

Tesis defendida por
Christian Hernández Guzmán
y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Jorge Olmos Soto
Director del Comité

Dr. José de Jesús Paniagua Michel
Miembro del Comité

Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez
Miembro del Comité

Dr. Fernando Díaz Herrera
Coordinador
Programa de Posgrado en Ciencias
de la Vida

Dr. Jesús Favela Vara
Director
Dirección de Estudios de Posgrado

Febrero del 2014

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA



Programa de Posgrado en Ciencias
Ciencias de la Vida

Optimización de las condiciones de cultivo para mejorar el rendimiento de producción y
purificación de las proteínas Cry en *Bacillus thuringiensis*.

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Christian Hernández Guzmán

Ensenada, Baja California, México
2014

Resumen de la tesis de Christian Hernández Guzmán, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Optimización de las condiciones de cultivo para mejorar el rendimiento de producción y purificación de las proteínas Cry en *Bacillus thuringiensis*.

Resumen aprobado por:

Dr. Jorge Olmos Soto

Bacillus thuringiensis es un bacilo gram positivo que se caracteriza por la producción de un cristal proteico durante su fase de esporulación, estos cristales están compuestos por una o varias proteínas conocidas como delta endotoxinas, o proteínas Cry, que son ampliamente utilizadas en la agricultura contra diversas plagas de insectos. En años recientes se ha descubierto que algunas de estas proteínas son potencialmente utilizables en la industria farmacéutica debido a que presentan toxicidad contra ciertos tipos de líneas celulares de cáncer, sin causar daño a células normales. Lo que ha despertado el interés en su producción y purificación.

Un factor clave para la producción de proteínas Cry es la composición del medio de cultivo, sin embargo, otros factores como la oxigenación, el pH y la acción de proteasas producidas por la propia bacteria, también juegan un papel importante para mejorar el rendimiento de producción de las delta endotoxinas.

En este proyecto se buscaron las condiciones de cultivo óptimas asociadas a estos factores, con la finalidad de aumentar la producción de la proteína Cry1A que presenta tanto efectos insecticidas como anticancerígenos. Se encontró que la producción de esta proteína aumentó reduciendo la oxigenación, con un pH cercano a 7, a una concentración de NaCl de 5 g/L y con la adición de una fuente de almidón, que beneficia su constitución.

Adicionalmente, se empleó un sistema de purificación basado en la diferencia de tamaño de los cristales producidos, con respecto al tamaño de las esporas, permitiendo realizar filtrados que discriminan esporas y células vegetativas. Obteniéndose la proteína de manera sencilla y con las condiciones adecuadas para realizar ensayos de cultivo celular.

Palabras clave: **delta endotoxinas, *Bacillus thuringiensis*, proteínas anticancerígenas.**

Abstract of the thesis presented by Christian Hernández Guzmán as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Life Science with orientation in Marine Biotechnology.

Optimization of culture conditions for improve production and purification for Cry proteins in *Bacillus thuringiensis*.

Abstract approved by:

Dr. Jorge Olmos Soto

Abstract

Bacillus thuringiensis is a gram-positive bacillus characterized by the production of crystal proteins during sporulation stage. These crystals are formed by one or more proteins called delta-endotoxins or Cry proteins, which are widely used in agriculture as insecticides. In recent years, it has been found that these proteins are potentially useful in the pharmaceutical industry because they exhibits toxicity against certain cancer cell lines without harming normal cells. Which has raised interest in the production and purification.

A key factor for the production of Cry proteins is the composition of the culture media. However, other factors such as oxygenation, pH, and the action of proteases produced by the bacterium itself also play an important role to improve the efficiency in the production of delta-endotoxins. In this project, we established the optimal culture conditions associated with these factors, in order to increase the production of Cry1A protein that has insecticide and anticancer properties.

It was found that the production of this protein was increased with reduced oxygenation, pH near to 7.0 and a NaCl concentration of 5 g/L, and with the addition of a starch source that benefit their constitution. A purification system based on the difference in size of the crystals produced with respect to the size of the spores was used, this system was able to discriminate spores and vegetative cells. Protein being obtained easily and with the right conditions for cell culture assays.

Keywords: **delta endotoxins, *Bacillus thuringiensis*, anticancer proteins.**

Dedicatoria

A mis padres: Rosa Carmina Guzman Salaiz y Felix Hernandez Zepeda, porque gracias a su amor, confianza, apoyo incondicional y orientación a lo largo de mi vida, he logrado superar todos los obstáculos y alcanzar cada una de las metas que me he trazado.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por los recursos económicos proporcionados para la realización de este proyecto.

Al Dr. Jorge Olmos Soto por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su valiosa asesoría y la confianza brindada durante la realización de esta tesis.

A los miembros de mi comité de tesis, el Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez y al Dr. José de Jesús Paniagua Michel por su apoyo y atinadas observaciones.

A la técnico de laboratorio, Rosalía Contreras Flores por su asesoría y apoyo académico.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a Rosalinda Mejía Rodríguez y a Ana Karina Espinoza Villalva por alentarme en todo momento, por sus sabios consejos y las muestras de cariño.

A mis compañeros de generación y amigos de CICESE, por compartir conmigo tantos momentos agradables.

Contenido

	Página
Resumen español.....	ii
Resumen inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tablas.....	ix
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1.1 Diversidad y clasificación de las proteínas Cry.....	2
1.1.2 Genes de proteínas Cry.....	3
1.1.3 Características estructurales y funcionales de las proteínas Cry.....	4
1.1.4 Etapas de la esporulación.....	7
1.1.5 Mecanismo de acción de las proteínas Cry en <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
1.2 Antecedentes.....	10
1.2.1 Medios de cultivo para <i>Bacillus thuringiensis</i>	10
1.2.2 Proteasas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
1.2.3 Métodos de purificación de los cristales.....	14
1.2.4 Actividad anticancerígena.....	15
1.3 Justificación.....	16
1.4 Objetivo general.....	17
1.5 Objetivos específicos.....	17
Capítulo 2. Metodología.....	18
2.1 Cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
2.2 Medio de cultivo.....	18
2.3 Preparación del pre-inóculo e inóculo.....	18
2.4 Condiciones de cultivo.....	19
2.5 Curva de crecimiento.....	19
2.6 Análisis microscópico.....	20
2.7 Ensayo de actividad de proteasas.....	20
2.8 Purificación de proteínas Cry.....	21
2.9 Solubilizado y activado de las toxinas.....	21
2.10 Análisis por SDS-PAGE.....	22
2.11 Cuantificación por el método de Bradford.....	22
2.12 Ensayo de citotoxicidad <i>in-vitro</i>	23
Capítulo 3. Resultados.....	24
3.1 Curva de crecimiento.....	24
3.2 Ensayo de actividad de proteasas.....	25
3.3 Análisis microscópico.....	26

3.3.1 Comparación de los medios de cultivo SP y un medio de cultivo a base de almidón.....	26
3.3.2 Producción en el medio de almidón a diferentes condiciones de aireación.....	28
3.4 Análisis por SDS-PAGE.....	29
3.4.1 Aireación.....	29
3.4.2 Espuma.....	30
3.5 Purificación de cristales.....	31
3.6 Solubilizado y activado de las toxinas.....	32
3.7 Ensayo de citotoxicidad <i>in-vitro</i>	33
Capítulo 4. Discusión.....	35
4.1 Composición del medio de cultivo.....	35
4.2 pH y acción de las proteasas.....	36
4.3 Aireación.....	38
4.4 Purificación de proteínas.....	39
4.5 Solubilizado y activado de las toxinas.....	41
4.6 Ensayo de citotoxicidad <i>in-vitro</i>	42
Capítulo 5. Conclusiones.....	43
Perspectivas.....	45
Referencias bibliográficas.....	46
Anexos.....	52

Lista de figuras

Figura		Página
1	Espora y cristal paraesporal de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	1
2	Estructura en tres dimensiones de un tipo de proteína Cry.	6
3	Diagrama esquemático de esporulación en <i>Bacillus thuringiensis</i> .	8
4	Mecanismo de acción de proteínas Cry en algunas especies de insectos.	9
5	Tiempos de activación, preinóculo, inóculo y cultivo.	19
6	Diagrama esquemático del método de purificación.	21
7	Curva de crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	24
8	Evaluación en placa de la actividad de las proteasas del cultivo de Bt.	25
9	Comparación de la producción de proteínas Cry en los medios SP y de almidón a diferentes tiempos de cultivo.	27
10	Comparación microscópica de la producción de cristales Cry bajo dos condiciones de aireación.	28
11	Comparación en gel de poliacrilamida de la producción de proteínas Cry bajo dos condiciones de aireación.	29
12	Análisis por SDS-PAGE de la espuma producida en el medio de cultivo.	30
13	Análisis por SDS-PAGE de la purificación de proteínas Cry.	31
14	Análisis por SDS-PAGE del solubilizado de proteínas Cry utilizando carbonato de sodio/bicarbonato de sodio y NaOH.	32
15	Análisis por SDS-PAGE del solubilizado y activado de proteínas Cry a diferentes concentraciones de tripsina y un posterior ajuste de pH.	33
16	Análisis de la actividad citotóxica de las proteínas Cry producidas y purificadas en este trabajo	34

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Asociaciones entre los principales tipos de cristales de <i>B. thuringiensis</i> , proteínas Cry y su actividad insecticida.	3
2	Características estructurales y funcionales de los dominios de las delta endotoxinas.	5

Capítulo 1

Introducción

Bacillus thuringiensis es un bacilo gram positivo, flagelado, que mide de 3 a 5 μm de largo por 1 a 1,2 μm de ancho, es habitante de la flora normal del suelo y tiene como característica principal la producción de un cristal proteico al momento de la esporulación. Los cristales están constituidos por proteínas conocidas como delta-endotoxinas que son ampliamente utilizadas en la industria agrícola por su capacidad insecticida (Figura 1) (Sauka & Benintende, 2008).

El uso de bioinsecticidas hechos a base de *Bacillus thuringiensis* se extendió rápidamente a nivel mundial debido a que presenta varias características que lo han hecho popular para su utilización en cultivos agrícolas y en el control de mosquitos, que son vectores de enfermedades endémicas como el dengue y la malaria (Luna-finkler & Finkler, 2012; Zhang et al, 2013). Una de las características más importantes es que sirven como alternativa para evitar los efectos ambientales dañinos ocasionados por el uso excesivo de insecticidas químicos. Los bioinsecticidas son biodegradables, es decir, no contaminan ni suelos ni el agua, y no causan problemas a la salud humana.



Figura 1. Espora y cristal paraesporal de *Bacillus thuringiensis* (Bulla et al, 1977, p.379).

Microscopía electrónica de *Bacillus thuringiensis* completamente esporulado y con la presencia de un cristal paraesporal. Sp, espora; Cr, cristal paraesporal. Barra, 1.0 μm .

La seguridad de distintos productos formulados a base de *Bacillus thuringiensis* ha sido estudiada por varios grupos de investigadores y todos ellos han llegado a la conclusión que son totalmente inofensivos contra los seres humanos y otros mamíferos, animales acuáticos y plantas (Luna-finkler & Finkler, 2012).

1.1.1 Diversidad y clasificación de proteínas Cry

Según la variedad de *Bacillus thuringiensis* las proteínas Cry pueden presentar diferente forma y tamaño, se pueden observar cristales bipiramidales, cuboidales, circulares, romboidales, amorfos, etc. (Prieto et al, 1997). En todos estos casos la inclusión cristalina puede estar compuesta de uno o más tipos de delta-endotoxinas (proteínas Cry y Cyt). Las proteínas Cry son selectivamente tóxicas para diferentes especies de invertebrados: artrópodos (principalmente insectos), nematodos, gusanos y protozoos (Prieto et al, 1997).

Estas proteínas fueron clasificadas por Höfte y Whiteley en cuatro clases de acuerdo al porcentaje de identidad en sus secuencias de aminoácidos y sus espectros de actividad insecticida: CryI (Lepidopteros), CryII (Lepidopteros y Dipteros), Cry III (Coleopteros), CryIV (Dipteros) (Höfte & Whiteley, 1989).

Sin embargo, actualmente las toxinas se clasifican sólo en base al porcentaje de identidad de su secuencia de aminoácidos, donde cada protoxina adquirió un nombre que consiste en el prefijo Cry y cuatro filas jerárquicas que constan de números y letras, dependiendo de su lugar en un árbol filogenético. Para el primer y cuarto nivel se utiliza un número, y para el segundo y tercer nivel se utiliza una letra (mayúscula y minúscula respectivamente) por ejemplo, Cry25Aa1. Por lo tanto, las proteínas con menos de 45% de identidad de secuencia difieren en grado primario (Cry1, Cry2, etc.), las que comparten la primer letra tendrán un nivel de identidad de entre 45 y 78%, las que compartan también la letra minúscula tendrán entre 78 y 95% de identidad, por lo que el cuarto nivel indica una identidad superior al 95% (Yul et al, 2007; Ibrahim, 2012).

Como se puede observar en la Tabla 1, en muchos casos ha sido posible relacionar la morfología del cristal, el peso molecular, el tipo de proteína Cry que constituye el cristal y su acción toxicológica (Sauka & Benintende, 2008).

Tabla 1. Asociaciones entre los principales tipos de cristales de *B. thuringiensis*, proteínas Cry y su actividad insecticida (Sauka & Benintende, 2008, p.126).

Tipo de cristal	Grupo	Peso molecular (kDa)	Toxicidad
Bipiramidal	Cry1	130	Lepidópteros
Cúbico	Cry2	65	Lepidópteros y Dípteros
Cuadrado aplanado	Cry3	72	Coleópteros
Esférico	Cry4A, Cry4B, Cry10 y Cry11	135, 128, 78, 72	Dípteros

1.1.2 Genes de proteínas Cry

En *Bacillus thuringiensis* los genes que codifican proteínas Cry se encuentran principalmente en plásmidos, aunque existen algunos genes que están codificados en el cromosoma. Aproximadamente entre 10-20 % de la capacidad de codificación genética de *Bacillus thuringiensis* se encuentra en los plásmidos, presentando pesos moleculares que van desde 1,5 MDa hasta más de 130 MDa.

Las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con frecuencia contienen múltiples plásmidos y algunos pueden albergar más de un gen codificante de proteínas Cry. Estos genes pueden dirigir la síntesis de un cristal conformado por más de una delta endotoxina, o pueden formar varios cristales con distintas morfologías dentro de una misma célula. Un ejemplo es la cepa HD1 subespecie *kurstaki* que alberga 12 plásmidos. En uno de ellos, de aproximadamente 44 MDa contiene un gen CryIAb y en otro de aproximadamente 110 MDa los genes CryIAa, CryIAc, CryIIA y un gen silencioso CryIIB. Las proteínas CryIAa, CryIAb, CryIAc contribuyen a la formación de un cristal proteico en forma bipiramidal, mientras que la proteína CryIIA forma un cristal en forma cuboide.

El caso de *B. thuringiensis subsp. israelensis* es similar, los genes cryIVA, cryIVB, cryIVD, y Cyta están todos contenidos en un plásmido de 72 MDa y contribuyen a la formación de un cuerpo paraesporal complejo (Baum & Malvar, 1995).

Por otro lado, se ha reportado que la pérdida espontánea de un plásmido que codifica para una protoxina puede resultar en la variación de la solubilidad del cristal proteico

generado por la bacteria. En *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD133 que produce una inclusión que comprende las protoxinas cryIAb , CryIC , CryID, la pérdida espontánea de un plásmido inestable con un tamaño de 45 mDa que codifica CryIAb dio lugar a inclusiones que requieren un pH más alto para la solubilización completa. Como resultado, hubo una menor toxicidad de estas inclusiones para ciertos insectos, tales como *Plodia interpunctella*, a pesar de la presencia de la toxina CryIC que es efectiva contra estos insectos (Aronson, 1995).

Este efecto posiblemente se debe a que CryIAb difiere en 26 aminoácidos con respecto a la mayoría de las proteínas CryI, como resultado de esta omisión, 4 de los 17 residuos de cisteína que se presentan en la mayoría de las protoxinas CryI, ubicados principalmente del lado del carboxilo, están ausentes. Por tanto, debe haber interacciones de enlaces disulfuro únicas entre esta protoxina con las demás que conforman una inclusión paraesporal, lo que podría explicar las propiedades de solubilidad y toxicidad que se observan cuando está presente o ausente la protoxina CryIAb (Aronson, 1995).

1.1.3 Características estructurales y funcionales de las delta endotoxinas

La estructura de varias toxinas Cry en su forma activa se ha resuelto y proporciona conocimiento importante sobre las bases moleculares de la actividad insecticida y su especificidad con el huésped. En base a análisis cristalográficos de rayos X se ha observado que todas las moléculas Cry1-Cry4 activadas, consisten en tres dominios con funciones independientes e interrelacionados: dominio 1, un haz de siete α -hélices que aparentemente forma el canal en la membrana, esencial para la toxicidad; dominio II, un dominio de unión que contiene tres hojas β , bucles que reconocen y se unen a patrones específicos de residuos de azúcar en la glicoproteína y / o receptores de glicolípidos, lo que los relaciona con la especificidad de la toxina con el insecto, y el dominio III, un sándwich- β que proporciona soporte estructural para las moléculas y además contiene las regiones responsables de la unión a los receptores del intestino medio (Figura 2) (Federici et al, 2006; Saraswathy & Kumar, 2004; Avignone-Rossa & Mignone, 1995).

La composición de aminoácidos es la que finalmente determina la estructura de la proteína Cry, a pesar de porcentajes bajos de identidad entre distintas proteínas Cry se puede observar que prevalece esta clase de dominios. Por ejemplo, dos proteínas que tienen acción tóxica específica contra distintas especies de insectos; Cry1Aa (específica para Lepidopteros) y Cry3A (específica para coleópteros) y que presentan únicamente un 36% de identidad en su secuencia de aminoácidos, muestran estructuras finales superponibles con un mecanismo de acción similar (Tabla 2) (Saraswathy & Kumar, 2004).

Tabla 2. Características estructurales y funcionales de los dominios de las delta endotoxinas (Saraswathy & Kumar, 2004, p.183).

Dominio	Secuencia de Aminoácidos		Estructura secundaria	Función
	Cry1Aa	Cry3A		
Dominio I	33-252	58-290	Siete alfa hélices	Formación del Poro
Dominio II	265-461	291-500	Tres hojas beta plegadas antiparalelas en tres bucles	Unión al receptor y determinación de la especificidad.
Dominio III	463-609	501-644	Emparedado beta de dos hojas beta antiparalelas	Unión al receptor, canal de regulación iónico y especificidad al insecto.

Una característica importante de los cristales de *Bacillus thuringiensis* se encuentra en las interacciones químicas y fisicoquímicas, como los enlaces de hidrógeno y los enlaces disulfuro. Estos son importantes en la estabilización de la estructura terciaria, y permiten que los cristales estén compuestos de una o más proteínas Cry, además juegan un papel principal en la solubilidad de los cristales proteicos. Entre mayor número de interacciones de este tipo estén presentes, el proceso de solubilizado es más complicado (Avignone-Rossa & Mignone, 1995).



Figura 2. Estructura en tres dimensiones de un tipo de proteína Cry (Bravo et al, 2011, p.424).

Estructura en tres dimensiones de la proteína Cry8Ea donde se pueden observar cómo están conformados los tres dominios característicos de las proteínas Cry.

La composición de aminoácidos de diferentes cristales de *Bacillus thuringiensis* muestra un promedio de cisteínas de 1.6% (1.1 a 1.8%), excepto para la variedad *israelensis* donde el porcentaje de cisteínas es de 2.1%. Esto debe considerarse al estudiar la estabilidad de los cristales en medios alcalinos. *B. thuringiensis* subespecie *thuringiensis* presenta cristales con grupos cisteína exclusivamente como enlaces disulfuro, mientras que el análisis de los cristales de la variedad *israelensis* muestra una estructura cristalina más compleja, en la que los enlaces disulfuro parecen no tener participación en la toxicidad, en contraste con los cristales producidos por otras variedades de *Bacillus thuringiensis*.

Estas características estructurales basadas principalmente en las interacciones entre enlaces disulfuro dan estabilidad y condicionan el pH al que se solubilizan los cristales proteicos. En un pH alcalino (9.0-9.5), las toxinas CryI son solubilizadas, mientras que las toxinas CryII permanecen insolubles a menos que el pH se eleve a 12. CryIVA, CryIVB, y CytA son solubles a pH 9.5, pero CryIVD se solubiliza a pH de

aproximadamente 12. En cambio CrylAc es soluble a valores de pH superiores a 9.5 o inferior a 3.5 (Avignone-Rossa & Mignone, 1995).

1.1.4 Etapas de la esporulación

Durante la fase de crecimiento vegetativa donde hay nutrientes disponibles, las células crecen de manera exponencial, pero al encontrarse en condiciones menos favorables, cuando los nutrientes del medio empiezan a agotarse, *Bacillus thuringiensis* entra en estado de transición e inicia una serie de mecanismos genéticos que facilitan la supervivencia en el ambiente hostil. Produce compuestos específicos como: enzimas de degradación, toxinas, etc.; que le ayudan a obtener la cantidad de nutrientes que necesita, de lo contrario pasa a la etapa de esporulación (Lereclus et al, 2000).

En *Bacillus thuringiensis* esta etapa se caracteriza por la formación de la espora y la síntesis de uno o varios cristales paraesporales, la célula se denomina esporangio y se compone de dos compartimientos: célula madre y preespora (Agaisse, 1995). Sin embargo, la secuencia del desarrollo de la espora y la formación del cristal paraesporal en *B. thuringiensis* es mucho más complejo, tal y como se esquematiza en la Figura 3 y se resume en las siguientes etapas: Etapa I, formación de filamentos axiales y condensación del material genético al centro de la célula; etapa II, formación del tabique (septo) de la preespora formando dos compartimientos donde se segrega el DNA, el de la espora en desarrollo y la célula madre; etapa III, procesos de envolvimiento con la participación de los mesosomas, primera aparición de la inclusión ovoide y del cristal paraesporal y la formación de la preespora; etapas IV a VI, formación del exosporio, pared celular, corteza y cubiertas de la espora acompañado de la transformación del nucleoide de la espora; etapa VII, maduración de las esporas (Bulla & Bechtel, 1976).

El cristal se ubica dentro del esporangio y al completarse el proceso de maduración de las esporas ambos son liberados al medio de cultivo, sin embargo, existen algunos casos donde se han descrito cristales dentro del exosporio, por lo que estos continúan con la espora tras la lisis celular (Ibrahim, 2012).

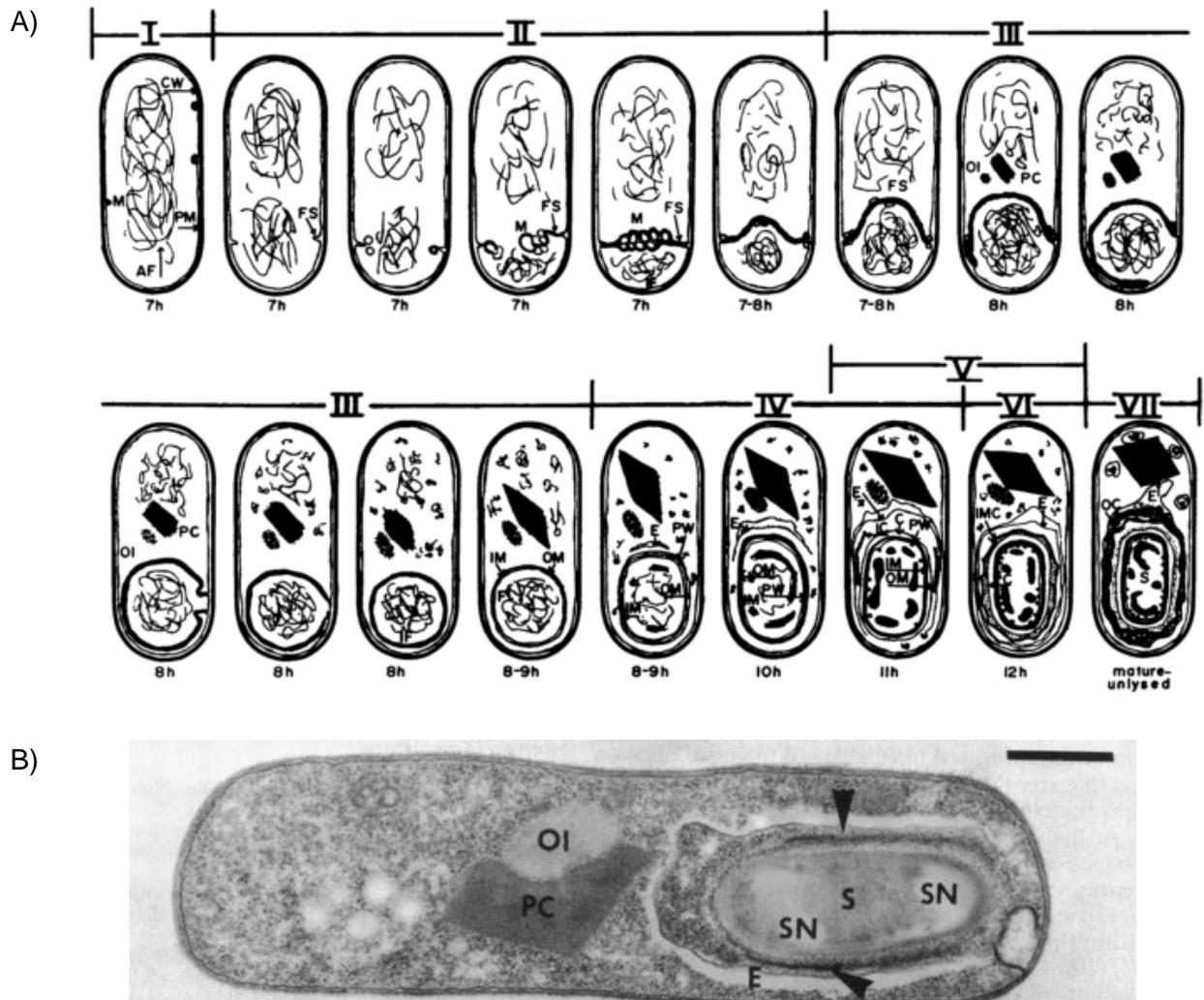


Figura 3. Diagrama esquemático de esporulación en *Bacillus thuringiensis* (Bulla & Bechtel, 1976, p.1473,1479).

A) Abreviaturas: M, mesosoma; CW, pared celular; PM, membrana plasmática; AF, filamento axial; FS, tabique de la preespora; IF, preespora inicial; OI, inclusión ovoide, PC, cristal paraesporal; F, preespora; IM, membrana interna; OM, membrana externa; PW, pared celular primordial; E, exosporio; LC, capa laminar de la espora; OC, capa externa de la espora; C, corteza, IMC, citoplasma incorporado de la célula madre; S, espora madura en un esporangio no lisado. B) Micrografía electrónica de una célula de *Bacillus thuringiensis* en sus últimas etapas de esporulación (IV-V). Las flechas señalan la capa laminar de la espora; E, Exosporio; SN, nucleoide de la espora; OI, inclusión de forma ovoide; PC, Cristal paraesporal. Barra = 0.5 μ m

1.1.5 Mecanismo de acción de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*

El mecanismo de acción de las proteínas Cry es un proceso de múltiples etapas. Los cristales de *B. thuringiensis* que pueden estar conformados de una o más proteínas Cry son ingeridos y luego solubilizados debido al pH alcalino presente en el intestino medio del insecto, tras lo cual se liberan las proteínas Cry en forma de protoxinas que carecen aún de actividad biológica. Estas condiciones alcalinas de pH con un rango de 8-11 se encuentran en los insectos lepidópteros y dípteros, sin embargo, ciertas proteínas Cry requieren de condiciones neutras o ligeramente ácidas, como es el caso de las proteínas Cry3 cuyo efecto tóxico se genera en insectos coleópteros que cuentan con los rangos de pH mencionados.

Las proteínas Cry solubles producirán su efecto hasta ser procesadas por proteasas intestinales que generan toxinas activas, para ello es necesaria la escisión de péptidos tanto del extremo N- como del C- terminal. Posteriormente, se unirán a receptores de membrana de las células del intestino del insecto y formarán un poro que ocasiona un desequilibrio osmótico, lisis celular y la muerte del insecto (Federici et al, 2006; Sauka & Benintende, 2008).

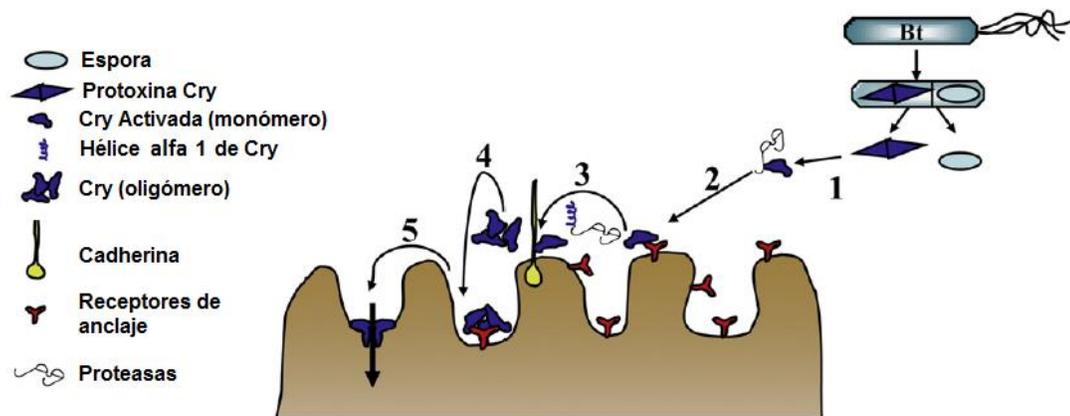


Figura 4. Mecanismo de acción de proteínas Cry en algunas especies de insectos (Bravo et al, 2011, p.426).

Se observa una recreación esquemática de los pasos necesarios para que las proteínas Cry lleven a cabo su acción tóxica. 1. Solubilización y procesamiento proteolítico de la protoxina Cry por las proteasas del intestino medio del insecto. 2. Unión de toxina Cry activada a los receptores. 3. Unión a la cadherina y proteólisis de la hélice alfa. 4. Formación del oligómero y unión a los receptores. 5. Inserción del oligómero Cry a la membrana para la formación del poro.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Medios de cultivo para *Bacillus thuringiensis*

Se sabe que los requerimientos nutricionales entre las variedades de *Bacillus thuringiensis* cambian, por lo que un medio que es muy bueno para una variedad en otra puede ser prácticamente inservible (Avignone-Rossa & Mignone, 1995). Un estudio hecho por İçgen 2002(b) reveló una regulación diferencial de las proteínas CryI y CryII, observando que se favorecía la síntesis de una u otra proteína en relación a los ingredientes del medio de cultivo. Por tanto, es difícil generar un medio que sea efectivo para todas las cepas, sin embargo, se han desarrollado una gran variedad de medios de cultivo y se ha demostrado que en todos los casos es importante que contengan una fuente de carbono, que les suministre energía para los procesos anabólicos, una fuente de nitrógeno para el crecimiento, esporulación y síntesis de la proteína, y no menos importante es la adición de micronutrientes tales como Ca, Mg, Mn, K, y Fe (Arcas et al, 1984; Avignone-Rossa & Mignone, 1995; Escobar et al, 2004; Kurt et al, 2005; Sarrafzadeh, 2012). Es importante considerar que según Dixon y Webb, 1946, los cationes divalentes son generalmente conocidos ya sea como activadores o como cofactores de muchas enzimas proteolíticas (Sabbour et al, 2012).

Içgen en el 2002(a) realizó un estudio donde evaluó la adición de minerales bajo distintas concentraciones para observar el efecto en el crecimiento y producción de proteínas Cry en *Bacillus thuringiensis*, observando que la omisión de Mg en el medio de cultivo disminuyó el crecimiento y esporulación, pero el mayor efecto de este mineral fue evidente en la disminución de la producción del cristal. El calcio es un estimulador de la esporulación, sin embargo, en sus experimentos no se observó efecto en el crecimiento o síntesis de la proteína. Por otro lado, altas concentraciones de calcio afectan negativamente los tres procesos antes mencionados. La omisión del Mn baja la frecuencia de esporulación y síntesis del cristal proteico, pero las concentraciones elevadas son tóxicas para el crecimiento y presenta una esporulación y síntesis del cristal prácticamente inhibida. En cambio, la ausencia de Zn del medio de cultivo mostró una ligera mejoría en la síntesis del cristal.

En otros experimentos realizados por Wakisaka (1982), al modificar la concentración de potasio en diferentes medios de cultivo obtuvo resultados que sugieren que el potasio juega un papel esencial no sólo en el crecimiento celular de *Bacillus thuringiensis* y la formación de la delta endotoxina, sino también en la esporulación.

Muchos medios de cultivo han sido basados en nutrientes que son fáciles de obtener en ciertas regiones por ser desechos industriales, reutilizándolos y haciendo posible en gran medida la reducción de costos. Diferentes fuentes de carbono y nitrógeno han sido empleadas en estos medios complejos, tal es el caso de melazas, harinas de trigo, de pescado, de soya, licor de maíz entre otras (Morales, 1988; Sarrafzadeh, 2012; Mazmira et al, 2012).

Recientemente, Zouari y sus colaboradores publicaron un trabajo donde a pesar de no utilizar desechos industriales como fuente de carbono o nitrógeno, suplieron de una manera similar los minerales complementarios. Ellos utilizaron un medio basado en almidón y soya como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente, y emplearon agua de mar como la fuente de los minerales complementarios, esto con el propósito de generar un medio de cultivo más económico. Observaron que el agua de mar suplió perfectamente los minerales necesarios para la producción de la delta endotoxina, y que además, mostró una disminución considerable de la actividad de las proteasas (Zouari et al, 2007a).

Estas formas de elaborar medios de cultivo trae grandes beneficios económicos, sin embargo, un grave problema del uso de subproductos agroindustriales para la elaboración de medios de cultivo es que son medios muy complejos y que fácilmente pueden variar las proporciones de sus nutrientes, afectándose la producción de la toxina de un lote de producción a otro.

El efecto conocido como represión catabólica es otro factor importante que se debe considerar al momento de la elección de un medio de cultivo para el crecimiento de *B. thuringiensis* y la producción de delta endotoxinas (Mazmira et al, 2012). Esto se refiere a la inactivación de ciertos operones que metabolizan los azúcares (como el operon lac), en favor de la utilización de glucosa cuando la glucosa es la fuente de carbono predominante en el entorno de la célula. El exceso de carbono en el medio de cultivo no solo ocasiona una represión catabólica sino que también reprime la expresión del gen spo0A, inhibiendo la producción de esporas (Olmos et al, 1996; Mazmira et al, 2012).

Esto ha sido observado por varios investigadores quienes llegaron a la conclusión que una concentración de glucosa entre 6-8 g/L mejora la producción de las delta endotoxinas y evita este tipo de represión (Mazmira et al, 2012). En otro experimento se investigó el período de cultivo durante el cual se produjo el efecto represivo de la glucosa y se determinó que la regulación ocurre durante las primeras 6 horas de crecimiento. Se observó también que es posible superar la regulación represiva de la síntesis de delta endotoxinas mediante el control de oxígeno en el medio de cultivo durante esta etapa (Souari 2007b).

1.2.2 Proteasas de *Bacillus thuringiensis*

Las proteasas son consideradas claves en los procesos de regulación del ciclo celular, crecimiento, diferenciación celular y la esporulación. *Bacillus thuringiensis* produce una gran cantidad de proteasas, principalmente metaloproteasas, proteasas alcalinas y proteasas cisteína. Estas proteasas pueden estar presentes de manera intracelular o extracelular. Las proteasas intracelulares están relacionadas con varios procesos metabólicos y celulares vitales de *Bacillus thuringiensis*, como la esporulación y diferenciación celular, la maduración de enzimas y la activación de las proteínas Cry. Las proteasas intracelulares son liberadas en el medio de cultivo al momento que son liberadas las esporas tras la lisis celular. En cambio, las proteasas extracelulares se secretan en la fase logarítmica de crecimiento, se relacionan con la lisis de proteínas presentes en el medio para utilizarlas como fuente de nitrógeno y aminoácidos para la bacteria, es por ello que están fuertemente influenciadas por la composición de los medios de cultivo, como lo son la relación de C/N, los iones metálicos y los azúcares que son fácilmente metabolizables. De la misma manera, otros factores como la aireación, la cantidad de inóculo, pH, temperatura y tiempo de cultivo afectan en la cantidad de proteasas producida (Brar et al, 2007).

La actividad de las proteasas puede afectar la virulencia de las esporas, la formación de su corteza, la capa de la espora, su maduración y la formación de los cristales proteicos. La cantidad de proteasas no puede correlacionarse con la cantidad de esporas, sino que depende de otros factores como los nutrientes del medio, especialmente la disponibilidad del nitrógeno (Brar et al, 2007).

Las proteasas tienen un aumento gradual las primeras 12 horas, llegando a su máximo alrededor de las 30 horas de cultivo de *Bacillus thuringiensis*, independientemente del medio de cultivo del que se trate.

Después de 30 horas se manifiesta una disminución en la cantidad de proteasas, que podría deberse a una autólisis o un ataque proteolítico por medio de las proteasas liberadas al medio de cultivo tras la lisis celular (Brar et al, 2007).

El procesamiento proteolítico de una protoxina en una toxina activa se produce por la acción de proteasas de tipo tripsina en el intestino de la larva. Proteasas exógenas como tripsina, papaína y quimiotripsina son también conocidas por formar toxinas activas de protoxinas solubles. Bajo ciertas condiciones esta conversión también está mediada por proteasas intracelulares de *Bacillus thuringiensis* (Kumar & Venkateswerlu, 1997).

Recientemente Kumar y sus colaboradores probaron que en el caso de *Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki* una metaloproteasa endógena está envuelta en la activación de la protoxina. Pero a diferencia de la toxina generada por proteasas exógenas tales como la tripsina, etc, la toxina activada por la proteasa intracelular es altamente letal para una variedad de insecto del orden de lepidópteros, *Spodoptera littoralis* (Kumar & Venkateswerlu, 1998a). Debido a esta observación, la síntesis de proteasas intracelulares fue estudiada por medio de zimografía de gelatina (técnica electroforética que permite observar la actividad enzimática). En *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD1, se detectó la actividad de tres proteasas principales, una proteasa con peso molecular de 92 kDa fue detectada a las 2 horas de iniciada la esporulación y continuó presente hasta las 48 horas, las proteasas de 69 y 78 kDa fueron detectadas a las 6 horas y continuaron hasta las 48 horas (Venkateswerlu & Reddy, 2002). La actividad gelatinolítica de las tres proteasas fue inhibida por EDTA, un inhibidor de metaloproteasas, mientras que los inhibidores de la proteasa serina (PMSF y DFP) y tiol (IAA y HgCl₂) no afectaron el patrón zimográfico (Kumar & Venkateswerlu, 1998b).

Estudios similares revelaron la presencia de dos proteasas intracelulares en *B. thuringiensis kurstaki* HD73 con pesos moleculares de 78 y 85 kDa, en este caso se observó su aparición hasta las 6 horas de iniciada la esporulación, y aunque la proteasa de 85kDa persistió hasta las 48 horas, la de 78 kDa únicamente continuó hasta las 9 horas comenzando a desaparecer a las 12 horas (Venkateswerlu & Reddy, 2002). Por

otra parte, Bibilos y Andrews (1988) observaron que en una variedad de *Bacillus thuringiensis kurstaki* la conversión de protoxina a toxina también fue realizada por proteasas intracelulares y en este caso la activación fue parcialmente inhibida utilizando PMSF.

1.2.3 Métodos de purificación de los cristales

Los ensayos para analizar las características toxicológicas de las proteínas Cry en insectos o en líneas celulares humanas requieren de la obtención de cristales puros y biológicamente activos. Sin embargo, resulta difícil separar los cristales de las esporas por su similitud en tamaño y en sus características superficiales. Han sido descritos muchos métodos de purificación de proteínas Cry en los que se utilizan principalmente cuatro propiedades para la separación de esporas y cristales: densidad relativa, propiedades de superficie, solubilidad y germinación de la espora (Morales, 1988).

Los primeros intentos se llevaron a cabo germinando las esporas y realizando centrifugados para separar de los cristales. Posteriormente fueron utilizados sistemas de dos fases, donde se formaban emulsiones con solventes orgánicos (trifluorotricloroetano, tetrabromoetano, tetracloruro de carbono y cloroformo), con el fin de que los cristales permanecieran en la fase acuosa. Pero estos métodos debían ser repetidos muchas veces para obtener una pureza aceptable, además, los rendimientos de purificación eran bajos (Nickerson & Ang, 1978).

También han sido empleados métodos de centrifugación en gradiente de densidad isopícnica de CsCl y Renografin, esta técnica se basa en la separación de los cristales y las esporas en un gradiente de densidades en función a la densidad de las mismas. Es decir, el cristal se mueve a través del gradiente hasta que llega al punto donde su densidad y la del gradiente es la misma. Estos métodos dan cristales con una buena pureza, pero los reactivos necesarios suelen ser caros y la cantidad de proteína purificada es baja.

Otros métodos similares pero que utilizan reactivos de bajo costo también han sido utilizados, tal es el caso de gradientes de glucosa (Thomas & Ellar, 1983), NaBr (Takebe et al, 2005) o sílice coloidal, mejor conocido como LUDOX (Filner et al, 1989).

Sin embargo, son procesos donde se requiere mucho trabajo y generalmente son poco prácticos a gran escala.

1.2.4 Actividad anticancerígena

Recientemente se ha reportado la existencia de cepas de *B. thuringiensis* que producen cristales paraesporales que no presentan actividad insecticida, ni hemolítica, que son estructuralmente diferentes a las proteínas Cry y Cyt y que se les ha relacionado con otra clase de propiedades tóxicas potencialmente útiles. Se trata de una nueva clase de proteínas Cry inocuas contra insectos que son conocidas como paraesporinas. Estas proteínas presentan actividad citotóxica a ciertos tipos de células cancerígenas del humano (Hayakawa et al, 2007; Jung et al, 2007). Al igual que las delta endotoxinas, las paraesporinas se sintetizan durante la fase de esporulación y forman inclusiones cristalinas que son liberadas al momento de la lisis celular (Federici et al, 2006).

En años recientes, en el laboratorio de microbiología molecular de CICESE se realizó un proyecto de investigación en el cual se aislaron y caracterizaron cepas de *Bacillus thuringiensis* de la región noroeste de México. Se encontró que algunas de ellas producían proteínas Cry que no solo tenían efecto contra insectos, sino que además presentaban acción citotóxica contra ciertas líneas celulares de cáncer sin dañar a las líneas celulares normales humanas. Esta clase de proteínas no pertenece al grupo de las paraesporinas y no presentan actividad hemolítica como las proteínas Cyt (Olmos et al, 2012).

1.3 Justificación

Debido al posible uso de las toxinas Cry como cura de enfermedades tales como el cáncer, es necesario un sistema de producción y purificación más amigable, con el cual se puedan obtener mayores cantidades de proteína en las condiciones adecuadas, para cubrir la demanda que originan los estudios en cultivo celular y del área farmacéutica.

Se ha observado que la producción de cristales varía dependiendo del tipo de proteína que lo conforma, del medio de cultivo utilizado y de la variedad de *Bacillus thuringiensis* seleccionada, por tanto, es indispensable analizar las condiciones nutricionales y de cultivo que favorecen la producción de proteínas que presentan acción insecticida y anticancerígena.

1.4 Objetivo general

Optimización de las condiciones de cultivo para mejorar el rendimiento de producción y purificación de las proteínas Cry en *Bacillus thuringiensis*.

1.5 Objetivos específicos

Determinar el medio de cultivo idóneo para la producción de proteínas Cry que presentan acción insecticida y anticancerígena.

Optimizar las condiciones de cultivo que incrementen la producción de cristales.

Adecuar un método de purificación eficiente y amigable que permita obtener las proteínas de interés en las condiciones adecuadas para ensayos de cultivo celular.

Capítulo 2

Metodología

2.1 Cepa de *Bacillus thuringiensis*

En trabajos previos en el laboratorio de microbiología molecular del CICESE se aislaron cepas de *Bacillus thuringiensis* en la región noroeste de México. En este trabajo se utilizó una de las cepas anteriormente aisladas y caracterizadas que presentaba actividad tóxica contra insectos y líneas celulares de cáncer (Mendoza et al, 2012; Olmos et al, 2012).

2.2 Medio de cultivo

Durante el transcurso de los experimentos fueron utilizados dos medios de cultivo; medio SP, cuyos componentes principales son: 5 g/L de peptona, 1 g/L extracto de carne y 2 g/L de extracto de levadura. Y un medio que se basó en una fuente de almidón y soya, agregando 5 g/L y 3g/L, respectivamente. A ambos medios de cultivo se les agregó 0.250 g/L de MgSO₄ y 1 g/L de KCl. Se les ajustó el pH a 7 y posteriormente se colocaron en un autoclave por 15 minutos a 121°C y 1 kg/cm².

Algunos otros minerales (MnCl₂, CaCl₂ y FeSO₄) se prepararon y esterilizaron en soluciones separadas y fueron adicionados posteriormente al medio de cultivo. Se agregaron 2 ml de MnCl₂ 10 mM, 1 ml CaCl₂ 0.5 M y 1 ml de FeSO₄ 0.1316 M.

2.3 Preparación del pre-inóculo e inóculo

La cepa seleccionada se activó sembrándose por estría múltiple en una caja Petri con medio de cultivo SP y se incubó por 12-14 horas a 30° C. Una colonia aislada se inoculó en 20 ml de medio de cultivo en matraz Erlenmeyer de 250 ml de capacidad y se creció a 30° C por 12 horas en agitación constante de 200 rpm.

El inóculo en todos los casos fue del 10%, es decir, se preparó tomando 2 ó 5 ml del cultivo una vez cumplidas las 12 horas y se inocularon 18 ó 45 ml de medio de cultivo

respectivamente, los cuales crecieron por 3 horas bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación. Para un volumen final de cultivo de 150 ml fueron utilizados 15 ml de inóculo en 135 ml de medio de cultivo, en cambio, para un volumen final de cultivo de 500 ml se utilizaron 50 ml de inóculo en 450 ml de medio de cultivo.

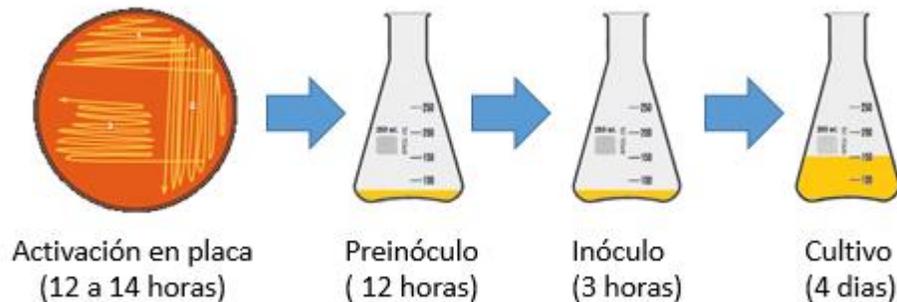


Figura 5. Tiempos de activacion, preinóculo, inóculo y cultivo.

Se representan los pasos a seguir y los tiempos de cada uno de ellos para obtener el inóculo que se utiliza en el proceso de cultivo.

2.4 Condiciones de cultivo

El proceso de cultivo se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 ml y Fernbach de 3 litros. Se realizaron ensayos utilizando los distintos medios de cultivo, la concentración de oxígeno se varió modificando el volumen de medio en el matraz con el fin de variar la relación aire-medio de cultivo dentro de este. En todos los casos los matraces fueron colocados en un orbital Thermo scientific MAXQ 5000 a una velocidad constante de 200 rpm, a 30° C y por un periodo de 96 horas.

2.5 Curva de Crecimiento

Durante el periodo de la cultivo se tomaron muestras cada hora durante el crecimiento exponencial y con intervalos mayores una vez alcanzada la fase estacionaria. Las muestras fueron analizadas al instante de ser tomadas utilizando un espectrofotómetro HACH DR 5000 a una longitud de onda de 600nm.

2.6 Análisis microscópico

Las muestras obtenidas fueron fijadas en un portaobjetos mediante calor y teñidas utilizando la tinción de verde de malaquita (Anexo 1). Posteriormente fueron observadas en un microscopio óptico de contraste de fases Olympus BX60 bajo un objetivo de 100X, y digitalizadas con ayuda de una cámara CoolSNAP-Procf utilizando un software Image-Pro Plus versión 4.1.0.0. La tinción permitió analizar la etapa de crecimiento en que se encontraban los cultivos con relación a las horas transcurridas, las células vegetativas se tiñen de color rojo, mientras que las esporas adquieren una coloración verde y los cristales se observan blancos. Pero si se observa en contraste de fases utilizando el filtro SP3, las células vegetativas se visualizan de color verde mientras que las esporas se tiñen de café y los cristales se observan blancos y refringentes.

2.7 Ensayo de actividad de proteasas

Se prepararon placas de medio Skim-milk a diferentes valores de pH (7, 8 y 9) y a dos concentraciones de NaCl (0.5 g/L y 5 g/L). Las placas se dividieron en cuadrantes, en los primeros tres se colocó un extracto del medio de cultivo (una muestra de 15 ml de medio de cultivo de 60 horas se centrifugo en una centrífuga eppendorf 5804R con la finalidad de precipitar las esporas y células vegetativas, se tomaron 5ml del sobrenadante y se pasaron a través de un filtro de 0.2 μ m). En el cuarto cuadrante se colocó una muestra del cultivo sin ser procesada, es decir, con la presencia de células vegetativas y esporas. En todos los casos se adicionaron 20 μ l de muestra sobre sensidiscos que se localizaban al centro de cada cuadrante de la caja Petri.

Se incubó a 30° C y cada 12 horas se midió el halo de degradación formado en cada uno de los cuadrantes, se registró la manera en que progresaba la degradación del medio skim-milk por acción de las proteasas presentes en el cultivo.

2.8 Purificación de proteínas Cry

Para la purificación de las proteínas que presentan actividad anticancerígena se empleó un sistema basado en las diferencias de tamaño y peso molecular de los cristales producidos en los medios de cultivo ensayados, con respecto a las esporas y células vegetativas de *Bacillus thuringiensis*.

Una vez finalizado el cultivo se pasó a través de un filtro de nitrocelulosa de 0.45 μm , el medio filtrado se colocó de nuevo en filtros Amicon Ultra de 100kDa y se centrifugó en una centrífuga eppendorf 5804R a 4000 G y una temperatura de 4° C por periodos de 10 a 15 min. La proteína de interés filtrada y concentrada, se solubilizó y finalmente se realizó un último filtrado por 0.2 μm tras mechero para mantener las condiciones de esterilidad.



Figura 6. Diagrama esquemático del método de purificación.

Se representan los pasos a seguir para la purificación de las proteínas Cry que presentan actividad insecticida y citotóxica contra células cancerígenas.

2.9 Solubilizado y Activado de las toxinas

Los cristales purificados del cultivo de *Bacillus thuringiensis* fueron solubilizados y activados. Se utilizaron dos soluciones de solubilizado, carbonato de sodio/bicarbonato de sodio 0.5 M e Hidróxido de Sodio 0.5 M. Se adicionaron hasta obtener pH's

aproximados de 8.5, 9.5 y 10 y fueron incubados en baño maria a 37° C por un periodo de 2 horas. Posteriormente se adicionó tripsina, llevando el medio a concentraciones de 10, 20 y 30 µg/ml y fueron incubados a 37° C por 1 hora.

2.10 Análisis por SDS-PAGE

Se recolectó 1 ml de muestra en tubos eppendorf a las 16, 35, 60, 82 y 96 horas de cultivo y se congelaron a -20° C. Una vez recolectadas todas las muestras se descongelaron sobre hielo, se tomaron 80 µl, se le agregaron 20 µl de solución de carbonato de sodio/bicarbonato de sodio 0.5 M y se incubaron en baño maria a 37° C por 2 horas. Se tomaron 25 µl de la muestra solubilizada, se le agregaron 5 µl de buffer de carga y fueron calentados a 95° C por 5 min (se utilizó esta solución de solubilizado debido a que como se podrá observar en los resultados presenta un mejor rendimiento). Las muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida con una fase de apilamiento al 5 %, una fase de resolución al 10 % y corridas a 75-80 volts por aproximadamente tres horas y media. El peso molecular de las proteínas fue estimado utilizando el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad) de 10 a 250 kDa. Posteriormente, los geles fueron teñidos con nitrato de plata (Anexo 2).

2.11 Cuantificación por el método de Bradford

Para medir la concentración final de la muestra después de los procesos de filtrado se utilizó el método de cuantificación de Bradford. A 795 µl de agua destilada se le agregaron 5 µl de la muestra filtrada. Se le agregaron 200 µl de solución de BRADFORD (0.01 % w/v azul brillante de coomassie G-250, 4.7 % w/v etanol y 8.5 % w/v de ácido fosfórico), se homogenizó por inversión y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se realizó la lectura utilizando un espectrofotómetro HACH DR 5000 a una longitud de onda de 595 nm (Bradford, 1976).

2.12 Ensayo de citotoxicidad *in-vitro*

Finalizado el proceso de producción y purificación de la proteína se realizó un ensayo de citotoxicidad *in-vitro*. Se utilizó una línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231) y una línea celular de queratinocitos humanos (HaCat) como control no canceroso, ambas fueron crecidas en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% v/v de SFB (Suero fetal bovino) y 1% de antibiótico-antimicótico Gibco 15240. Los cultivos se incubaron a 37° C con 5% de CO₂ y a una atmosfera humidificada.

En 100 µl de medio se sembraron 10,000 células por pozo en placas de microcultivo de 96 pocillos. Se incubaron por 5 horas a 37° C y 5% de CO₂. Después de transcurrido el tiempo de adhesión, se desechó el medio y se adicionó la toxina activa a una concentración de 1 µg/ml, utilizando la misma cantidad de medio como vehículo. Después de 2 horas de incubación a las condiciones mencionadas, se midió la viabilidad celular.

Capítulo 3

Resultados

3.1 Curva de Crecimiento

Se realizó una curva de crecimiento con la finalidad de observar el comportamiento de la cepa de interés a 2 concentraciones de NaCl (0.5 g/L y 5 g/L). Se observó que su fase de crecimiento exponencial terminó entre las 6-7 horas de iniciado el cultivo, a las 14 horas ambos cultivos alcanzaron su valor de absorbancia mayor con valores de 7.47 en 0.5g/L de NaCl y 7.1 en 5g/L de NaCl. A las 19 horas el cristal está completamente formado dentro de la célula y entre las 22-24 horas, las esporas fueron liberadas, lo cual coincide con el decremento en la absorbancia.

El crecimiento en ambos cultivos se comportó prácticamente igual (Figura 7), por lo tanto, la cantidad de NaCl a las concentraciones utilizadas no es un factor que afecte el crecimiento de la cepa de *Bacillus thuringiensis* utilizada.

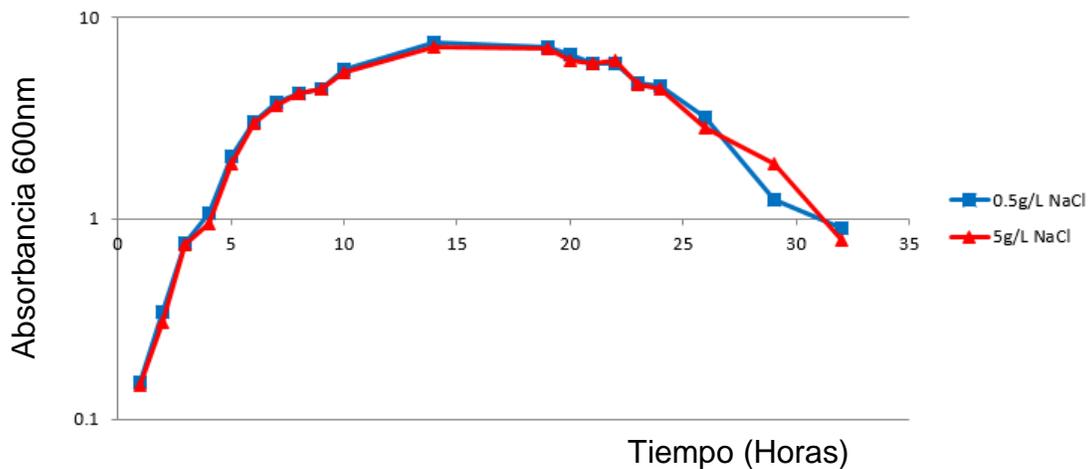


Figura 7. Curva de crecimiento de *Bacillus thuringiensis*.

Curva de crecimiento de una cepa de *Bacillus thuringiensis* bajo dos concentraciones distintas de NaCl (0.5 g/L y 5 g/L).

3.2 Ensayo de actividad de proteasas

Debido a que la acción proteolítica tiene un gran efecto en el crecimiento y producción de las proteínas Cry, ésta se evaluó a las 60 horas en el cultivo de *Bacillus thuringiensis*, utilizando placas de medio skim milk bajo diferentes condiciones de pH (7,8 y 9) y a dos concentraciones de NaCl (0.5 g/L y 5 g/L). Se eligieron estos valores de pH debido a que durante el proceso de cultivo, el potencial de hidrógeno aumenta a medida que pasan las horas y dependiendo del medio de cultivo es posible alcanzar valores superiores a 9, tal es el caso del medio SP constituido por peptona, extracto de carne y extracto de levadura.

En los resultados de las mediciones realizadas, al segundo día de agregada la muestra filtrada (sin esporas ni células vegetativas), se observó que las placas con 0.5 g/L de NaCl presentaron halos de degradación de 5, 6 y 7 mm de ancho a pH's de 7, 8 y 9, respectivamente. Mientras que en las placas con 5 g/L se observaron halos de degradación de 3.5, 4 y 4.5 mm (Figura 8). Lo que indica que a medida que el pH

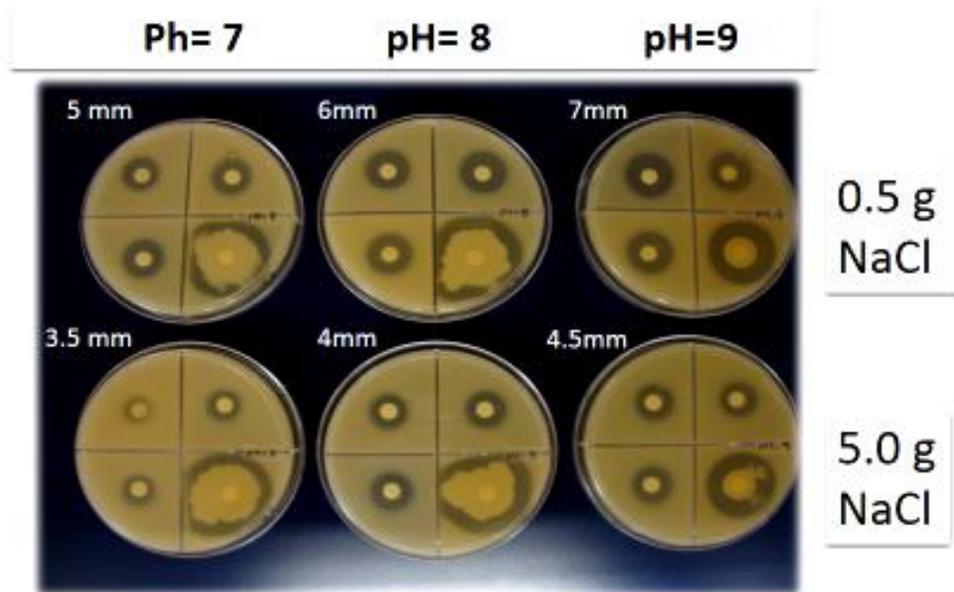


Figura 8. Evaluación en placa de la actividad de las proteasas del cultivo de Bt.

Se observó la acción de las proteasas en placas de medio Skim Milk a diferentes valores de pH (7, 8 y 9) y bajo dos concentraciones de NaCl (0.5 g/L y 5 g/L). En cada sensidisco se aplicaron 20 μ l de muestra de un cultivo de *Bacillus thuringiensis* de 60 horas. El crecimiento y degradación que se observa en la imagen es a las 48 horas de aplicada la muestra. La fotografía no está a escala real.

aumenta la acción de las proteasas es mayor, tanto en los medios con 0.5 g/L como en los que tenían 5 g/L. Sin embargo, en aquellos medios que presentan una cantidad mayor de sal, el rango de valores de degradación es considerablemente menor.

Por otra parte, en el cuarto cuadrante de cada caja se adicionó una muestra que contenía el medio de cultivo con células vegetativas y esporas, donde se observó que el crecimiento de las bacterias a pH de 7 y 8 fueron prácticamente el mismo, sin embargo, a pH de 9 se disminuyó el crecimiento considerablemente. Lo que sugiere que a pH's altamente alcalinos el crecimiento se inhibe (Figura 8).

3.3 Análisis microscópico

3.3.1 Comparación de los medios de cultivo SP y el medio de cultivo a base de almidón

Debido a que el pH del medio SP al finalizar el cultivo (96 horas) alcanza un valor aproximado de 9.25, y después de haber observado el efecto de la acción de las proteasas a ese rango, se decidió buscar un medio alternativo que diera mejores rendimientos de producción y cuyo pH final fuera menor. El medio de cultivo que se eligió fue basado en una fuente de almidón y soya cuyo pH final aproximado es de 8.1. Cuando se compararon ambos cultivos al microscopio se observó que el crecimiento, esporulación y desarrollo del cristal es más rápido en el medio basado en almidón. El cristal se formó completamente a las 19 horas con tamaños incluso mayores que el de las esporas. En cambio, en el medio SP en ningún momento fue tan evidente la formación de los cristales. (Figura 9). Por lo tanto, el medio con almidón se convirtió en el medio de elección debido a que presenta estas características tan favorables en la formación de los cristales.

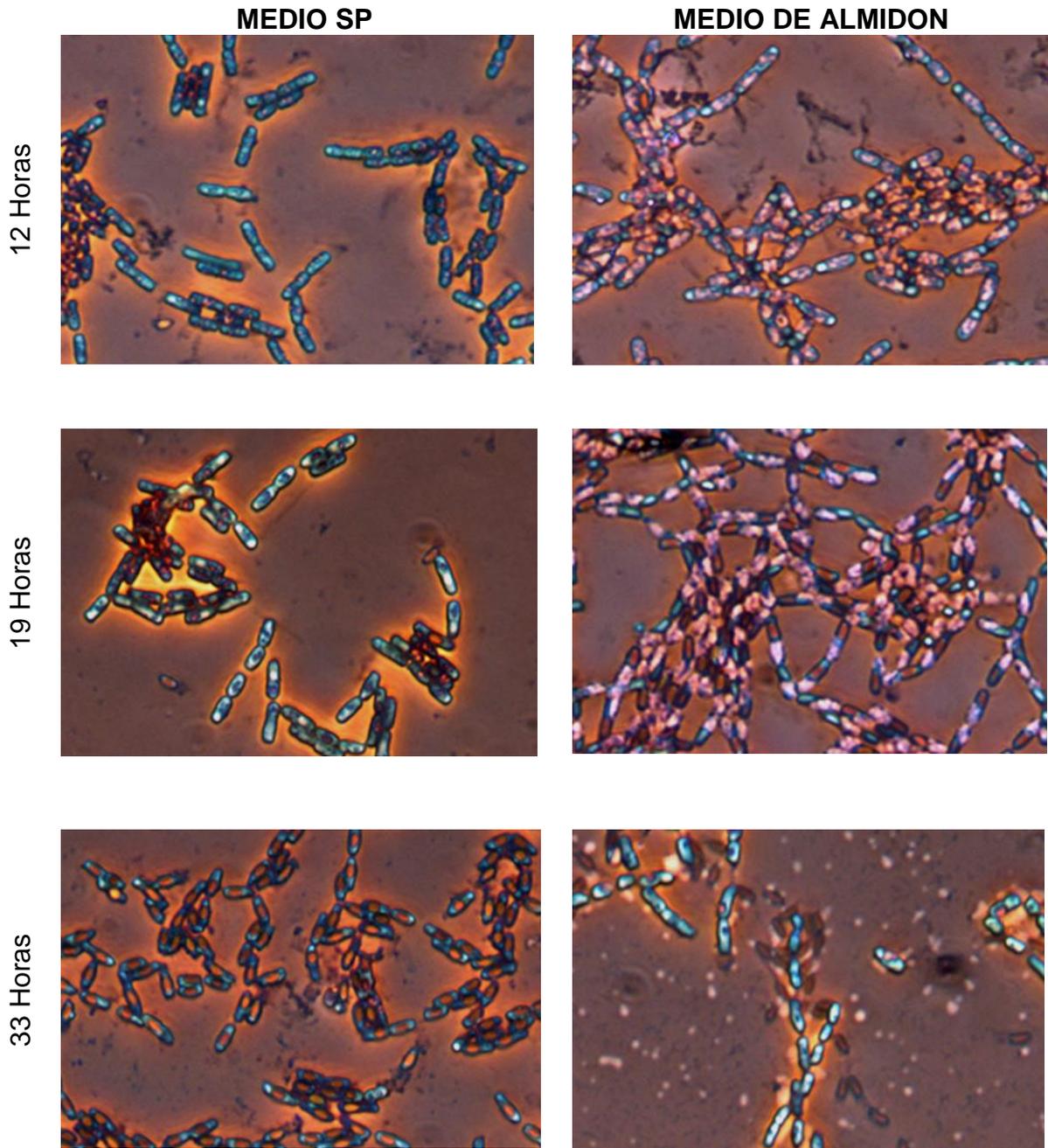


Figura. 9 Comparación de la producción de proteínas Cry en los medios SP y de almidón a diferentes tiempos de cultivo.

Se observa una comparación microscópica de los tiempos de crecimiento y la producción de la delta endotoxina en los medios de cultivo SP y el medio a base de almidón a las 12, 19 y 33 horas, crecidos a un volumen de 150 ml en un matraz Erlenmeyer de 250 ml a 30° C y 200 rpm. Las muestras fueron teñidas con verde de malaquita y observadas con un objetivo de 100X. Las células vegetativas se observan de color verde, las esporas de color café, y los cristales se observan blancos.

3.3.2 Producción en el medio de almidón a diferentes condiciones de aireación

Se evaluó la producción de cristales a diferentes niveles de aireación en el medio de cultivo basado en almidón. El nivel de aireación fue ajustado variando el volumen de medio de cultivo en los matraces. Dos niveles de fueron utilizados, un nivel bajo (1:1.5 relación de aire-medio de cultivo) y un nivel alto (5:1 relación de aire-medio de cultivo). El nivel de aireación bajo a las 19 horas mostró una producción de cristales de mayor tamaño comparados con los producidos en el cultivo de alta aireación, incluso cuando en este habían transcurrido 22 horas (Figura 10). Sin embargo, una producción de cristales de menor tamaño no es desfavorable, esas características permiten aplicar un método sencillo de purificación.

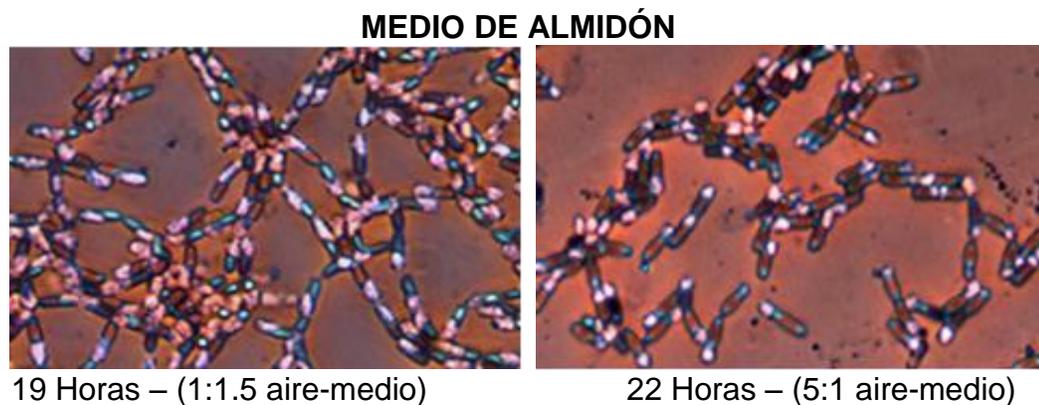


Figura 10. Comparación microscópica de la producción de cristales Cry bajo dos condiciones de aireación.

Se realizó una comparación de la producción de los cristales Cry en el medio de almidón bajo dos condiciones de aireación. La imagen se tomó al momento en que el cristal se encontraba a su mayor tamaño antes de la lisis celular. Las muestras fueron teñidas con verde de malaquita y observadas con un objetivo de 100X. Las células vegetativas se observan de color verde, las esporas de color café, y los cristales se observan blancos.

3.4 Análisis por SDS-PAGE

3.4.1 Aireación

Se realizó la producción en dos cultivos a distintas condiciones de aireación, se utilizaron volúmenes de 20 y 150 ml en matraces Erlenmeyer de 250 ml, es decir, relaciones de 11.5:1 aire-medio de cultivo y 1:1.5 aire-medio de cultivo, respectivamente. Se analizaron por SDS-PAGE cargando en cada pozo 30 μ l de muestra sin solubilizar y solubilizada de diferentes tiempos de cultivo (16, 35, 60, 82, 96 horas).

Como se puede observar en la Figura 11 en ambos casos una banda de aproximadamente 65-70 kDa, aparece después de 35 horas de cultivo bajo condiciones de solubilizado. Esta banda corresponde a la toxina activa y se observa más intensa en el cultivo cuya aireación es menor (1:1.5 aire-medio). La intensidad de las bandas se correlaciona con la cantidad de proteína, por tanto, a niveles bajos de aireación se produce una mayor cantidad de toxina. A las 16 horas en ninguno de los casos se observa la presencia de la toxina, sin embargo y a partir de las 60 horas se observa la mayor producción a condiciones limitadas de aireación.

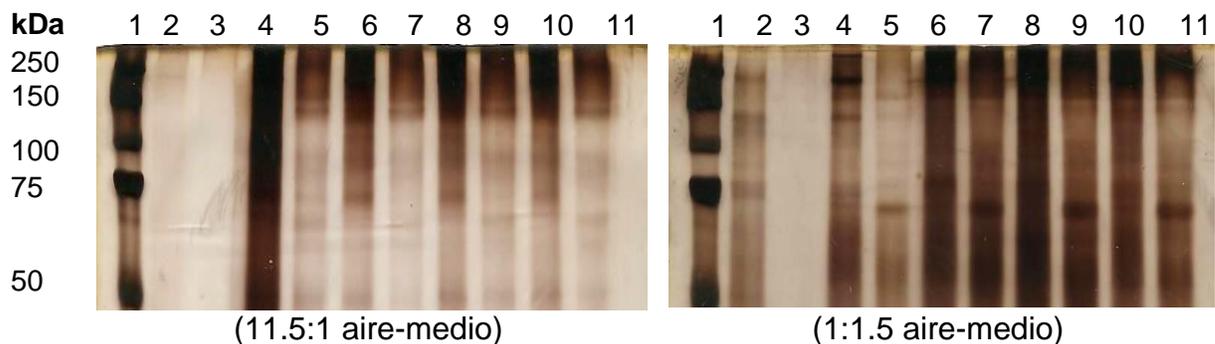


Figura 11. Comparación en gel de poliacrilamida de la producción de proteínas Cry bajo dos condiciones de aireación.

Se realizó una comparación de la producción de las proteínas Cry en el medio de almidón bajo dos condiciones de aireación. (11.5:1 aire-medio y 1:1.5 aire-medio). En todos los casos se cargaron 30 μ l de muestra por pozo. (1) Marcador de peso molecular, (2) 16 horas sin solubilizar, (3) 16 horas solubilizado, (4) 35 horas sin solubilizar, (5) 35 horas solubilizado, (6) 60 horas sin solubilizar, (7) 60 horas solubilizado, (8) 82 horas sin solubilizar, (9) 82 horas solubilizado, (10) 96 horas sin solubilizar, (11) 96 horas solubilizado.

3.4.2 Espuma

En los procesos de cultivo es común que se genere espuma debido a las burbujas producidas por la aireación o agitación del medio de cultivo, en combinación con concentraciones altas de proteína o tensoactivos liberados por la propia bacteria.

Durante los cuatro días de cultivo de los medios analizados, la producción de espuma se observó en varias ocasiones, principalmente en los cultivos que se realizaron en matraces Fernbach a un volumen de 500ml, generalmente coincidió con el inicio de la esporulación y con la lisis celular. Anteriormente, en el laboratorio de microbiología molecular del CICESE, al realizar el proceso de purificación de las proteínas Cry, la espuma era descartada, en este trabajo la espuma fue analizada por medio de SDS-PAGE. La Figura 12 muestra que una banda de aproximadamente 65-70 kDa fue claramente visible en el gel, lo que indica que una gran cantidad de toxina se encuentra contenida en la espuma que se produce a lo largo del proceso de cultivo, y que se pierde si la espuma es descartada.

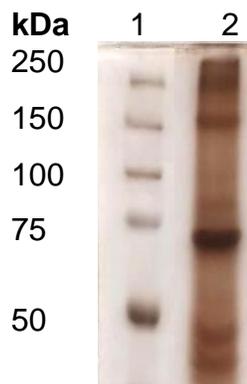


Figura 12. Análisis por SDS-PAGE de la espuma producida en el medio de cultivo.

Se observa un gel de poliacrilamida con una muestra de espuma solubilizada con Carbonato de Sodio/Bicarbonato de Sodio 0.5 M. (1) Marcador de peso molecular, (2) Espuma.

3.5 Purificación de cristales

Al finalizar el proceso de cultivo, el medio de cultivo se pasó a través de un filtro de nitrocelulosa de 0.45 μm , para remover las esporas y células vegetativas. Se observó que en la mayoría de las condiciones de cultivo los cristales también son retenidos en el filtro, sin embargo, los cristales que fueron producidos bajo altos niveles de aireación, que son de menor tamaño, son capaces de atravesar esta membrana. Una vez realizado el filtrado se procedió a remover las proteínas de bajo peso molecular utilizando un filtro amycon de 100 kDa. Cabe recordar que esta toxina antes de ser solubilizada presenta un peso molecular mayor a 100 kDa, por tanto, es retenida y concentrada por este filtro mientras que las proteínas de menor peso molecular eluyen con el medio y son desechadas.

Una vez realizados los filtrados la muestra concentrada se solubilizó y se analizó por SDS-PAGE para confirmar la presencia de la toxina activa. Como se puede ver en la Figura 13 la banda característica de la toxina se encuentra presente y una concentración muy baja de otras proteínas se puede apreciar.

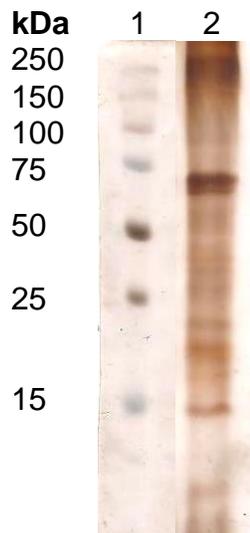


Figura 13. Análisis por SDS-PAGE de la purificación de proteínas Cry.

Se analizó por SDS-PAGE una muestra de proteínas Cry purificada mediante el filtrado de un cultivo de *B. thuringiensis*. En el gel se cargaron 30 μl de muestra solubilizada con una solución de carbonato de sodio/bicarbonato de sodio 0.5 M (1) Marcador de peso molecular, (2) cultivo purificado.

3.6 Solubilizado y Activado de las toxinas

Se comparó la acción de solubilizado de dos soluciones: Hidróxido de sodio 0.5 M y Carbonato-Bicarbonato de sodio 0.5 M. Cada una fué agregada por separado a una muestra de medio de cultivo hasta conseguir valores de pH de 8.5, 9.5 y 10. Una vez en estos valores de pH se incubó en baño maria por un periodo de 2 horas a 37° C.

Mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida (Figura 14) fue posible observar que el medio de cultivo llevado a pH 8.5 con la solución de Carbonato de sodio/bicarbonato de sodio 0.5 M no solubilizó las proteínas, a pH de 9.5 solo una parte de las proteínas se observa soluble y fue hasta un pH de 10 que la proteína se encuentra completamente soluble. En cambio, la solución de Hidróxido de sodio en ninguno de los casos solubilizó las proteínas, incluso fue posible apreciar una aparente degradación de las proteínas a pH 10.

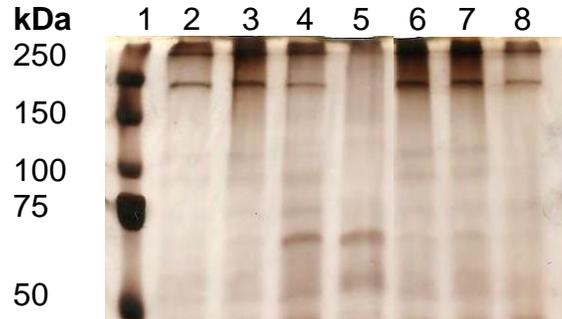


Figura 14. Análisis por SDS-PAGE del solubilizado de proteínas Cry utilizando carbonato de sodio/bicarbonato de sodio e NaOH.

Gel SDS-PAGE donde se analizó el solubilizado de las proteínas utilizando dos distintas soluciones de solubilizado: carbonato/bicarbonato de sodio (C/B) e Hidroxido de sodio (NaOH), llevando el pH del medio a 8.5, 9.5 y 10. (1) Marcador de peso molecular, (2) Medio cultivo sin tratamiento, (3) C/B pH 8.5, (4) C/B pH 9.5, (5) C/B pH 10, (6) NaOH pH 8.5, (7) NaOH pH 9.5, (8) NaOH pH 10.

Por otro lado, se observó que una vez solubilizada y activada la muestra bajo una concentración de 10 µg/ml de tripsina, al ajustarle el pH a 7 se presentó nuevamente la banda de aproximadamente 230kDa (Figura 15). Por tanto, se realizó una prueba bajo

distintas concentraciones de tripsina (10,20 y 30 $\mu\text{g/ml}$) para confirmar que no fuera toxina sin activar por falta de esta enzima. Sin embargo, a pesar del aumento en la concentración de 10 hasta 30 $\mu\text{g/ml}$, se presentó el mismo patrón.

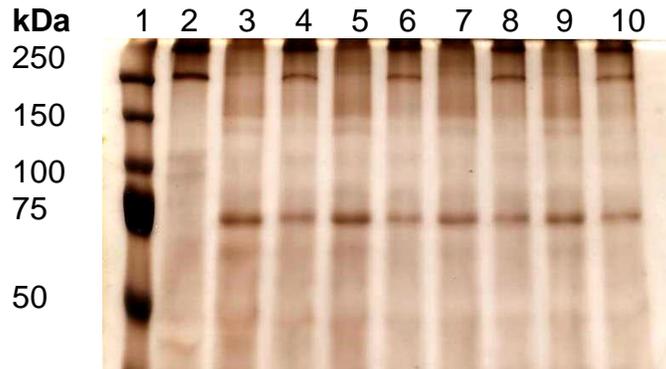
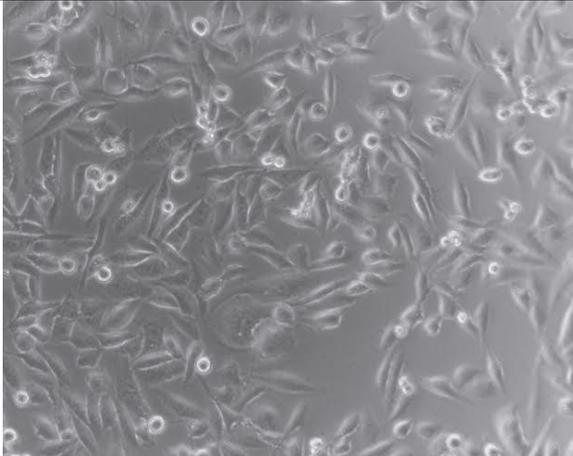
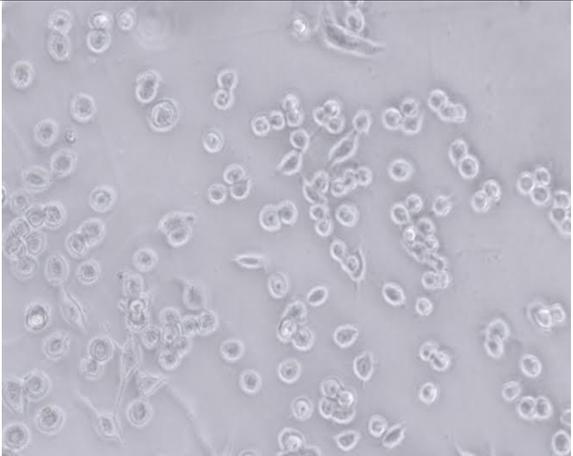


Figura 15. Análisis por SDS-PAGE del solubilizado y activado de proteínas Cry a diferentes concentraciones de tripsina y un posterior ajuste de pH.

Se solubilizaron y activaron las proteínas utilizando Bicarbonato/Carbonato de sodio 0.5 M llevando el medio a un pH aproximado de 10. El activado se efectuó bajo tres concentraciones finales de tripsina (10, 20 y 30 $\mu\text{g/ml}$). El cambio de pH a 7 después del activado se realizó adicionando HCl. Carriles: (1) Marcador de peso molecular, (2) Medio cultivo sin tratamiento, (3) Solubilizado, (4) Solubilizado y ajustado a pH 7, (5) Solubilizado y activado con 10 $\mu\text{g/ml}$, (6) Solubilizado, activado con 10 $\mu\text{g/ml}$ y ajustado a pH 7, (7) Solubilizado y activado con 20 $\mu\text{g/ml}$, (8) Solubilizado, activado con 20 $\mu\text{g/ml}$ y ajustado a pH 7. (9) Solubilizado y activado con 30 $\mu\text{g/ml}$ (10) Solubilizado, activado con 30 $\mu\text{g/ml}$ y ajustado a pH 7. El solubilizado en todos los casos se realizó llevando el medio a un pH aproximado de 10.

3.7 Ensayo de citotoxicidad *in-vitro*

Se analizó el efecto citotóxico de las proteínas Cry producidas y purificadas en este trabajo, en una línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231) en presencia y ausencia de dicha proteína. Se observó que después de 2 horas de aplicada la toxina a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$, la toxina presentó actividad citotóxica contra la línea celular cancerígena analizada (Figura 16).

	
MDA MB 231	MDA MB 231 + Toxina
<p>Figura 16. Análisis de la actividad citotóxica de las proteínas Cry producidas y purificadas en este trabajo.</p>	
<p>Imágenes de microscopía óptica a 10X de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. Del lado izquierdo se observan las células cancerígenas en ausencia de toxina, del lado derecho se observan las células después de 2 horas de agregada la toxina a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$.</p>	

Capítulo 4

Discusión

4.1 Composición del medio de cultivo

Para crecer *Bacillus thuringiensis* y producir mayores cantidades de delta endotoxinas, la composición del medio de cultivo es uno de los factores más importantes que se debe considerar. De su composición dependen factores como la represión catabólica relacionada con la síntesis de proteínas Cry. Este efecto se presenta cuando el medio contiene una alta concentración de glucosa u otras fuentes de carbono. Con respecto a la glucosa muchos estudios se han realizado y se recomienda mantener una concentración de 6-8 g/L. En el caso de este proyecto, el medio de cultivo que se sugiere está basado en el uso de almidón como fuente de carbono y según datos publicados por Zouari en 2007, el almidón presenta menor regulación represiva de la producción de toxina en comparación con la glucosa o el “Gruel”.

El pH es otro factor que también se ve afectado por los nutrientes que componen el medio de cultivo, ciertos nutrientes al ser metabolizados generan sustancias que provocan cambios drásticos en el pH del medio de cultivo. Un ejemplo claro es la peptona, que es utilizada comúnmente como una fuente principal de nitrógeno, sin embargo, en condiciones limitadas de carbohidratos *Bacillus thuringiensis* es capaz de desaminar algunos aminoácidos que la componen. Es decir, el grupo amino es removido de los aminoácidos y se libera como amoníaco, el resto del aminoácido está compuesto por carbonos e hidrógenos, por tanto, es utilizado por la bacteria para suplir las deficiencias del medio. Sin embargo, el problema es generado por el NH_3 liberado ya que ocasiona un aumento gradual en el pH.

El medio de cultivo SP está compuesto principalmente por peptona, extracto de carne y extracto de levadura. Ninguno de estos tres componentes es una fuente adecuada de carbono, y la liberación de amoníaco a lo largo de 96 horas generan que el cultivo alcance valores tan alcalinos como 9.25 de pH.

Este mismo patrón de aumento gradual de pH se presenta al utilizar glucosa u otros azúcares; en las primeras horas del cultivo se observa la disminución del pH, posteriormente se presenta un aumento gradual de pH por la producción de

compuestos nitrogenados, alcanzando valores cercanos a 8 en aproximadamente 30 horas y a 9 después de 50-60 horas de cultivo. (Luna-finkler & Finkler, 2012)

En cambio, en el crecimiento de la cepa utilizada en este trabajo, este problema fue solucionado utilizando almidón como fuente de carbono. Se obtuvieron valores de pH cercanos a 8 incluso después de 96 horas de cultivo. Además, esta fuente de energía ofreció mejores resultados en la producción de la delta endotoxina, ya que fue posible observar cristales de mayor tamaño dentro de la célula durante su proceso de esporulación.

Los resultados posiblemente se deben a que el almidón al ser una mejor fuente de carbono que la peptona, se metaboliza de manera lenta pero continua, ofreciendo la cantidad y disponibilidad de energía óptima para la síntesis del cristal proteico.

Como la producción de toxina se asocia con la esporulación, en muchos casos se han generado medios de cultivo basados en aumentar la cantidad de esporas, sin embargo, generalmente el recuento de esporas no es proporcional a la cantidad de toxina producida. Por ello, durante este proyecto no se consideró necesario el conteo de esporas, sino que se basó en la observación microscópica del cristal y en la presencia de la proteína en los geles de poliacrilamida.

Es importante señalar que de una variedad de *Bacillus thuringiensis* a otra y dependiendo de los tipos de proteína Cry que conforman un cristal proteico, son los nutrientes que la bacteria requiere. Por lo que el medio de cultivo que aquí se reporta puede no ser eficaz en la producción de otro tipo de proteínas Cry o en otra cepa en particular.

4.2 pH y acción de las proteasas

Se analizó la acción proteolítica del caldo de cultivo a las 60 horas mediante un ensayo en placas, con medio skim milk a diferentes valores de pH. Los resultados indicaron que durante el proceso de cultivo es importante mantener el medio de cultivo con un pH cercano a 7. Se observó que a medida que el pH es más alcalino, la acción de las proteasas es mayor. Sin embargo, en las placas con 5 g/L de NaCl el halo de degradación fue considerablemente menor para todos los valores de pH en comparación a las placas con 0.5 g/L de NaCl. Además, no se observó efecto en el

crecimiento de la bacteria a ninguna de estas concentraciones de sal, pero sí es evidente un efecto supresor de las proteasas (Figura 8).

En cambio, el pH del medio de cultivo sí puede afectar el crecimiento de *Bacillus thuringiensis*, en las placas con pH de 7 y 8 no se apreció una diferencia significativa en los crecimientos, pero a un pH de 9 fue evidente el menor crecimiento de la bacteria (Figura 8).

El medio SP después de 96 horas de cultivo alcanzó un pH de 9.25, tomando en cuenta los resultados comentados anteriormente se puede suponer que el crecimiento es reducido y que la acción proteolítica en el medio es mayor. Al analizar una muestra en una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, se observó un patrón de bandeo correspondiente a las proteínas Cry activas, sin haberle agregado solución de solubilizado y/o tripsina. Estas observaciones llevaron a la conclusión de que el pH alcalino alcanzado en este medio posibilitó el solubilizado del cristal y favoreció el activado de la toxina por medio de las proteasas producidas por la propia bacteria. Este efecto puede ser conveniente desde el punto de vista que se evita el paso de solubilizar y activar adicionando ciertos reactivos, sin embargo, la toxina está expuesta a ser degradada al mantenerse por un periodo prolongado de tiempo bajo esas condiciones de cultivo. Al considerar los trabajos de Brar en el 2004 y 2005, donde informó que en un medio de cultivo semi sintético basado en harina de soya y lodos de aguas residuales con un pH de 7.0, al ser almacenado por 1 mes a -20°C , presentó la misma toxicidad, al almacenarlo a 20°C hubo una disminución de aproximadamente 20-25% de su toxicidad. Pero al almacenarse a un pH de 4 y a 20°C por 1 año la toxicidad se mantuvo. Es evidente que bajo ciertas condiciones de pH y temperatura en el medio, durante un periodo prolongado de cultivo es posible que las proteínas de interés se degraden. A diferencia del medio SP, el medio compuesto de almidón presentó un pH menor. Al analizar el caldo de cultivo mediante SDS-PAGE no presentó las bandas con el peso molecular de la toxina activa, sin ser solubilizado previamente (Figura 11). Esto se debe a que el pH del medio de cultivo a base de almidón no es suficientemente alcalino para solubilizar el cristal. Además, basados en los resultados obtenidos en la Figura 11 se deduce una acción proteolítica menor.

El pH final del medio de cultivo de almidón es de 8.1, se podría suponer que regulando el pH a lo largo del proceso de cultivo contribuiría a dar mejores resultados, pero en un

trabajo realizado por Smith en 1982 se observó que los medios de cultivo a los cuales se les reguló el pH no mostraron mayor toxicidad, en comparación con los que se mantenían en un rango de pH de 5.7 a 8.1. Por ello, no fue necesario controlar el pH durante los procesos de producción en el medio de almidón. Sin embargo, la producción en pH controlado es una perspectiva a explorar próximamente.

4.3 Aireación

Se ha mencionado que la composición del medio de cultivo es un factor muy importante, pero de nada sirve sin una correcta oxigenación. De la oxigenación depende en gran medida la asimilación de los nutrientes por parte de *Bacillus thuringiensis* y por tanto, su crecimiento y el buen desarrollo de la espora y del cristal paraesporal. Algunos trabajos sugieren que la toxicidad máxima de los cultivos se observó a condiciones saturadas de oxigenación, y una actividad menor a condiciones interrumpidas. Esto a pesar de que a condiciones saturadas se ve una inhibición parcial de la esporulación. Sin embargo, existen reportes que afirman que en algunas subespecies de *B. thuringiensis* se han observado resultados diferentes, una mayor producción de delta endotoxina es observada bajo condiciones reducidas de oxigenación (Sarrafzadeh & Navarro, 2006).

En este trabajo, para estudiar el efecto de la oxigenación en la síntesis de la delta endotoxina se realizaron experimentos en un medio de almidón. Se variaron condiciones de aireación cambiando el volumen de medio de cultivo en los matraces. Se observó que la producción de toxina es mayor y con cristales de mayor tamaño a niveles bajos de aireación (1:1.5 aire-medio), en comparación con una aireación mayor (5:1 aire-medio). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Zouari en el 2007b, quien menciona que a valores elevados de oxígeno disuelto en los medios de cultivo, las densidades celulares aumentan pero los rendimientos de producción de proteínas Cry disminuyen. En este sentido las bacterias que fueron crecidas bajo condiciones deficientes de oxígeno disuelto en el medio, presentaron una mayor capacidad de producción de delta endotoxinas durante su proceso de esporulación.

Con respecto a la relación de la aireación y al tamaño del cristal existen pocos reportes, Scherrer en 1976 observó que a diferentes concentraciones de glucosa el tamaño de los cristales variaba ampliamente, obteniendo cristales pequeños (<0.5 μm de longitud)

a nula o poca concentración de glucosa (0-1 g/L) y cristales tan grandes como una espora (aprox. 2 μm de longitud) al utilizar valores de 6-8 g/L.

La variación en el tamaño del cristal ocurrió a pesar de que en todos los casos se cultivó en matraces Erlenmeyer de 500 ml con un volumen de 150 ml de medio de cultivo (3.5-1.5 aire-medio). Al analizar esos resultados es posible explicar cómo el oxígeno puede estar implicado, coincidiendo con los resultados obtenidos en los experimentos de este trabajo. Si se considera que el crecimiento celular continúa hasta que se ven agotados los nutrientes, al haber mayor cantidad de glucosa en el medio de cultivo se espera un mayor número de células vegetativas, por tanto, el consumo de oxígeno se eleva, al llegar a la etapa de esporulación por el agotamiento de recursos, los medios con poca glucosa tendrán poca biomasa y por lo tanto más oxígeno disponible para sus células en esporulación, lo que genera cristales de menor tamaño. En los cultivos con alta biomasa el oxígeno disponible por célula es menor y se producen cristales de mayor tamaño.

En un trabajo realizado por Mignone en 1992 se interrumpió una elevada aireación del medio inmediatamente después de que el cultivo llegó a la concentración máxima de biomasa y se observó que presentó valores de toxina bajos que eran comparables con cultivos crecidos a baja aireación, a pesar que el recuento de esporas fue el mismo que en los cultivos que presentaban altos valores de aireación. Es decir, la ausencia de oxígeno no interrumpe el proceso de esporulación una vez que se ha activado, pero sí se ve afectada la producción de delta endotoxinas al modificar las condiciones de aireación en esta etapa.

Al comparar los resultados de estos autores con los de este trabajo, se puede concluir que el proceso de producción del cristal está fuertemente relacionado con el oxígeno disponible para la célula, durante su etapa de esporulación.

4.4 Purificación de proteínas

La purificación de las proteínas Cry, en especial la separación del cristal de la espora, es uno de los pasos más complicados debido a la similitud de características físicas entre ambos.

Existen métodos de separación efectivos pero generalmente costosos y/o laboriosos, basados principalmente en la centrifugación en gradientes de densidad (centrifugación isopícnica). La generación de espuma en el medio de cultivo es otro método que ha sido reportado para separar cristales de esporas, se basa en la tendencia de las esporas por adherirse a las burbujas producidas en los procesos de aireación de un medio de cultivo. En los medios de cultivo de *Bacillus thuringiensis* la formación natural de espuma es muy común debido a la presencia de proteína en la composición de los medios de cultivo o su origen derivado del metabolismo o lisis celular. Además, esta bacteria está caracterizada por la producción de sustancias tensoactivas durante la etapa de transición a la fase estacionaria. En los cultivos realizados se presentó la producción de espuma durante varias etapas de su proceso de crecimiento, por ello se analizó una muestra de espuma mediante SDS-PAGE. Se observó una gran cantidad de proteína Cry presente en la espuma, lo que sugiere que los cristales producidos bajo nuestras condiciones de cultivo, presentan características superficiales por las que son atraídos por la espuma, descartando la posibilidad de utilizar esta técnica para su separación.

En cambio, el método de purificación que se empleó en este proyecto aprovecha la variación en el tamaño de los cristales como efecto de la aireación controlada. Al igual que en lo reportado por Scherrer (1973), se produjeron cristales pequeños con una longitud menor de 0.5 μm , lo que permitió emplear un filtro con una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm y de esta manera superar uno de los pasos más complicados de la purificación, la separación de la spora y el cristal proteico.

El segundo paso de la purificación consistió en remover las proteínas producidas por *Bacillus thuringiensis* que no corresponden a la proteína de interés. Esto se logró utilizando un filtro amicon de 100Kda, en el que eluyen las proteínas menores a 100kDa y son retenidas y concentradas las que se encuentran por arriba de este peso molecular, entre las que se encuentra nuestra toxina antes de ser activada. La muestra concentrada se solubilizó y se pasó a través de un filtro de 0.2 μm tras mechero para mantener las condiciones de esterilidad requeridas para ensayos de cultivo celular.

4.5 Solubilizado y Activado

Muchas proteínas Cry presentan una banda de aproximadamente 130 kDa que caracteriza a sus protoxinas. En los análisis realizados por SDS-PAGE no fue posible observar esta banda, en cambio, una banda de aproximadamente 230 kDa se observó. Pero en trabajos realizados por Holmes y Monro en 1965 basados en un análisis de difracción de Rayos X, llegaron a la conclusión que la inclusión paraesporal asimétrica observada por ellos en cultivos de *Bacillus thuringiensis* presentaba un peso molecular de 230,000 Daltons. Además, Huber en 1981 observó que se obtiene una proteína con un peso molecular de aproximadamente 230 kDa cuando el cristal es disuelto sin agentes reductores, como ditioneitol (Dtt) o mercaptoetanol. Pero que en la presencia de estos agentes se observa una banda con un peso molecular de 130kDa, lo que indica que la banda mayor podría deberse a un dímero. Estos datos sugieren que las bandas con un peso molecular de 230 kDa que se observaron en los geles, corresponden a las proteínas de interés antes de ser solubilizadas las muestras.

En este sentido, cuando se agregó la solución de solubilizado, la banda de 230 kDa desapareció y se generó una banda característica de la toxina activa, de aproximadamente 65-70 kDa, incluso sin haberle agregado tripsina. Esto indica que efectivamente la banda de 230 kDa corresponde a la toxina. Sin embargo, llama la atención que no es necesaria la adición de tripsina para obtener la toxina activa, lo que hace pensar en dos posibles explicaciones: (1) Es un dímero que al aumentar el pH se separa y las proteasas secretadas por la bacteria al medio de cultivo actúan rápidamente cortando y activando ambas protoxinas. (2) Se trata de un tetrámero conformado de toxina previamente activada por proteasas intracelulares producidas por la bacteria y que al aumentar el pH por la adición de la solución de solubilizado, se separan mostrando su forma activa.

Se llegó a la conclusión de que es un tetrámero debido a que las muestras que eran solubilizadas y que presentaban la toxina activa, si se les reajustaba el pH a 7, era posible observar nuevamente la banda de 230kDa y nunca la de 130 kDa. De ser un dímero, con el activado por medio de las proteasas se perderían aminoácidos tanto en el extremo N- como en el C- terminal. Es decir, no sería posible observar nuevamente la banda de 230 kDa una vez activada la proteína. En cambio, al ser un tetrámero de proteínas activas es posible que el tetrámero se separó debido a las condiciones

alcalinas que se presentan después del solubilizado y que al reajustar el pH a 7 se generen nuevamente las condiciones adecuadas para la interacción entre las toxinas y se forme el tetrámero. Además, se conoce que durante el mecanismo de acción de la toxina se forman estructuras oligoméricas que generan el poro en la membrana del insecto. Se ha calculado que el tamaño del poro es de aproximadamente 1-2 nm, lo que sugiere que puede estar formado por entre 4 y 6 monómeros de Cry1 (Bravo & Güereca, 1999). Por otra parte, Bravo y Güereca en 1999 reportaron que la proteína Cry3A existe únicamente como monómero a pH 10.5, y que forma agregados después de una incubación a pH 8.5.

4.6 Ensayo de citotoxicidad *in-vitro*

Se analizó el efecto de las proteínas Cry producidas y purificadas, en línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231) y una línea celular de queratinocitos humanos (HaCat), como control no canceroso. Se observó que al agregar la muestra de toxina activa producida y purificada bajo las nuevas condiciones, a una concentración de 1 µg/ml, se genera un efecto mayor que el observado utilizando la misma concentración de toxina activa, pero obtenida mediante los procesos utilizados en trabajos anteriores. El efecto es tal que únicamente fue necesario agregar una quinta parte de lo que anteriormente era utilizado por Mendoza (2011) y Nuñez (2013) para obtener la dosis letal media en un periodo de 2 horas.

Esto se debe a que al obtener proteínas mejor purificadas, la cantidad de proteínas cuantificadas corresponden en mayor medida a la proteína Cry, a diferencia de antes, que gran parte de las proteínas que se cuantificaban correspondía a otra clase de proteínas secretadas por *B. thuringiensis*, las cuales no presentan efecto citotóxico contra las líneas celulares de cáncer.

Conclusiones

En el medio de cultivo SP, la peptona al no ser una fuente primaria de carbono para *Bacillus thuringiensis*, libera compuestos nitrogenados que aumentan el pH del medio de cultivo. En cambio, el almidón es una mejor fuente de carbono y por lo tanto el pH aumenta gradualmente y en menor medida.

El crecimiento celular de *Bacillus thuringiensis* es adecuado a un pH cercano a 7, con un pH de 9 el crecimiento se ve fuertemente inhibido.

La actividad de las proteasas producidas por *Bacillus thuringiensis* es mayor a medida que aumenta el pH del medio de cultivo.

Una cantidad de 5 g/L de NaCl reduce considerablemente la acción de las proteasas sin afectar el crecimiento de la bacteria.

El proceso de producción del cristal está fuertemente relacionado con el oxígeno disponible para la célula durante su etapa de esporulación. Influye en gran medida en la producción y tamaño del cristal. A una menor aireación se obtiene un cristal de mayor tamaño, mientras que a una aireación mayor el cristal presenta un tamaño menor.

No es necesario el activado con tripsina, las proteasas producidas por *Bacillus thuringiensis* al ser crecido en el medio SP o en el de almidón, son capaces de activar las proteínas Cry.

La presencia de la proteína activa como monómero o tetrámero es dependiente del pH. A un pH menor de 8.5 se observan como tetrámero y a un pH superior a 10, las proteínas se separan y se observan como monómeros.

Las proteínas Cry producidas por la cepa de *Bacillus thuringiensis* utilizada, bajo las condiciones de cultivo planteadas en este proyecto, se encuentran en cantidades elevadas en la espuma que se produce de manera natural durante el proceso de cultivo.

Las proteínas Cry producidas y purificadas del medio a base de almidón, presentaron actividad contra líneas celulares de cáncer de mama.

Perspectivas

Escalar el cultivo a un bioreactor y controlar las condiciones de oxigenación y pH.

Analizar si las proteasas intracelulares generan una proteína del mismo tamaño y características que la obtenida utilizando exoproteasas, tales como la tripsina. Ya que un corte distinto puede ser el que genere la actividad insecticida y anticancerígena.

Analizar a fondo el estado en el que se encuentran las proteínas de interés a diferentes pH's. Si forman el tetrámero y cómo puede afectar esto en su efecto en las líneas celulares.

Probar si el medio y las condiciones de cultivo utilizadas con la cepa de *Bacillus thuringiensis* seleccionada, son efectivas con otras cepas donde también se ha observado la producción de cristales paraesporales con efecto insecticida y/o anticancerígeno.

Referencias bibliográficas

- Agaisse, H. & Lereclus, D. (1995) How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?. *Journal of Bacteriology*. 177(21), 6027-6032.
- Arcas, J., Yantorno, O., Arrarás, E. & Ertola, R. (1984) A new medium for growth and delta-Endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*. *Biotechnology Letters*. 6(8), 495-500.
- Aronson, A. (1995) The protoxin composition of *Bacillus thuringiensis* insecticidal inclusions affects solubility and toxicity. *Applied and environmental microbiology*. 61(11), 4057-4060.
- Avignone-Rossa, C. & Mignone, C. (1995) *Bacillus thuringiensis* Growth and Toxicity. *Molecular biotechnology*. 4(1), 55-71. doi: 10.1007/BF02907471
- Baum, J. & Malvar, T. (1995) Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Molecular microbiology*. 18(1), 1-12.
- Bibilos, M. & Andrews R. (1988) Inhibition of *Bacillus thuringiensis* proteases and their effects on crystal toxin proteins and cell-free translations. *Canadian Journal of Microbiology*. 34(6), 740-747.
- Bradford, M. (1976) A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
- Brar, S., Verma M., Tyagi R., Valéro J. & Surampalli R. (2005) Starch industry wastewater based stable *Bacillus thuringiensis* liquid formulations. *Journal of Economic Entomology*. 98(6), 1890–1898. doi: 10.1603/0022-0493-98.6.1890
- Brar, S., Verma M., Tyagi R., Valéro J., Surampalli R. & Banerji, S. (2004) Development of sludge based stable aqueous *Bacillus thuringiensis* formulations. *Water Science Technology*. 50(9), 229–236.
- Brar, S., Verma, M., Tyagi, R., Surampalli, R., Barnabé, S. & Valéro J. (2007) *Bacillus thuringiensis* proteases: Production and role in growth, sporulation and synergism. *Process Biochemistry*. 42(5), 773-790. doi: 10.1016/j.procbio.2007.01.015
- Bravo, A. & Güereca, L. (1999) The oligomeric state of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in solution. *Biochimica et biophysica acta*. 1429(2), 342-350.

Bravo, A., Likitvivatanavong, S., & Soberón, M. (2011) *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41(7), 423–31. doi:10.1016/j.ibmb.2011.02.006

Bulla, L., Bechtel, D. (1976) Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of bacteriology*. 127(3), 1472-81.

Bulla, L., Kramer, K. & Davidson L. (1977) Characterization of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of bacteriology*. 130(1), 375-383.

Escobar, J., Milena, E., Buitrago, G. y López L. (2004) Análisis exploratorio para la optimización de un medio de cultivo para la fermentación de *Bacillus thuringiensis*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 6(2), 43-53.

Federici, B., Hyun, P. & Sakano, Y. (2006) Insecticidal Protein Crystals of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology Monographs*, 1, 195-236. doi: 10.1007/7171_008

Filner, P., Sheng, Y., Brookes, A. & Carlson, K. (1989) Separation of protein crystals from spores of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 55(5), 1279-1281.

Hayakawa, T., Kanagawa, R., Kotani, Y., Kimura, M., Yamagiwa, M., Yamame, Y., Takebe, S. & Sakai, H. (2007) Parasporin-2Ab, a Newly Isolated Cytotoxic Crystal Protein from *Bacillus thuringiensis*. *Current microbiology*. 55(4), 278-83.

Höfte H, Whiteley H. (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*. 53(2), 242-255

Holmes, K., & Monro, R. (1965) Studies on the structure of parasporal inclusions from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Molecular Biology*. (14(2), 572-581.

Huber, H., Luthy, P., Ebersold H. & Cordier J. (1981) The subunits of the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*: size, linkage and toxicity. *Archives of Microbiology*. 129, 14-18.

Ibrahim, A. (2012) Evaluación de la bacteria transformada *Paenibacillus polymyxa*, que expresa la toxina Cry1C de *Bacillus thuringiensis*, como bioinsecticida y biofertilizante en algodón. (Tesis de Doctorado, Universidad de Córdoba). Recuperada de: <http://hdl.handle.net/10396/8135>

İçgen, Y., İçgen, B. & Özcengiz G. (2002a) Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and pH. *Research in microbiology*. 153 (9), 599-604.

İçgen, Y., İçgen, B. & Özcengiz G. (2002b) Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II. Effects of carbon and nitrogen sources. 153 (9), 605-609.

Jung, Y., Mizuki, Y., Akao, T. & Coté, J. (2007) Isolation and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* strain expressing a novel crystal protein with cytotoxic activity against human cancer cells. *Journal of applied microbiology*. 103(1), 65-79. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03260.x

Kumar, S. & Venkateswerlu, G. (1997) Involvement of an endogenous metalloprotease in the activation of protoxin in *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 42(5), 901-908.

Kumar, S. & Venkateswerlu, G. (1998a) Endogenous protease-activated 66-kDa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* active against *Spodoptera littoralis*. *FEMS microbiology letters*. 159(1), 113-120.

Kumar, S. & Venkateswerlu, G. (1998b) Intracellular proteases in sporulated *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and their role in protoxin activation. *FEMS microbiology letters*. 166(1), 377-382.

Kurt, A., Ozkan, M. & Özcengiz, G. (2005) Inorganic phosphate has a crucial effect on Cry3Aa d-endotoxin production. *Letters in Applied Microbiology*. 41, 303–308. doi: 10.1111/j.1472-765X.2005.01776.x

Lereclus, D., Agaisse, H., Grandvalet, C., Salameitou, S. & Gominet, M. (2000) Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *International journal of medical microbiology*. 290(4), 295-299. doi: 10.1016/S1438-4221(00)80024-7

Luna-Finkler, C., Finkler, L., (2012) *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* to Insect Control: Process Development of Small Scale Production to Pilot-Plant-Fermenters. *Insecticides-Advances in Integrated Pest Management*, 27, 613-626. doi: 10.5772/28501

Mazmira, M., Ramlah, S., Rosfarizan, M., Ling, T. & Ariff A. (2012) Effect of saccharides on growth, sporulation rate and delta-endotoxin synthesis of *Bacillus thuringiensis*. *African Journal of Biotechnology*. 11(40), 9654-9663.

Mendoza, G. (2011) Aislamiento y caracterización de toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* con actividad citócida sobre células de cáncer cervicouterino *in vitro* e *in vivo*. (Tesis de Doctorado) Centro de Investigación Científico y de Educación Superior de Ensenada.

Mendoza, G., Portillo, A., Arias, E., Ribas, R. & Olmos, J. (2012) New combinations of cry genes from *Bacillus thuringiensis* strains isolated from northwestern Mexico. *International Microbiology*. 15, 209-216. doi: 10.2436/20.1501.01.174

Mignone, C., Arcas, J. & Avignone-Rossa, C. (1992) *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and delta-endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 8, 301-304.

Morales, C. (1988) Producción de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* y su actividad en *Aedes aegypti linnaeus* y *Culex pipiens quinquefasciatus say*. (Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León). Recuperada de: <http://eprints.uanl.mx/2074/1/1080074555.PDF>

Nickerson, K. & Ang, B. (1978) Purification of the protein crystal from *Bacillus thuringiensis* by zonal gradient centrifugation. *Applied and environmental microbiology*. 36 (4), 625-626.

Núñez, A. (2013) Aislamiento y caracterización de toxinas de *bacillus* sp que inhiban la proliferación y migración de líneas celulares de cáncer a través de la inactivación de la vía PI3K/AKT. (Tesis de Maestría, Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada, Baja California). Recuperada de: <http://www.biblioteca.cicese.mx>

Olmos, J., Bañuelos, E. y Mendoza, G. (2012) Proteínas Cry insecticidas de *Bacillus thuringiensis* con actividad anticancerígena. PCT (Solicitud de patente). Número de publicación internacional: W0 2012/080985 A2.

Olmos, J., Bolaños, V., Causey S., Ferrari, E., Bolivar, F. & Valle, F. (1996) A functional Spo0A is required for maximal aprE expression in *Bacillus subtilis*. *FEBS Letters*. 381, 29-31.

Prieto, D., Vázquez, R., Ayra, C., González, J. and Riva, G. (1997) *Bacillus thuringiensis*: from biodiversity to biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 19, 202–219. doi: 10.1038/sj.jim.2900460

Sabbour, M., Abdel-Hakim, E. & Abdou, W. (2012) Role of some additives in enhancing the formulation of bacteria *Bacillus thuringiensis* against *Phthorimaea operculella* and *Helicoverpa armigera*: 2- Chemical additives. *Journal of Applied Sciences Research*. 8(5), 2640-2649.

Saraswathy, N. & Kumar, P. (2004) Protein engineering of δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 7(2), 180-190.

Sarrafzadeh, M. & Navarro, J. (2006) The effect of oxygen on the sporulation, δ -endotoxin synthesis and toxicity of *Bacillus thuringiensis* H14. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 22, 305–310. doi: 10.1007/s11274-005-9037-9

Sarrafzadeh, M. (2012) Nutritional requirements of *Bacillus thuringiensis* during different phases of growth, sporulation and germination evaluated by Plackett-Burman method. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 31(4), 131-136.

Sauka, D. & Benintende, G. (2008) *Bacillus thuringiensis* : generalidades . Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de microbiología*, 40, 124-140.

Scherrer, P., Luthy, P. & Trumpi B. (1973) Production of delta-Endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a function of glucose concentrations. *Applied Microbiology*. 25(4), 644-646.

Smith, R. (1982) Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Canadian Journal of Microbiology*. 28(9), 1089-1092.

Takebe S., Morinaga, S., Mizuhashi, A. & Komano, T. (2005) Improved technique for refining the crystal of *Bacillus thuringiensis* by NaBr Gradient Centrifugation. *Proceedings of the 6th Pacific Rim Conference on the biotechnology of Bacillus thuringiensis and its environmental impact*. Victoria BC. 111-112.

Thomas, W. & Ellar, D. (1983) *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal delta-endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Journal of cell science*. 60, 181-197.

Venkateswerlu, G. & Reddy, Y. (2002) Intracellular proteases of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and a protease-deficient mutant Btk-q. *Current microbiology*. 45(6), 405-409. doi: 10.1007/s00284-002-3767-9

Wakisaka, Y., Masaki, E. & Nishimoto Y. (1982) Formation of crystalline delta-endotoxin or Poly-3-Hydroxybutyric acid granules by asporogenous mutants of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and environmental microbiology*. 43(6), 1473-1480.

Yul, R., Choi, J., Li, M., Jin, B. & Je, Y. (2007) *Bacillus thuringiensis* as a Specific, Safe, and Effective Tool for Insect Pest Control. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 17(4), 547-559.

Zhang, L., Qiu, S., Huang, T., Huang, Z., Xu, L., Wu, C., Gelbic, I. and Guan, X. (2013) Effect of Chemical Additives on *Bacillus thuringiensis* (*Bacillales* : *Bacillaceae*) Against *Plutella xylostella* (Lepidoptera : *Pyralidae*). *Journal of Economic Entomology*, 106(3), 1075-1080.

Zouari, N., Ghribi, D., Trabelsi, H. & Jaoua, S. (2007b) Improvement of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin production by overcome of carbon catabolite repression through adequate control of aeration. *Enzyme and Microbial Technology*. 40(4), 614-622. doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.05.015

Zouari, N., Ghribi, D., Trigui, W. & Jaoua, S. (2007a) Use of sea water as salts source in starch- and soya bean-based media, for the production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides. *Process Biochemistry*. 42(3), 374–378. doi: 10.1016/j.procbio.2006.09.006

ANEXO 1

Tinción con verde de Malaquita

Protocolo:

1. Colocar en un portaobjetos para microscopio con pocillos de reacción, 5 μ l de cultivo y fijar mediante calor.
2. Cubrir la muestra con 1 o 2 gotas de verde de malaquita al 5%
3. Colocar sobre un recipiente con agua hirviendo, para que el portaobjetos se caliente mediante los vapores del agua.
4. Lavar con abundante agua y esperar a que seque.
5. Cubrir la muestra con 1 o 2 gotas de Safranina 0.5% por 2 minutos.
6. Lavar con abundante agua y esperar a que se seque.
7. Observar en el microscopio con el objetivo de inmersión.

ANEXO 2

Tinción con Nitrato de Plata.

Solución de Fijación:

50% Metanol

10% Ácido acético

40% Agua

Solución decolorante:

5% Metanol

7% Ácido acético

88% Agua

Solución de revelado:

0.5 ml de formaldehído al 37% por litro de solución.

3% Carbonato de sodio.

Protocolo:

1. Colocar el gel de poliacrilamida en un recipiente de vidrio o de polietileno y agregar 100 ml de solución de fijación. Agitar lentamente en un agitador orbital por 30 minutos a temperatura ambiente.
2. Descartar la solución de fijación. Agregar solución decolorante y agitar lentamente durante 30 min.
3. Descartar la solución decolorante. Cubrir el gel con 50ml de glutaraldehído al 10% y agitar lentamente por 10 min. (Realizarlo únicamente en campana)
4. Descartar el glutaraldehído. Lavar el gel con varios cambios de agua durante un periodo de 2 horas.
5. Descartar el agua. Añadir 100 ml de la solución de nitrato de plata 0.1% y agitar lentamente por 30 minutos.
6. Descartar el nitrato de plata y enjuagar rápidamente con agua y posteriormente con una pequeña cantidad de solución de revelado.

7. Agregar 100 ml de solución de revelado y agitar lentamente hasta que se observe el nivel de tinción deseado.
8. Detenga el proceso de tinción agregando 5 ml de Ácido cítrico 2.3 M y agitar lentamente durante 10 min.
9. Retirar la solución y lavar con varios cambios de agua agitando lentamente por un periodo de 30 minutos.
10. Fotografíar o escanear el gel.