects, p. 129-139. In Papavizas, G. C. (ed.), Biological control of crop production. Beltsville Symposia in Agricultural Research. Allanheld, Osmun and Co., Totowa, N. J.
50. El-Bendary M.; Moharam M. E.; Mohamed S.S. y Hamed S.S. (2016). Pilot-scale production of mosquitocidal toxins by *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus* under solid-state fermentation. *Biocontrol Sci Techn*; 26: 980-994. DOI: [10.1080/09583157.2016.1177710](https://doi.org/10.1080/09583157.2016.1177710)
51. El-Bendary, M.A. (2006). *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. *J Basic Microbiol*; 46 (2): 158-170. DOI: [10.1002/jobm.200510585](https://doi.org/10.1002/jobm.200510585)
52. El-Gayar, K.; Essa, A. y Abada, E. (2020). Whey Fermentation for protease production using *Bacillus thuringiensis* isolate from Mangrove Rhizosphere soil in Jazan, Saudi Arabia. *Pol J Environ Stud*; 29 (3): 2167-2176. DOI: [10.15244/pjoes/110583](https://doi.org/10.15244/pjoes/110583)
53. El-Khoury, N.; Majed, R.; Perchat ,S.; Kallassy, M.; Lereclus, D. y Gohar, M. (2016) Spatio-Temporal Evolution of Sporulation in *Bacillus thuringiensis* Biofilm. *Front. Microbiol.* 7:1222. DOI: [10.3389/fmicb.2016.01222](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01222)

54. Endo, H.; Tanaka, S.; Imamura, K.; Adegawa, S.; Kikuta, S. y Sato, R. (2017). Cry toxin specificities of insect ABCC transporters closely related to lepidopteran ABCC2 transporters. *Peptides*; 98: 86-92. DOI: [10.1016/j.peptides.2017.04.003](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.04.003)
55. Ernandes, S.; Moraes, I.O. y Del Bianchi, V. (2013) Evaluation of Two Different Culture Media for the Development of Biopesticides Based on *Bacillus thuringiensis* and Their Application in Larvae of *Aedes aegypti*. *Acta Sci Technol*; 35: 11-18. DOI: [10.4025/actascitechnol.v35i1.13831](https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v35i1.13831)
56. Errington J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol*. 1:117-126. DOI: [10.1038/nrmicro750](https://doi.org/10.1038/nrmicro750)
57. Estruch, J.J.; Warren, G.W.; Mullins, M.A.; Nye, G.J.; Craig, J.A. y Koziel, M.G. (1996). Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93, 5389–5394. DOI: [10.1073/pnas.93.11.5389](https://doi.org/10.1073/pnas.93.11.5389)
58. Farrera R. R., Pérez-Guevara F. y de la Torre M. (1998) Carbon:nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. *Appl Microbiol Biotechnol*; 49: 758-765. DOI: [10.1007/s002530051243](https://doi.org/10.1007/s002530051243)
59. Fedhila, S.; Buisson, C.; Dussurget, O.; Serror, P.; Glomski, I.J.; Liehl, P.; Lereclus, D.; y Nielsen-LeRoux, C. (2010). Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol*. 103(1): 24-9. DOI: [10.1016/j.jip.2009.09.005](https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.09.005)
60. Fedhila, S.; Buisson, C.; Dussurget, O.; Serror, P.; Glomski, I. J.; Liehl, P.; Lereclus, D. y Nielsen-LeRoux, C. (2010). Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol*; 103(1): 24–29. DOI: [10.1016/j.jip.2009.09.005](https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.09.005)
61. Feitelson, J. S.; Payne J.; y Kim L. (1992). *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Nat Biotechnol*; 10:271–275. DOI: [10.1038/nbt0392-271](https://doi.org/10.1038/nbt0392-271)
62. Flemming HC y Wingender J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*; 8: 623–633. DOI: [10.1038/nrmicro2415](https://doi.org/10.1038/nrmicro2415)

63. Flores, E.R.; Perez, F. y De la Torre, M. (1997) Scale-up of *Bacillus thuringiensis* fermentation based on oxygen transfer. *J Ferment Bioeng*; 83, 561–564. DOI: [10.1016/S0922-338X\(97\)81137-3](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)81137-3)
64. Flores-Tufiño, B. (2016). Estudio comparativo de cultivo sólido y líquido para la producción de esporas de *Bacillus thuringiensis* Y<sub>15</sub> y EA<sub>3</sub>. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F. Consultada en: <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=17217&docs=UAMI17217.pdf> el 20 de marzo del 2020.
65. Fujita M. y Losick R. (2003). The master regulator for entry into sporulation in *Bacillus subtilis* becomes a cell-specific transcription factor after asymmetric division. *Genes & Dev*, 17: 1166-1174. DOI: [10.1101/gad.1078303](https://doi.org/10.1101/gad.1078303)
66. Ghosh S, Ramirez-Peralta A, Gaidamakova E, Zhang P, Li Y-Q, Daly MJ. y Setlow P. (2011). Effect of Mn levels on resistance of *Bacillus megaterium* spores to heat, radiation and hydrogen peroxide. *J. Appl. Microbiol.* 111:663-670. DOI: [10.1111/j.1365-2672.2011.05095.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05095.x)
67. Ghribi D., Zouari N, Trigui W y Jaoua S. (2007). Use of sea water as salts source in starch- and soya bean-based media, for the production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides. *Process Biochem*; 42: 374-378. DOI: [10.1016/j.procbio.2006.09.006](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.09.006)
68. Gill, S.S.; Cowles, E.A. y Pietrantonio, P.V. (1992). The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu Rev Entomol*; 37; 615-36. DOI: [10.1146/annurev.en.37.010192.003151](https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.003151)
69. Goldberg, I.; Sneh, B.; Battat E. y Klein D. (1980). Optimization of a medium for high yield production of spore-crystal preparation of *B. thuringiensis* effective against the egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* boisd. *Biotechnol Lett*; 2: 419-426. DOI: [10.1007/BF00162348](https://doi.org/10.1007/BF00162348)
70. Gomma, EZ. (2012). Chitinase Production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their Potential in Antifungal Biocontrol, *J Microbiol*; 50(1); 103-111. DOI: [10.1007/s12275-012-1343-y](https://doi.org/10.1007/s12275-012-1343-y)
71. Guerrero-Urrutia, C.; Volke-Sepulveda, T.; Figueroa-Martinez, F. y Favela-Torres, E. (2021). Solid-state fermentation enhances inulinase and invertase production by

- Aspergillus brasiliensis*. *Process Biochem*; 108: 169-175. DOI: [10.1016/j.procbio.2021.06.014](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.06.014)
72. Hamon, M.A. y Lazazzera, B.A. (2001). The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*; 42 (5): 1199-1209. DOI: [10.1046/j.1365-2958.2001.02709.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02709.x)
73. Höfte, H. y Whiteley, H.R. (1989). Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.*; 53: 242–255. DOI: [10.1128/mr.53.2.242-255.1989](https://doi.org/10.1128/mr.53.2.242-255.1989)
74. Holmberg A, Sievanen R; y Carlberg G. (1980). Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for exotoxin production: process analysis study. *Biotechnol Bioeng*; 22: 1707–1724. DOI: [10.1002/bit.260220812](https://doi.org/10.1002/bit.260220812)
75. Hu, T.; Zhou, Y.; Dai, L.; Wang, Y.; Liu, D.; Zhang, J. y Liu, H. (2011). Enhanced cellulase production by solid state fermentation with polyurethane foam as inert supports. *Procedia Eng*; 18: 335-340. DOI: [10.1016/j.proeng.2011.11.053](https://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.11.053).
76. Jallouli, W.; Driss, F.; Fillaudeau, L. y Rouis, S. (2020). Review on biopesticide production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* since 1990: Focus on bioprocess parameters. *Process Biochem*; 98: 224-232. DOI: [10.1016/j.procbio.2020.07.023](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.07.023)
77. Jisha V.N.; Babysarojam S. R.; Priji P.; Sajith S. y Benjamin S. (2015). Biphasic fermentation is an efficient strategy for the overproduction of  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Appl Biochem Biotechnol*; 175(3):1519-1535. DOI: [10.1007/s12010-014-1383-3](https://doi.org/10.1007/s12010-014-1383-3)
78. John, R.P; Nampoothiri, K.M. y Pandey, A. (2007). Polyurethane foam as an inert carrier for the production of L(+)-lactic acid by *Lactobacillus casei* under solid-state fermentation. *Lett Appl Microbiol*; 44(6): 582-587. DOI: [10.1111/j.1472-765X.2007.02137.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02137.x)
79. Jouzani, G.S.; Valijanian, E. y Sharafi, R. (2017). *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Appl Microbiol Biotechnol*; 101, 2691–2711. DOI: [10.1007/s00253-017-8175-y](https://doi.org/10.1007/s00253-017-8175-y)
80. Khanh D. V.; Tyagi R. D.; Valéro J. R y Surampalli R. Y. (2009) Impact of different pH control agents on biopesticidal activity of *Bacillus thuringiensis* during the

- fermentation of starch industry wastewater. *Bioprocess Biosyst Eng*; 32: 511–519. DOI: [10.1007/s00449-008-0271-z](https://doi.org/10.1007/s00449-008-0271-z)
81. Khorramvatan S.; Marzban R; Ardjmand M.; Safekordi A. y Askary H (2014) The effect of polymers on the stability of microencapsulated formulations of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki (Bt-KD2) after exposure to Ultra Violet Radiation. *Biocontrol Sci Techn*; 24 (4): 462-472, DOI: [10.1080/09583157.2013.871503](https://doi.org/10.1080/09583157.2013.871503)
82. King E.; Galán W. L.J; Rodríguez P. C. y Luna-Olvera H. H. (1996). Avances recientes en la biotecnología en *Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Recuperado el 25 de Octubre de 2016 de [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=yvbxR3qgYnQC&oi=fnd&pg=PA139&dq=hongos+entomopatogenos+en+fermentacion+solida+medicion+de+dioxido+de+carbono&ots=1zaqYljpeL&sig=6x8UIIKs\\_TxpbZXRJt4t6mmN1UU#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=yvbxR3qgYnQC&oi=fnd&pg=PA139&dq=hongos+entomopatogenos+en+fermentacion+solida+medicion+de+dioxido+de+carbono&ots=1zaqYljpeL&sig=6x8UIIKs_TxpbZXRJt4t6mmN1UU#v=onepage&q&f=false)
83. Kiran-Kumar, K.; Sridhar, J.; Murali-Baskaran, R.K.; Senthil-Nathan, S.; Kaushal, P.; Dara, S.K. y Arthurs, S. (2019). Microbial biopesticides for insect pest management in India: Current status and future prospects. *J Invertebr Pathol*; 165: 74-81. DOI: [10.1016/j.jip.2018.10.008](https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.10.008)
84. Kumar N.S. y Venkateswerlu G. (1997). Involvement of an endogenous metalloprotease in the activation of protoxin in *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki. *Biochem Mol Biol Intl*; 42: 901–908. DOI: [10.1080/15216549700203341](https://doi.org/10.1080/15216549700203341)
85. Kumar N.S. y Venkateswerlu G. (1998). Intracellular proteases in sporulated *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki and their role in protoxin activation. *FEMS Microbiol Lett*; 166: 377–382. DOI: [10.1111/j.1574-6968.1998.tb13915.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13915.x)
86. Kuppusamy K.; y Balaraman K. (1990). Extra cellular hydrolytic enzyme secretion in *Bacillus thuringiensis* H14 & *B. sphaericus* and their significance in media design, *Indian J Med Res*; 91: 149–150.
87. Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685. DOI: [10.1038/227680a0](https://doi.org/10.1038/227680a0)
88. Lambert, B. y Perferoen M. (1992). Insecticide promise of *Bacillus thuringiensis*. Facts and mysteries about a successful biopesticide. *Bioscience*; 42: 112-122. DOI: [10.2307/1311652](https://doi.org/10.2307/1311652)

89. Lechuga, A.; Lood, C.; Salas, M.; van Noort, V.; Lavigne, R. y Redrejo-Rodríguez, M. (2020). Completed Genomic Sequence of *Bacillus thuringiensis* HER1410 Reveals a Cry-Containing Chromosome, Two Megaplastids, and an Integrative Plasmidial Prophage, *G3 Genes/Genomes/Genetics*; 10 (9): 2927–2939. DOI: [10.1534/g3.120.401361](https://doi.org/10.1534/g3.120.401361)
90. Li, E. y Yousten, A. (1975). Metalloproteases from *Bacillus thuringiensis*, *Appl Microbiol*; 30: 354–361. DOI: [10.1128/am.30.3.354-361.1975](https://doi.org/10.1128/am.30.3.354-361.1975)
91. Li, J.; Carrol J, y Ellar D.J. (1991) Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*; 353: 815–821. DOI: [10.1038/353815a0](https://doi.org/10.1038/353815a0)
92. Li, R.S.; Jarrett, P. y; Burges, H.D. (1987). Importance of spores, crystals, and  $\delta$ -endotoxins in the pathogenicity of different varieties of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae*. *J. Invertebr. Pathol.* 50, 277–284. DOI: [10.1016/0022-2011\(87\)90093-0](https://doi.org/10.1016/0022-2011(87)90093-0)
93. Lima-Pérez J. (2015). Estudio fisiológico de *Pichia pastoris* con diferentes concentraciones de glicerol: cultivo en medio sólido vs cultivo en medio líquido (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F. Consultada en: <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=16876&docs=UAMI16876.pdf> el 24 marzo del 2020
94. Lima-Pérez, J.; López-Pérez, M; Viniegra-González, 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. DOI: [10.1007/s00449-019-02150-5](https://doi.org/10.1007/s00449-019-02150-5)
95. Lima-Pérez, J.; Rodríguez-Gómez, D.; Loera, O.; Viniegra-González, G. y López-Pérez, M. (2018). Differences in growth physiology and aggregation of *Pichia pastoris* cells between solid-state and submerged fermentations under aerobic conditions. *J Chem Technol Biotechnol*; 93(2): 527-532. DOI: [10.1002/jctb.5384](https://doi.org/10.1002/jctb.5384)

96. Liu B.L. y Tzeng Y.W. (1999). Characterization study of the sporulation kinetics of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol Bioeng*; 68: 11-17. DOI: [10.1002/\(sici\)1097-0290\(20000405\)68:1<11::aid-bit2>3.0.co;2-t](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(20000405)68:1<11::aid-bit2>3.0.co;2-t)
97. Liu G, Song L, Shu C, Wang P, Deng C, Peng Q, Lereclus D, Wang X, Huang D, Zhang J. y Song F. (2013). Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD73. *Genome Announc*. 1(2): e00080-13. doi: [10.1128/genomeA.00080-13](https://doi.org/10.1128/genomeA.00080-13).
98. López-Pérez M.; Loera O.; Guerrero-Olazarán M.; Viader-Salvadó J. M.; Gallegos-López J. A.; J. Fernández F.; Favela-Torres E. y Viniestra-González G. (2010). Cell growth and *Trametes versicolor* laccase production in transformed *Pichia pastoris* cultured by solid-state or submerged fermentations. *J Chem Technol Biot*; 85: 435–440. DOI: [10.1002/jctb.2306](https://doi.org/10.1002/jctb.2306)
99. Madigan M. T.; Martinko J. M.; y Parker J. Brock Biología de los Microorganismos. 10ª edición. Prentice-Hall. Madrid, 2009.
100. Martínez-Solís, M.; Pinos, D.; Endo, H.; Portugal, L.; Sato, R.; Ferré, J.; Herrero, S. y Hernández-Martínez, P. (2018). Role of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins domains in the binding to the ABCC2 receptor from *Spodoptera exigua*. *Insect Biochem Mol Biol*; 101: 47-56. DOI: [10.1016/j.ibmb.2018.07.006](https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.07.006)
101. McKenney P.T.; Driks A. y Eichenberg P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat Rev Microbiol*; 11: 33-44. DOI: [10.1038/nrmicro2921](https://doi.org/10.1038/nrmicro2921)
102. Meier, K.; Klöckner, W.; Bonhage, B.; Antonov, E.; Regestein, L. y Büchs, J. (2016). Correlation for the maximum oxygen transfer capacity in shake flasks for a wide range of operating conditions and for different culture media. *Biochem Eng J*;109: 228-235. DOI: [10.1016/j.bej.2016.01.014](https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.014)
103. Melo, A. L.; Soccol, V. T.; y Soccol, C. R. (2016). *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2), 317–326. DOI: [10.3109/07388551.2014.960793](https://doi.org/10.3109/07388551.2014.960793)
104. Mendoza-Almanza, G.; Esparza-Ibarra, E. L.; Ayala-Luján, J. L.; Mercado-Reyes, M.; Godina-González, S.; Hernández-Barrales, M., y Olmos-Soto, J. (2020). The

- Cytocidal Spectrum of *Bacillus thuringiensis* Toxins: From Insects to Human Cancer Cells. *Toxins*, 12(5), 301. DOI: [10.3390/toxins12050301](https://doi.org/10.3390/toxins12050301)
- 105.** Mitchell, D.A.; Berovic, M. y Krieger, N. (2000). Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. *Adv Biocheml Eng Biot* (68): 65-135. DOI: [10.1007/3-540-45564-7\\_3](https://doi.org/10.1007/3-540-45564-7_3)
- 106.** Morris O. N, Converse V., Kanagaratnam P. y Davies J. S. (1996) Effect of Cultural Conditions on Spore–Crystal Yield and Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. aizawai (HD133). *J Invertebr Pathol*; 67: 129–136. DOI: [10.1006/JIPA.1996.0020](https://doi.org/10.1006/JIPA.1996.0020)
- 107.** Morse, R.J.; Yamamoto, T. y Stroud, R.M. (2001) Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure*; 9: 409–417. DOI: [10.1016/s0969-2126\(01\)00601-3](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(01)00601-3)
- 108.** Movahedi S. y Waites W. (2000). A two-dimensional protein gel electrophoresis study of the heat stress response of *Bacillus subtilis* cells during sporulation. *J. Bacteriol*; 182: 4758–4763. DOI: [10.1128/JB.182.17.4758-4763.2000](https://doi.org/10.1128/JB.182.17.4758-4763.2000)
- 109.** Mummigatti S.G. y Raghunathan, A.N. (1990) Influence of media composition on the production of  $\delta$ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *J Invertebr Pathol*; 55 (2): 147-151, DOI: [10.1016/0022-2011\(90\)90049-C](https://doi.org/10.1016/0022-2011(90)90049-C).
- 110.** Muniz-Paredes, F.; Miranda-Hernández, F. y Loera, O. (2017). Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. *World J Microbiol Biotechnol*. 33:57. DOI: [10.1007/s11274-017-2229-2](https://doi.org/10.1007/s11274-017-2229-2)
- 111.** Muñoz-Paredes, F.; Garza-López, P.M.; Viniegra-González, G. y Loera, O. (2016). Comparison between superficial and solid-state cultures of *Isaria fumosorosea*: conidial yields, quality and sensitivity to oxidant conditions. *World J Microbiol Biotechnol*; 32: 111. DOI: [10.1007/s11274-016-2072-x](https://doi.org/10.1007/s11274-016-2072-x)
- 112.** Ohba, M.; Mizuki, E. y Uemori, A. (2009). Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Res*; 29: 427–433.
- 113.** Okumura, S., Ohba, M., Mizuki, E., Crickmore, N., Côté, J.-C., Nagamatsu, Y., Kitada, S., Sakai, H., Harata, K. y Shin, T. (2010). "Parasporin nomenclature". Consultado en: <http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/> el 13 de junio del 2020.

114. Olson S. (2015). An analysis of the biopesticide market now and where it is going. *Outlooks on Pest Management*. 26:203-206. DOI: [10.1564/v26\\_oct\\_04](https://doi.org/10.1564/v26_oct_04)
115. Palma L.; Muñoz D.; Berry C.; Murillo J. y Caballero P. (2014) *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*; 6: 3296-3325. DOI: [10.3390/toxins6123296](https://doi.org/10.3390/toxins6123296)
116. Pandey, A.; Soccol, C.R. and Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem.* (35): 1153–1169. DOI: [10.1016/S0032-9592\(00\)00152-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00152-7)
117. Papapostolou,A.; Karasavvas, E. y Chatzidoukas, C. (2019). Oxygen mass transfer limitations set the performance boundaries of microbial PHA production processes – A model-based problem investigation supporting scale-up studies. *Biochem Eng J*; 148: 224-238. DOI: [10.1016/j.bej.2019.04.024](https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.04.024)
118. Pardo-López L.; Soberón M y Bravo A. (2013). *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol Rev*; 37: 3-22. DOI: [10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x)
119. Patil C.D.; Borase H.P. y Patil S.V. (2014) Evaluation of Different Culture Media for Improvement in Bioinsecticides Production by Indigenous *Bacillus thuringiensis* and Their Application against Larvae of *Aedes aegypti*. *Hindawi Publishing Corporation Scientific World Journal*; Article ID 273030. DOI: [10.1155/2014/273030](https://doi.org/10.1155/2014/273030)
120. Patil, S.; Amena, S.; Vikas, A.; Rahul, P.; Jagadeesh, K. y Praveen, K. (2013). Utilization of silkworm litter and pupal waste-an eco-friendly approach for mass production of *Bacillus thuringiensis*. *Bioresource technology*; 131: 545-7. DOI: [10.1016/j.biortech.2012.12.153](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.153)
121. Pedrido, M.E.; de Oña, P.; Ramirez, W.; Leñini, C.; Goñi, A. y Grau, R. (2013). Spo0A links *de novo* fatty acids synthesis to sporulation and biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*; 87 (2): 348-367. DOI: [10.1111/mmi.12102](https://doi.org/10.1111/mmi.12102)
122. Pinos, D.; Martínez-Solís, M.; Herrero, S.; Ferré, J. y Hernández-Martínez, P. (2019). The *Spodoptera exigua* ABCC2 Acts as a Cry1A Receptor Independently of its Nucleotide Binding Domain II. *Toxins*, 11(3), 172. DOI: [10.3390/toxins11030172](https://doi.org/10.3390/toxins11030172)

123. Poopathi, S. y Archana, B. (2012). Optimization of medium composition for the production of mosquitocidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, *Indian J Exp Biol*; 50: 65–71.
124. Popović, M.; Niebelschütz, H. y Reuß, M. (1979). Oxygen solubilities in fermentation fluids. *European J Appl Microbiol Biotechnol*; 8: 1-15. DOI: [10.1007/BF00510261](https://doi.org/10.1007/BF00510261)
125. Posada-Uribe, L.F.; Romero-Tabarez, M. y Villegas-Escobar, V. (2015). Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. *Bioprocess Biosyst Eng*; 38: 1879–1888. DOI: [10.1007/s00449-015-1428-1](https://doi.org/10.1007/s00449-015-1428-1)
126. Ramadas, N.V.; Sindhu, R.; Binod, P. y Pandey, A. (2013). Development of a novel solid-state fermentation strategy for the production of poly-3-hydroxybutyrate using polyurethane foams by *Bacillus sphaericus* NII 0838. *Ann Microbiol*; 63: 1265-1274: DOI: [10.1007/s13213-012-0584-7](https://doi.org/10.1007/s13213-012-0584-7)
127. Rocha-Estrada, J.; Aceves-Diez, A.E.; Guarneros, G. and De la Torre, M. (2010). The RNPP family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*; 87: 913–923. DOI: [10.1007/s00253-010-2651-y](https://doi.org/10.1007/s00253-010-2651-y)
128. Rocha-Estrada, J.; Flores, V.; Cabrera, R.; Soto-Guzmán, A.; Granados, G.; Jiaristi, E; Guarneros, G. 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: 1060-1078. DOI: [10.1007/s00253-011-3775-4](https://doi.org/10.1007/s00253-011-3775-4)
129. Rodríguez, P.; Cerda, A.; Font, X.; Sánchez, A. y Artola, A. (2019). Valorisation of biowaste digestate through solid state fermentation to produce biopesticides from *Bacillus thuringiensis*. *Waste Manag*; 93: 63-71. DOI: [10.1016/j.wasman.2019.05.026](https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.05.026).
130. Romeis, J.; Naranjo, S.E.; Meissle, M. y Shelton, A. M. (2019). Genetically engineered crops help support conservation biological control. *Biol Control*; 130: 136-154. DOI: [10.1016/j.biocontrol.2018.10.001](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.10.001)
131. Romero-Gómez, S.; Augur, C. y Viniegra-González, G. (2000). Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnol Lett*; 22, 1255–1258. DOI: [10.1023/A:1005659217932](https://doi.org/10.1023/A:1005659217932)

132. Sanchez-Salas J.L., Setlow B., Zhang P., Li Y.Q. y Setlow P. (2011). Maturation of released spores is necessary for acquisition of full spore heat resistance during *Bacillus subtilis* sporulation. *Appl. Environ. Microbiol*; 77: 6746–6754. DOI: [10.1128/AEM.05031-11](https://doi.org/10.1128/AEM.05031-11)
133. Sarrafzadeh, M.H. y Navarro J. M. (2006). The effect of oxygen on the sporulation,  $\delta$ -endotoxin synthesis and toxicity of *Bacillus thuringiensis* H14. *World J Microb Biot*; 22: 305–310. DOI: [10.1007/s11274-005-9037-9](https://doi.org/10.1007/s11274-005-9037-9)
134. Sarrafzadeh, M.H.; Guiraud, J.P.; Lagneau, C.; Gaven, B.; Carron, A. y Navarro, J.M. (2005). Growth, Sporulation,  $\delta$ -Endotoxins Synthesis, and Toxicity During Culture of *Bacillus thuringiensis* H14. *Curr Microbiol*; 51, 75–81. DOI: [10.1007/s00284-005-4463-3](https://doi.org/10.1007/s00284-005-4463-3).
135. Sato, R.; Adegawa, S.; Li, X.; Tanaka, S. y Endo, H. (2019). Function and Role of ATP-Binding Cassette Transporters as Receptors for 3D-Cry Toxins. *Toxins*, 11(2), 124. DOI: [10.3390/toxins11020124](https://doi.org/10.3390/toxins11020124)
136. Sattar, S. y Maiti, M.K. (2011). Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* effective against sap-sucking insect pest. *J Microbiol Biotechnol*; 21, 937–946. DOI: [10.4014/jmb.1105.05030](https://doi.org/10.4014/jmb.1105.05030)
137. Sauka, D. H y Benintende G. B. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el control de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Rev Arg de Microbiol*: 40: 124-140.
138. Schnepf, E.; Crickmore, N.; van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D.R. y Dean, D.H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*; 62: 775–806.
139. Setlow B. y Setlow P. (1994). Heat inactivation of *Bacillus subtilis* spores lacking small, acid-soluble proteins is accompanied by generation of abasic sites in spore DNA. *J. Bacteriol*; 176: 2111–2113. DOI: [10.1128/jb.176.7.2111-2113.1994](https://doi.org/10.1128/jb.176.7.2111-2113.1994)
140. Sezonov G., Joseleau-Petit D. y D'Ari R. (2007). *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol*; 189 (23): 8746-8749. DOI: [10.1128/JB.01368-07](https://doi.org/10.1128/JB.01368-07)
141. Shang, L., Jiang, M. y Chang, H.N. (2003). Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* with phosphate limitation under different

- glucose concentrations. *Biotechnol Lett*, 25: 1415–1419. DOI: [10.1023/A:1025047410699](https://doi.org/10.1023/A:1025047410699)
142. Shojaaddini M.; Moharrampour S.; Khodabandeh M. y Talebi AA. (2010). Development Of A Cost Effective Medium For Production Of *Bacillus thuringiensis* Bioinsecticide Using Food Barley. *J Plant Protect Res*; 50: 9-14
143. Smitha R.B.; Jisha V.N.; Sajith S. y Benjamin S. (2013). Dual production of amylase and  $\delta$ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* during biphasic fermentation. *Microbiology*, 82: 794-800. DOI: [10.1134/S0026261714010147](https://doi.org/10.1134/S0026261714010147)
144. Smitha, R.; Sailas, B. y Prakashkumar, R. (2018). Fermentation Strategies for the Production of  $\alpha$  - Amylase and  $\delta$  - endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* Obtenido de: [10.29290/FSPAEBTK.1.1.2018.2-195](https://doi.org/10.29290/FSPAEBTK.1.1.2018.2-195).
145. Soberon, M.; Lopez-Diaz, J.A.; Bravo, A. (2013) Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. *Peptides*; 41: 87–93. DOI: [10.1016/j.peptides.2012.05.023](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.05.023)
146. Sosa-López, A. I; Álvarez-Rivera, V. Pazos; Borges, M. G.; González, Garcia M. y Ponce, G. E. (2011). Evaluación Del Método De Conservación En Papel De Filtro En Dos Cepas De *Bacillus subtilis* Cohn, Mediante La Actividad Antagónica Frente A *Rhizoctonia solani* Kühn. *Fitosanidad*, 15: 45-49.
147. Ugur A.; Semih Y., Abdurrahman A. y Salih K. (2015). Effects of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 spore-crystal mixture on the adults of egg parasitoid *Trichogramma evanescens* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), *Biotechnol Equip*; 29(4): 653-658. DOI: [10.1080/13102818.2015.1038303](https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1038303)
148. Vaeck M.; Reynaerts A.; Höfte H.; Jansens S.; De Beuckeleer M.; Dean C.; Zabeau M.; Van Montagu M. y Leemans J. (1987). Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*; 328: 33-37. DOI: [10.1038/328033a0](https://doi.org/10.1038/328033a0)
149. Van Frankenhuyzen, K. (2009). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J. Invertebr. Pathol.*; 101: 1–16. DOI: [10.1016/j.jip.2009.02.009](https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.02.009)
150. Vimala-Devi, P. S., Ravinder T., y Jaidev C. (2005). Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* by solid-state fermentation. *J. Invertebr. Pathol*; 88: 163-168. DOI: [10.1016/j.jip.2005.01.013](https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.01.013)

151. Viniegra-González G.; Favela-Torres E.; Aguilar C.N.; Romero-Gómez S.J.; Díaz-Godínez G. y Augur C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem Eng J*; 13:157–167. DOI: [10.1016/S1369-703X\(02\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00128-6)
152. Wang, Z.; Wang, K.; Bravo, A.; Soberón, M.; Cai, J.; Shu, C. y Zhang, J. (2020). Coexistence of *cry9* with the *vip3A* gene in an identical plasmid of *Bacillus thuringiensis* indicates their synergistic insecticidal toxicity. *J Agric Food Chem*; 68 (47): 14081-14090. DOI: [10.1021/acs.jafc.0c05304](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05304)
153. Warren, G.W.; Koziel, M.G.; Mullins, M.A.; Nye, G.J.; Carr, B.; Desai, N.M.; Kostichka, K.; Duck, N.B. y Estruch, J.J. Auxiliary Proteins for enhancing the insecticidal activity of pesticidal proteins. U.S. Patent 5,770,696, 23 June 1998.
154. Wu S.; Lan Y.; Huang D.; Peng Y.; Huang Z.; Xu L.; Gelbič; Carballar-Lejarazu R.; Guan X.; Zhafig L. y Zou S. (2014). Use of spent mushroom for production of *Bacillus thuringiensis* by solid-state fermentation. *J Econ Entomol*; 107: 137-143. DOI: [10.1603/ec13276](https://doi.org/10.1603/ec13276)
155. Yu, X.; Liu, T.; Sun, Z.; Guan, P.; Zhu, J.; Wang, S.; Li, S.; Deng, Q.; Wang, L.; Zheng, A. y Li P. (2012). Co-expression and synergism analysis of Vip3Aa29 and Cyt2Aa3 insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Curr. Microbiol.*; 64, 326–331. DOI: [10.1007/s00284-011-0070-7](https://doi.org/10.1007/s00284-011-0070-7)
156. Zhang W., Zou H., Jiang L., Yao J., Liang J. y Wang Q. (2015). Semi-Solid State fermentation of food waste for production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide. *Biotechnol Bioproc Eng*; 20: 1123-1132. DOI: [10.1007/s12257-015-0347-y](https://doi.org/10.1007/s12257-015-0347-y)
157. Zhang, W. W., Qiu L. N., Gong A. J., Cao Y. Q., y Wang B. (2013). Solid-state fermentation of food waste for production of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticide. *Bioresour*; 8: 1124- 1135.
158. Zhou ZS.; Yang S-J.; Shu CL.; Song FP.; Zhou XP. y Zhang J. (2015). Comparison and optimization of the method for Cry1Ac protoxin preparation in HD73 strain. *J Integr Agric*; 14(8): 1598–1603. DOI: [10.1016/S2095-3119\(14\)60950-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60950-3)

159. Zhu, Y.; Smits, J.P.; Knol, W. y Bol, J. (1994). A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert Carrier. *Biotechnol lett*; 16(6): 643-648. DOI: [10.1007/BF00128615](https://doi.org/10.1007/BF00128615)
160. Zhuang, L.; Zhou, S.; Wang, Y.; Liu, Z. y Xu, R. (2011). Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides by solid state fermentation using wastewater sludge: Effects of heavy metals. *Bioresour Technol*; 102: 4820–4826. DOI: [10.1016/j.biortech.2010.12.098](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.098)
161. Zouari, N.; Ben Sik Ali, S. y Jaoua, S. (2002). Production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* strains exhibiting various insecticidal activities towards Lepidoptera and Diptera in gruel and fish meal media. *Enzyme Microb Tech*; 31: 411-418. DOI: [10.1016/S0141-0229\(02\)00096-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00096-0)
162. Zouari, N.; Dhouib, A.; Ellouz, R. y Jaoua, S. (1998). Nutritional Requirements of a Strain of *Bacillus thuringiensis* subsp, *kurstaki* and Use of Gruel Hydrolysate for the Formulation of a New Medium for  $\delta$ -Endotoxin Production. *Appl Biochem Biotechnol*; 69: 41-52. DOI: 10.1007/BF02786020

# ANEXO: Listado de productos

- Artículo:

Flores-Tufiño, B., Figueroa-Martínez, F., Viniegra-González, G., y Loera, O. (2021). Polyurethane foam as an inert support using concentrated media improves quality and spore production from *Bacillus thuringiensis*. *World J Microbiol Biotechnol*; 37(9): 154. DOI: [10.1007/s11274-021-03122-2](https://doi.org/10.1007/s11274-021-03122-2)

- Congresos:

**2017- XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería**

Póster: Estudio comparativo de cultivo sólido y líquido para la producción de esporas de *Bacillus thuringiensis* Y15 y EA3

**2017- XL Congreso Nacional de Control Biológico**

Póster: Ventaja de la producción de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD73 (Bacillales: Bacillaceae) en cultivo en medio sólido

**2017- IV Encuentro Internacional sobre Biotecnología en la UATx**

Póster: Producción y recuperación de esporas de *Bacillus thuringiensis* en cultivo en medio sólido

**2018- XLI Congreso Nacional de Control Biológico**

Póster: El cultivo en medio sólido favorece la producción de proteína Cry de *Bacillus thuringiensis*

**2019- XLII Congreso Nacional de Control Biológico**

Póster: Mejora de parámetros de calidad de esporas de *Bacillus thuringiensis* producidas en cultivo sólido

**2021- IX Simposio de Perspectivas sobre Biotecnología 2021**

Video (modalidad virtual): Morfología de *Bacillus thuringiensis* en cultivo sólido y líquido usando altas concentraciones de glucosa.

- Divulgación:

**2019.** Plática “*No se ve, pero algo está cambiando: fisiología y bioquímica de Bacillus thuringiensis*” dentro del curso Rutas Metabólicas a alumnos de licenciatura de Ciencias biológicas y de la Salud de UAM.



Casa abierta al tiempo  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00255  
Matrícula: 2163807807

Morfología y fisiología de *Bacillus thuringiensis* Y<sub>15</sub> y EA<sub>3</sub> cultivados en concentraciones elevadas de glucosa: Cultivo líquido vs cultivo sólido.

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 10:00 horas del día 10 del mes de diciembre del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

- DR. MARCOS LOPEZ PEREZ
- DR. JORGE EUGENIO IBARRA RENDON
- DR. JORGE LIMA PEREZ
- DR. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA MARTINEZ



BRISEIDA FLORES TUFIÑO  
ALUMNA

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

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA  
DE: BRISEIDA FLORES TUFIÑO

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

APROBAR

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

REVISÓ

MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. MARCOS LOPEZ PEREZ

VOCAL

DR. JORGE EUGENIO IBARRA RENDON

VOCAL

DR. JORGE LIMA PEREZ

SECRETARIO

DR. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA MARTINEZ