



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE MORELOS**

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

**PRODUCCIÓN DEL COMPLEJO ESPORA_S-LAYER DE LA
CEPA GP543 DE *Bacillus thuringiensis* EN CULTIVOS A
ALTA DENSIDAD CELULAR**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES

AREA: BIOINGENIERIA

CAMPO: CONTROL BIOLÓGICO

P R E S E N T A

CALEB CASTILLO LORMENDEZ

Director:

Dr. Guadalupe Peña Chora.

Codirector:

Dr. Manuel Fernández Ruvalcaba.

Cuernavaca, Morelos

Febrero del 2020



**PRODUCCIÓN DEL COMPLEJO ESPORA_S-LAYER DE LA CEPA GP543
DE *Bacillus thuringiensis* EN CULTIVOS A ALTA DENSIDAD CELULAR**

Contenido

Contenido.....	i
Índice de Cuadros	iv
Índice de Figuras	v
Nomenclatura	ix
Variables y constantes de bioingeniería	ix
Variables y contantes biológicas	x
Capítulo I.....	1
Introducción.....	1
Capítulo II.....	3
Antecedentes.....	3
2. 1 Generalidades de <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
2. 2 Producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> mediante fermentación	10
2. 3 Aislamiento y selección de la cepa GP543 de <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
2. 3 Purificación e identificación de la proteína S-layer contenida en el cuerpo paraesporal de la cepa GP543.....	17
2. 4 Evaluación a nivel de establo de la cepa GP543 de <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
2. 5 Justificación	19
Capítulo III.....	21
Hipótesis de trabajo.....	21
3. 1 Objetivo general.....	21

3. 2 Objetivos particulares	21
Capítulo IV	37
Resultados.....	37
4. 1 Identificación molecular de la cepa GP543 mediante el gen marcador <i>gyrB</i>	37
4. 2 Análisis BLAST de la secuencia de nucleótidos del gen <i>gyrB</i> de la cepa GP543 ...	37
4. 3 Análisis filogenético de la cepa GP543 gen <i>gyrB</i>	38
4. 4 Análisis del perfil proteico de la cepa GP543 en geles de SDS-PAGE.....	39
4. 5 Cultivo de la cepa GP543 de <i>Bacillus thuringiensis</i> a nivel de matraz	40
4. 6 Caracterización cinética de la proteína toxica de la cepa GP543 en fermentador	41
4. 7 Caracterización de la cepa GP543 de <i>Bacillus thuringiensis</i> en fermentador.....	42
4. 8 Cultivo de la cepa GP543 de <i>Bacillus thuringiensis</i> en altas densidades celulares.	45
4. 9 Evaluación de los factores que influyen en la acumulación celular de la cepa GP543 de <i>Bacillus thuringiensis</i>	49
4. 10 Selección de un grupo homogéneo en peso de las muestras de <i>Rhipicephalus microplus</i>	62
4. 11 Evaluación de la actividad toxica del complejo espora-proteína S-layer en concentraciones múltiples producida en fermentador.	63
4. 12 Efectos pos tratamientos sobre el potencial reproductivo de <i>Rhipicephalus microplus</i>	64

4. 14 Evaluación de la actividad toxica del complejo espora-proteína producida en fermentador a diferentes tiempos de cultivo.....	66
4 14 Selección de un grupo homogéneo en peso de las muestras de <i>Rhipicephalus microplus</i>	66
Capítulo V	69
Discusión	69
5. 1 De la Identificación molecular de la cepa GP543.....	69
5. 2 Del Análisis filogenético de la cepa GP543 gen gyrB	70
5. 3 Del Análisis del perfil proteico de la cepa GP543 en geles de SDS-PAGE	70
5. 4 De la Caracterización cinética de la proteína toxica de la cepa GP543 en fermentador	71
5. 5 Del Cultivo de la cepa GP543 de <i>Bacillus thuringiensis</i>	71
XI Literatura citada	77

Índice de cuadros

	Página
Cuadro 2.1. Diferentes criterios de cambio de escala en tanques geoméricamente similares con medio y propiedades físicas constantes ($N_{Re} > 10^4$, $N_p = \text{Constante}^*$; Quintero, 1990). Error! Marcador no definido.	
Cuadro 2.2. Antecedentes de parámetros de <i>Bacillus thuringiensis</i> en fermentador.	12
Cuadro 2.3. Producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> en varios tipos de fermentadores.....	13
Cuadro 2.4. Origen de las cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> , aisladas de cadáveres de artrópodos y utilizadas sobre <i>Rhipicephalus microplus</i> . Laboratorio de Parasitología Vegetal, CIB UAEM.	15
Cuadro 2.5. Porcentaje de identidad de los péptidos obtenidos de la cepa GP543 al compararlos con proteínas S-layer de <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Bacillus cereus</i>	17
Cuadro 2.6. Porcentaje de control por etapa de desarrollo de <i>Rhipicephalus microplus</i>	18
Cuadro 5.1. Fuente de carbono necesaria por litro en diferentes volúmenes iniciales.	46
Cuadro 5.2. Parámetros cinéticos obtenidos en matraz y biorreactor con diferentes medios.....	48

Cuadro⁹5.3. Parámetros cinéticos obtenidos en matraz y biorreactor con diferentes medios.....	59
Cuadro¹⁰5.4. Tabla de distribución de pesos de <i>Rhipicephalus microplus</i>	62
Cuadro¹¹5.5. Patogenicidad del complejo espora-cristal de la cepa GP543 de <i>Bacillus thuringiensis</i> sobre <i>Rhipicephalus microplus</i> . ¡Error! Marcador no definido.	
Cuadro¹²5.6. Patogenicidad, inhibición de la oviposición y potencial reproductivo causado por el complejo espora-proteína S-layer de la cepa GP543 de <i>Bacillus thuringiensis</i> sobre <i>Rhipicephalus microplus</i> ¡Error! Marcador no definido.	
Cuadro¹³5.7. Tabla de distribución de pesos de <i>Rhipicephalus microplus</i>	67
Cuadro¹⁴5.8. Patogenicidad del complejo espora-cristal de la cepa GP543 de <i>Bacillus thuringiensis</i> sobre <i>Rhipicephalus microplus</i>	68
Cuadro¹⁵5.9. Patogenicidad del complejo espora-cristal de la cepa GP543 de <i>Bacillus thuringiensis</i> sobre <i>Rhipicephalus microplus</i> . ¡Error! Marcador no definido.	

Índice de figuras

	Página
Figura 2.1 Bioensayo por inmersión para evaluar la patogenicidad de los cristales de la cepa GP543 de <i>Bacillus thuringiensis</i> sobre <i>Rhipicephalus microplus</i> (modificado de Adames, 2010)	16

Figura₂5.1. Cinética de crecimiento de biomasa (a), producción de proteína (b), pH (c), densidad óptica (d), producidas por *Bacillus thuringiensis* en matraces de 500 mL en medio GYS y P/V aproximado de 0.25 W/L.40

Figura₃5.2. Correlación entre las variables biomasa y absorbancia, producidas por *Bacillus thuringiensis* en matraces de 500 mL y P/V aproximado de 0.25 W/L.**¡Error! Marcador no definido.**

Figura₄5.3. Geles de SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes. Biomasa (a), sobrenadante (b), producidas por *Bacillus thuringiensis* muestras obtenidas de la cinéticas de crecimiento en matraces de 500 mL en medio GYS y P/V aproximado de 0.25 W/L.**¡Error! Marcador no definido.**

Figura₅5.4. Cinética de crecimiento de biomasa (a), producción de proteína (b), pH (c), producidas por *Bacillus thuringiensis* en matraces de 500 mL en medio HCT y P/V aproximado de 0.25 W/L.**¡Error! Marcador no definido.**

Figura₆5.5. Cinética de crecimiento de biomasa (a), producción de proteína (b), pH (c), producidas por *Bacillus thuringiensis* en un fermentador de 5L de medio GYS.**¡Error! Marcador no definido.**

Figura₇5.6. Cinética de crecimiento de biomasa, producidas por *Bacillus thuringiensis* en un fermentador de 5L de medio GYS.**¡Error! Marcador no definido.**

Figura₈5.7. Simulación de la cinética de crecimiento en biomasa producidas por *Bacillus thuringiensis* en un fermentador lote alimentado de 5L con medio GYS.47

Figura₉5.8. Simulación de la cinética de crecimiento en biomasa producidas por *Bacillus thuringiensis* en un fermentador tipo lote de 3 L con

medio HCT enriquecido con 10 g de glucosa y alimentado con 2 L de solución saturada de glucosa.61

Figura₁₀5.9. Cinética de crecimiento de biomasa, producidas por *Bacillus thuringiensis* en matraces de 500 mL y 100 mL de medio GYS enriquecido con 0, 3, 4, 8 g de extracto de levadura.49

Figura₁₁5.10. Cinética de crecimiento de biomasa producida por *Bacillus thuringiensis* en matraces con 50 mL de medio GYS enriquecido con 0, 0.1, 0.2,0.5, 1, 4, 8 g de casaminoácidos.....53

Figura₁₂5.11. Cinética de crecimiento de biomasa, producidas por *Bacillus thuringiensis* en matraces con 100 mL de medio HCT enriquecido con 5 y 10 g/L de glucosa.**¡Error! Marcador no definido.**

Figura₁₃5.12. Cinética de crecimiento de biomasa, producidas por *Bacillus thuringiensis* en matraces con 100 mL de medio GYS enriquecido con 0.1, 0.2, 0.5, 1 g/L Triptófano.56

Figura₁₄5.13. Cinética de crecimiento de biomasa, producidas por *Bacillus thuringiensis* en matraces con 100 mL de medio GYS enriquecido con 0.1, 0.2, 0.5, 1, 4 g/L Peptona.....60

Figura₁₆5.6. Distribución normal en peso de *Rhipicephalus microplus*.63

Figura₁₇5.7. Distribución normal en peso de *Rhipicephalus microplus*.**¡Error! Marcador no definido.**

Nomenclatura

Variables y constantes de bioingeniería

A	= Coeficiente angular de la tendencia a lineal corresponde a (α).
F	= Caudal ($L \cdot h^{-1}$)
G	= Concentración del sustrato limitante final del biorreactor Fed-Batch (g)
K_{La}	= Coeficiente volumétrico de transferencia de masa (h^{-1})
K_s	= Constante de saturación, que se obtiene cuando $\mu = 0.5 \mu_{max}$ ($g \cdot L^{-1}$)
m	= velocidad específica de consumo de sustrato para mantenimiento celular (g sustrato/g célula h)
M	= Masa (g)
N_{Re}	= Numero de Reynolds (adimensional)
N_p	= número de potencia (adimensional)
Q	= Productividad ($g \cdot Lh^{-1}$)
rpm	= Revoluciones por minuto
S	= Concentración del sustrato ($g \cdot L^{-1}$)
S_o	= Concentración del sustrato inicial ($g \cdot L^{-1}$)
S_R	= Concentración del sustrato en el tanque de alimentación ($g \cdot L^{-1}$)
T	= Temperatura ($^{\circ}C$)
t	= Tiempo (h)
t_d	= Tiempo de duplicación (h)
vvm	= Volumen de aire por volumen de líquido
V_o	= Volumen inicial o final del biorreactor en Batch (L)
V_f	= Volumen final del biorreactor Fed-Batch (L)
X	= Concentración celular ($gDW \cdot L^{-1}$, peso seco)
X_o	= Concentración inicial de células ($gDW \cdot L^{-1}$, peso seco)
X_f	= Concentración final de células ($gDW \cdot L^{-1}$, peso seco)
Y	= Rendimiento celular
$Y_{x/s}$	= Rendimiento de biomasa sustrato [$\Delta X / \Delta S$]
$Y_{p/s}$	= Rendimiento de biomasa sustrato [$\Delta P / \Delta S$]
Y	= Rendimiento por unidad de sustrato ($g \cdot g^{-1}$)
OD	= Oxígeno disuelto ($mg \cdot L^{-1}$)
P	= Potencia ($W \cdot L^{-1}$)
ppm	=Partes por millón
μ	= Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})
μ_{max}	= Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})
α	= Constante de producción asociada con la duplicación (Luedeking & Piret, 1959)

β = Constante no asociada con el crecimiento celular (Luedeking & Piret, 1959)

Variables y contantes Biológicas

CL₅₀ =Concentración Letal Cincuenta ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)

Inter Clas= Intervalo de clases

n = Número de los individuos de la muestra de *Rhipicephalus microplus*

Num Clas= Numero de clases en los que se divide el peso de la muestra de *Rhipicephalus microplus*

PQlt =Peso de las hembras del lote experimental (mg)

PHLt =Peso los huevos del lote experimental (mg)

PHLT =Peso los huevos del lote control (mg)

Ran = Rango de pesos de los individuos de la muestra de *Rhipicephalus microplus* (mg)

W_{max} = El mayor peso de los individuos de la muestra de *Rhipicephalus microplus* (mg)

W_{min} = El menor peso de los individuos de la muestra de *Rhipicephalus microplus* (mg)

% I.O. = Porcentaje de inhibición a la oviposición

% I.P.R.=Inhibición del potencial reproductivo

Capítulo I

Introducción

Globalmente las garrapatas y las enfermedades que transmiten son uno de los principales problemas de salud animal en las explotaciones de ganado bovino, causan pérdidas económicas que van de los 2,000 a 3,000 millones de dólares norteamericanos y se estima que cerca del 80% del ganado bovino del mundo está infestado con garrapatas (Suárez *et al.*, 2007). Anualmente se invierten 7,000 millones de dólares aproximadamente para su control y en México la inversión en la campaña nacional contra la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* del 2002 al 2009 fue de más de 327 millones de pesos (Bull *et al.*, 1996; SAGARPA-SENACICA, 2013).

R. microplus (Acari: Ixodidae) es un ectoparásito hematófago que ocasiona diversos daños al ganado bovino, entre los que destacan la pérdida de sangre, lo que repercute en una pérdida de 25 a 60 kg por cabeza cada año, disminución en la producción de leche entre 15 a 20% anual, daños del 5 a 10% en la piel y abortos. Además, provoca tóxicosis, parálisis en animales y humanos debido a la presencia de sustancias tóxicas que inocular al momento de parasitar al hospedero. Es un vector que trasmite enfermedades tales como la anaplasmosis, causada por bacterias intraeritrocíticas obligadas y la babesiosis, causada por protozoarios intraeritrocíticos (Almazán *et al.*, 2010; Peter *et al.*, 2005; Yeruham *et al.*, 1998; Cooper y Robertson, 1974).

Con la intención de controlar a *R. microplus* se emplean diversos métodos: mecánicos, vacunas y acaricidas químicos (arsenicales, clorinados, organofosforados, carbamatos, piretroides y amidinas) entre otros. Sin embargo, el empleo masivo e irracional de los ixodicidas químicos han causado efectos nocivos como la aparición de cepas resistentes a uno o varios de estos acaricidas; en México, se han reportado cepas resistentes hasta a tres productos químicos (Soberanes *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Alonso y Acosta, 2004). Aunado

a esto, la alta residualidad, bioacumulación y la alta toxicidad para especies no blanco, generan un alto impacto ecológico. Por otro lado, es importante mencionar que la campaña nacional para el control de la garrapata en México, ha avanzado lentamente por estos factores (SAGARPA-SENASICA 2013).

En este sentido resulta de gran interés la producción de nuevos complejos activos para el control de aquellos organismos que han perdido sensibilidad a los productos químicos. Una de las alternativas es *Bacillus thuringiensis* (Bt) que ha mostrado ser altamente efectiva en el control de insectos plaga de importancia agrícola y de insectos vectores de enfermedades humanas (Schnepf *et al.*, 1998; Federici, 2005), sin embargo, su aplicación sobre el parásito *R. microplus* ha sido poco estudiada. La cepa GP543 de Bt ha mostrado actividad tóxica sobre *R. microplus*, la actividad tóxica se ha atribuido a una proteína del tipo S-Layer (Adames, 2010).

En esta investigación nos interesó la producción de esta proteína S-Layer. La producción de Bt en biorreactor, ha sido motivo de múltiples estudios a escala de laboratorio e industrial, sin embargo, solo se ha realizado con un pequeño número de cepas que sintetizan proteínas del tipo Cry, por lo que en este estudio nos enfocamos a la proteína de superficie producida por la cepa silvestre GP543.

Capítulo II

Antecedentes

2. 1 Generalidades de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Rhipicephalus microplus es un artrópodo ectoparásito hematófago de la familia ixodidae, de la familia de ácaros conocidos comúnmente como garrapatas, es una garrapata dura ya que posee un escudo dorsal (scutum) de quitina, se puede observar su aparato bucal (capitulum) con base hexagonal, la placa espiracular es redonda, los pedipalpos son pequeños y los machos poseen placas adanales y accesorias, el surco anal está ausente o poco definido en las hembras y poco visible en los machos. Su principal hospedero es el ganado bovino y es el parásito que causa más pérdidas económicas, daño a las explotaciones bovinas a nivel mundial y aun que ataca a este preferentemente, también puede parasitar a otros animales domésticos, salvajes e incluso ocasionalmente al humano (Nava *et al.*, 2017; FAO, 1998). Las garrapatas son ectoparásitos que transmiten una variedad de microorganismos patógenos más que cualquier otro artrópodo. *Rhipicephalus microplus* transmite la babesiosis (parásitos protozoarios *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*) y la anaplasmosis (*Anaplasma marginale*). Con una alta tasa de reproducción se han vuelto una plaga en los animales que disminuye la producción y daña la salud animal.

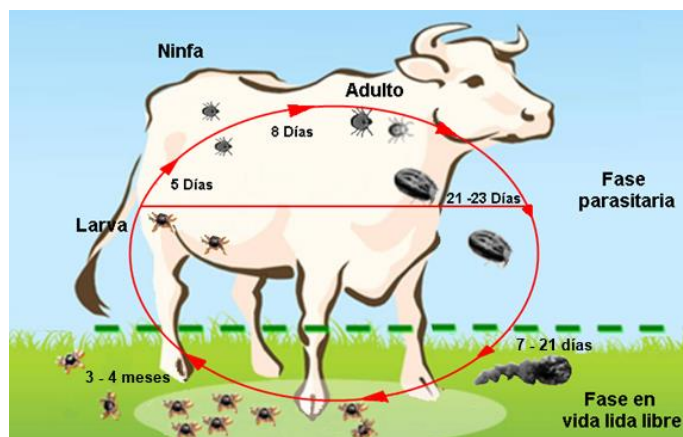


Figura 1. ciclo biológico de la garrapata *Rhipicephalus microplus*.

La **Figura 1** muestra el ciclo biológico de *R. microplus*, este se caracteriza por la utilización de un solo hospedero con dos etapas: la fase parasítica (larva, ninfa y adulta) que se llevan a cabo sobre el bovino, la larva se alimenta de la sangre del bovino y muda a ninfa y posteriormente a adulta. Los machos y hembras copulan, la hembra grávida se desprende y cae al suelo e inicia la fase no parasítica. Cada hembra repleta (**Figura 2**) oviposita entre 2500 a 3500 huevos, la tasa de eclosión que depende de la temperatura y humedad.



Figura 2. Hembra repleta de *Rhipicephalus microplus*

El control químico basado en compuestos como los piretroides y organofosforados de forma inadecuada (aplicaciones preventivas, dosis erróneas, desconocimiento de los estadios de desarrollo, etc.) ha favorecido la selección de cepas resistentes en poblaciones de *Rhipicephalus microplus*.

Se han reportado cepas de *Rhipicephalus microplus* resistentes a los compuestos químicos más usados, como: organoclorados, organofosforados, carbamatos, formamidinas, piretroides y lactonas macrocíclicas, en países con diferencias climáticas, culturales y económicas tales como: Australia, Brazil, Colombia, Ethiopia, India, Iran, Jamaica, Mexico, New Caledonia, Tanzania, US, Venezuela, Zambia, Zimbabwe Entre otros (Abbas *et al.*, 2014).

En México Fernández-Salas *et al.*, (2012) reportaron la presencia de una población multiresistente de *Rhipicephalus microplus* a organofosforados, piretroides sintéticos, amitraz y lactonas macrocíclicas, en una granja de estado de Veracruz. Se determinó

mediante dos tipos de bioensayos con la prueba de impregnación en sobre para larvas y con bioensayos de inmersión para las hembras repletas. Esta población de *Rhipicephalus microplus* es resistente todos los acaricidas ensayados mostrando una relación de resistencia: clorpirifos (1%), diazinón (24.2%), flumetrina (92.8%), deltametrina (94.2%), cipermetrina (98.0%), amitraz (1,5%) y ivermectina (99%).

Los mecanismos fisiológicos más estudiados son: la desintoxicación metabólica y la insensibilidad del sitio activo, que pueden inducir a resistir diversas familias de ixodicidas (Baffi *et al.*, 2007). Los mecanismos de desintoxicación metabólica se llevan a cabo entre otros por las enzimas carboxilesterasas (CarbE) o por enzimas del citocromo p450. Estas enzimas tienen una función importante en el metabolismo y la detoxificación de muchos xenobióticos, Las enzimas CarbE tienen actividad serina-hidrolasas que cataliza la hidrólisis de los enlaces ésteres y amidas, es una enzima poco específica por lo que degrada diversas familias de piretroides (plaguicidas) o sustancias endógenas (Singh y Rath, 2014).

Con respecto a la insensibilidad de sitio activo, se ha generado una fuerte presión de selección por la inmersión de ganado bovino en tanques con ixodicidas como los organofosfatos (George, 1997), que es una práctica de control común que mata a todos los individuos sensibles, pero al mismo tiempo favorece la aparición de individuos con genotipos que lograron mutaciones en el sitio activo, disminuyendo la sensibilidad al compuesto químico. Esta podría ser la principal causa de resistencia de la garrapata *R. microplus*. El sitio blanco de los acaricidas organofosforados es la acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7), es una enzima que termina el efecto neurotransmisor de la acetilcolina y pertenece al grupo de las enzimas denominadas colinesterasas (ChEs) (Sánchez-Chávez y Salceda, 2008).

2. 2 Clasificación taxonómica de *Rhipicephalus microplus*

En México, hay reportadas al menos 82 especies de garrapatas que parasitan a los animales domésticos y animales salvajes. Entre estas especies, *Rhipicephalus microplus* (anteriormente conocida como *Boophilus microplus*) es responsable de las pérdidas económicas en sistemas de producción bovina por parasitismo (Higa *et al.*, 2020). También se puede encontrar en diversos huéspedes, entre ellos el ganado bovino, búfalos, caballos, asnos, cabras, ovejas, ciervos, cerdos, perros y algunos animales silvestres. Se distribuye a nivel mundial en las regiones tropicales y subtropicales, es endémica de Asia e India.



Figura 3. Hembra repleta de *Rhipicephalus microplus* (Ramírez, 2017).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la garrapata *Rhipicephalus microplus*.

Phylum: Artropoda

Sub-phylum: Chelicera

Clase: Aracnida

Grupo: Parasitiformes

Orden: Acarina

Sub-orden: Ixodoidea (garrapatas duras)

Familia: Ixodidae

Género: Rhipicephalus

Especie: *Rhipicephalus microplus* (Adaptado de Cordero *et al.*, 1999)

2. 3 Generalidades de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es el agente de control biológico más exitoso. Es una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta, móvil, formadora de esporas y cuerpos de inclusión, se diferencia por su capacidad entomopatógena. Se han aislado e identificado cientos de cepas provenientes de diversos nichos, tales como suelos, insectos, hojas de plantas, telarañas entre otros, se considera una bacteria ubicua. El factor más conocido que determina la toxicidad es la presencia de proteínas con actividad insecticida (δ -endotoxinas), las cuales actúan en un amplio rango de órdenes de insectos, tales como Lepidópteros, Coleópteros, Dípteros, Himenópteros, Ortópteros y Malófagos, así como algunos organismos como Nemátodos y Protozoos (Beegle y Yamamoto, 1992; Feitelson *et al.*, 1992).

Las δ -endotoxinas están contenidas en cuerpos de inclusión cristalinos paraesporales, la mayoría se sintetizan durante la fase de esporulación; varían en su estructura, su modo de acción y están separadas en dos familias de proteínas las Cry y las Cyt. Las proteínas Cry son las más abundantes, que por su toxicidad y aplicación son las más estudiadas, en el caso de las Cyt estas están presentes en cepas con actividad contra mosquitos. Sin embargo, en algunos casos se ha demostrado la presencia de otras proteínas producidas durante la fase vegetativa (VIP, β -exotoxinas y S-layer), estos factores de virulencia presentan sinergia con las proteínas Cry (Lereclus *et al.*, 1996).

Peña y colaboradores en el 2006 reportaron la cepa GP1 de Bt, que produce una proteína contenida en cuerpos de inclusión, la proteína es del tipo S-layer. Esta proteína está involucrada en la toxicidad contra el coleóptero *Epilachna varivestis*; las proteínas S-layer, a diferencia de las proteínas cry, se sintetizan solo durante la fase vegetativa del crecimiento celular y al igual que las proteínas cry, cristalizan en un cuerpo de inclusión.

Las proteínas S-layer se encuentran en la superficie de muchas bacterias como estructuras cristalinas proteicas. Las proteínas S-layer cumplen diversas funciones, pudiéndose encontrar como soporte estructural de membrana (exoesqueleto), pueden estar

involucradas en el transporte de iones o macromoléculas, en el reconocimiento de otras células y pueden participar como factor de virulencia en algunas bacterias patógenas, o proteínas tóxicas en algunas cepas entomopatógenas (Engelhardt, 2007; Peña *et al.*, 2006; Sara y Sleytr, 2000). La cepa GP543, que ha mostrado actividad tóxica sobre hembras repletas de *R. microplus*, tiene la característica particular de que no produce proteínas cry, solo la proteína S-layer. Para la producción de proteínas S-layer esto resulta interesante, ya que el tiempo de síntesis proteica es igual al del crecimiento exponencial, por lo tanto, un proceso que incremente el tiempo de síntesis podría permitirnos alcanzar una alta concentración de este compuesto activo. Un proceso tipo lote alimentado resulta una opción viable con este fin.

2. 4 Identificación a nivel de especie de la cepa GP543 mediante la amplificación del gen marcador *gyrB*

Bacillus thuringiensis, *B. anthracis*, *B. cereus* y otras especies del género *Bacillus* están estrechamente relacionadas en su secuencia del gen marcador 16S rRNA, por lo que es poco eficiente para la diferenciación a nivel de especie. Aún más, filogenéticamente son indistinguibles entre sí a través los análisis de secuencia de 16S rRNA con las diferentes matrices de cálculo incluyendo la más empleada el modelo Neighbor-Joining. La identificación a nivel de especies es imperante ya que para aplicaciones en campo se requiere inocuidad, como *B. anthracis*, que es el agente causante de la enfermedad humana del ántrax; *B. cereus*, un patógeno alimentario capaz de causar enfermedades humanas y *B. thuringiensis* es un bionsecticida bien caracterizado e inocuo (La Duc *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 1999).

Una alternativa es diferenciar entre especies mediante sus características fenotípicas. *B. acillus anthracis* se puede separar de *B. cereus* en función de la actividad hemolítica y la presencia de dos plásmidos de virulencia que codifican para toxinas, *B. mycoides* presenta

crecimiento rizoide en agar sangre, La característica principal de *B. thuringiensis* es la formación de una inclusión cristalina de proteínas insecticidas durante la esporulación lo que la diferencia de *B. cereus*, estos cristales proteicos al igual que muchas características se encuentran en plásmidos que son trasferibles, cuando las cepas pierden sus plásmidos, se vuelven indistinguibles. En caso *B. thuringiensis* al perder su plásmido contenedor del gen *cry* es difícil de distinguirla de *B. cereus*.

Un gen marcador capaz de diferenciar de forma rápida y con precisión entre especies del género *Bacillus* aun cuando están estrechamente relacionadas es el gen *gyrB* que codifica para la proteína ADN girasa subunidad B, un ADN topoisomerasa de tipo II. En múltiples reportes se ha observado que puede diferenciar entre especies de este género lo que lo convierte en un gen marcador confiable, de diagnóstico molecular.

La Duc *et al.* (2004) caracterizaron filogenéticamente varias especies y serotipos incluidos los del género *Bacillus* comparando la secuencia del gen marcador 16S rRNA, el gen marcador *gyrB* contra la hibridación DNA:DNA. Determinando que el gen *gyrB* mostró ser altamente diferencial más que el gen marcador 16S rRNA. Sin embargo, aun cuando se determine la especie mediante sondas basadas en 16S rRNA o en genes *gyrB* para la discriminación entre cepas de *B. cereus* y *B. thuringiensis* sería más confiable detectar la presencia de cristales proteicos (Chen y Tsen, 2002).

Yamada *et al.* (1999) analizaron las secuencias de nucleótidos del gen *gyrB* de *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* y *B. anthracis* en busca de un método de identificación de *B. cereus* en arroz. Los cebadores degenerados para el PCR, UP-1 y UP-2r (Cuadro 2), para la amplificación del gen de la subunidad B de la ADN girasa (*gyrB*) se diseñaron utilizando secuencias consenso (aminoácidos) de las girasas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* y *B. subtilis*. Además, tienen secuencias en el extremo 5' que permiten la secuenciación directa proporcionando un sistema rápido y conveniente para la identificación bacteriana y el análisis taxonómico.

Cuadro 2. Primer's para amplificar el gen *gyrB*.

UP-1	5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNNGGNGNAARTTYGA-3'	1260 pb	Yamamoto y
UP-2r	5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCNCRCRCNGTCAT-3'		Harayama 1999

2. 5 Producción de *Bacillus thuringiensis* mediante fermentación

Bacillus thuringiensis, con el 57% de la producción mundial de bioinsecticidas es por mucho el mejor agente de control biológico que más se comercializa (Travis *et al.*, 2012). Las serovariedades de importancia industrial son *morrison*, *kustaki* e *israeliensis*, que por su batería de proteínas tóxicas son letales para su hospedero, y se producen en procesos de alto rendimiento o bajos costos. Intentando incrementar los rendimientos de las proteínas δ -endotoxinas, con el objetivo de disminuir los costos de producción se han explorado una gran cantidad de sustratos como medios de cultivo comerciales, alternativos y residuos industriales entre otros; aplicados en sustratos superficiales, sólidos o semisólidos y en medios líquidos sumergidos o superficiales.

La selección y optimización de los medios de cultivo para un microorganismo es el primer cambio de escala biotecnológico, que regularmente se realiza en matraz, por la facilidad de experimentar y analizar diversas condiciones, sin embargo, reproducir estas condiciones en fermentadores de laboratorio es difícil (Galindo, 1996). En este sentido, las fermentaciones en biorreactor tipo tanque agitado ofrecen un proceso estable al mantener controladas condiciones como pH, temperatura y oxígeno disuelto, con lo que es posible alcanzar mayores concentraciones celulares, sin embargo, el cambio de escala requiere de mantener constante uno o varios criterios adimensionales (**Cuadro 3**), con lo que es posible obtener resultados similares en cada cambio de escala.

Cuadro 3. Diferentes criterios de cambio de escala en tanques geoméricamente similares con medio y propiedades físicas constantes ($N_{Re} > 10^4$, $N_p = \text{Constante}^*$; Quintero, 1990).

Criterio	Relación	
Potencia por unidad de volumen constante	$\frac{P}{V} \propto (N^3)B$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^{2/3}$
Flujo proveniente del impulsor por unidad de volumen constante	$\frac{Q}{V} \propto N$	$\frac{P_1}{P_2} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^5$
K_L Constante	$K_L \propto (ND)^{2\alpha-1}$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_2}{D_1}\right)^{2\alpha-1/\alpha}$
K_{La} Constante	$K_{La} \propto \left(\frac{P}{D^3}\right)^\alpha$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^{2/3}$
K_{La} Constante	$K_{La} \propto \left(\frac{P}{D^3}\right)^\alpha V_s^\beta$	$\frac{N_1}{N_2} \frac{\alpha_1}{\alpha_2} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^{\beta/3} \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^{2/3}$

* N_p = número de potencia, $\alpha \neq K$ $\beta = K$

Aunque existen muchos reportes de cultivos en biorreactor de *B. huringiensis* pocos son ejercicios de escalamiento y los criterios de escarmiento han sido poco explorados, de los antecedentes exitosos podemos mencionar a Muley *et al.* (1999) que empleo K_{La} 18 h⁻¹, para escalar de 50, 500 y 1200 L; Yezza *et al.* (2004) empleó una relación entre el K_{La} y Q/V , permitiéndole pasar de 50 a 150 L; Navarro *et al.* (2014) mediante modelado biodinámico predicen el crecimiento y la síntesis de metabolitos de interés. El **Cuadro 4** muestra varias fermentaciones en reactores tipo tanque agitado en lote, en el que podemos observar que no hay mucha variación en el rendimiento ($Y_{x/s}$) abarcando un rango de 0.3 - 0.4 g biomasa/g glucosa; aun cuando el uso de la fuente de carbono es muy similar en las diferentes cepas y condiciones de fermentación. La velocidad específica de crecimiento μ presenta variaciones en rango de 0.37 a 1.1 h⁻¹, de igual forma el rendimiento de proteína $Y_{cr/y}$ muestra una variación de más de un orden de magnitud en un rango de 0.01 - 1.19. Sin embargo, esto podría deberse a que diferentes cepas producen diferentes proteínas o grupos de proteínas en diferentes concentraciones ya sea por características particulares de cada cepa o posiblemente por factores de operación como OD el pH o la potencia transmitida por el fermentador P/V (Siqueira, 2011).

Cuadro 4 Antecedentes de parámetros de *Bacillus thuringiensis* en fermentador.

Biomasa	Cry	μ_{max}^a	$Y_{x/s}^b$	$Y_{cry/x}^c$	Referencia
5.6-20 g/L ^f	-----	0.58-0.8	0.3-0.7	-----	Amicarelli <i>et al.</i> (2009)
3.8x10 ⁸ CFU/cm ³ⁱ	1.043 g/L ⁱ	-----	-----	1.19	Dang <i>et al.</i> (2009)
0.87 g/L ^d					
8.5 – 15.9 g/L	-----	0.79-1.1	0.41-0.8	-----	Berbert-Molina <i>et al.</i> (2008)
1.65x10 ⁹ CFU/cm ³	2.67 g/L	-----	-----	0.7	Chang <i>et al.</i> (2008)
3.79 g/L ^d					
1.64-4.78 g/L	-----	-----	-----	-----	Prabakaran y Hoti (2008)
-----		0.58-0.8	0.37-0.7	-----	Atehortúa <i>et al.</i> (2007)
6.78 a 25.70 g/L	0.1-1.2 g/L	0.37-0.63	0.39-0.68	0.01 a 0.04	Navarro <i>et al.</i> (2006)
16 g/L	12.8 - 15.7 g/L	0.69-1.2	-----	0.8 a 0.98	Anderson y Jayaraman (2005)
0.34 a 1.02 g/L	-----	-----	-----	-----	Aslim <i>et al.</i> (2002)
-----	-----	0.81	2.25 ^e	-----	Popovic <i>et al.</i> (2001)
-----	-----	0.53	-----	-----	Rivera <i>et al.</i> (1999)
-----	0.36-2.66 g/L	-----	-----	-----	Farrera <i>et al.</i> (1998)
2.78-3.3 g/L	0.28-0.41 g/L	-----	-----	-----	Avignone-Rossa <i>et al.</i> (1995)
-----	-----	0.95	-----	-----	Holmberg y Sievänen (1980)

^aMáxima tasa específica de crecimiento (h⁻¹). ^bRendimiento de biomasa por glucosa ($Y_{x/s}^b$). ^cRendimiento de proteína Cry por biomasa (g Cry/g biomasa). Estos valores fueron calculados con la concentración de proteína y el valor de biomasa reportada en las publicaciones. ^dEste valor fue calculado considerando el peso de una célula de *B. thuringiensis* 2.3 pg (Rodríguez y de la Torre, 1996). ^eRendimiento de la biomasa para sustrato limitante. ^fEste valor fue calculado con la concentración de glucosa en el medio y el rendimiento de biomasa reportado por el autor.

En el **Cuadro 5** se muestran los valores de operación para fermentaciones con cultivos de *B. thuringiensis* en diversos biorreactores, en este resumen se muestran variaciones en las condiciones de operación, tales como: oxígeno disuelto, velocidad de agitación, pH, influencia de la fuente de carbono y nitrógeno, sales minerales y cómo influyen estas en las fermentaciones en laboratorio e industriales.

Bacillus thuringiensis es una bacteria aerobia estricta, por lo tanto, el suministro de oxígeno es uno de los factores que más se emplean para escalar, mediante un número adimensional ($k_L a$, coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno), el cual se mantiene constante de un volumen a otro. Este factor se ha reportado que a 5 % OD, el rendimiento en la esporogénesis aumenta y la síntesis de cristal decae; mientras que, a una concentración del

25 % OD la esporogénesis disminuye, pero la síntesis de cristal aumenta; aunado a esto se reportó un cambio en la toxicidad importante (Siqueira, 2011).

Cuadro 5. Producción de *Bacillus thuringiensis* en varios tipos de fermentadores

	Observaciones	wv (L)	vvm	rpm	Referencia
Tanque agitado	Cambios en la concentración de proteína y espora, aumento en la toxicidad por efecto del OD (OD% variable).	1.5	0.2-2	200-1100	Siqueira <i>et al.</i> (2011)
	Aumento en la toxicidad hasta alcanzar el 80% de mortalidad (OD % constante).	2	20% OD*	200-750	Khodair <i>et al.</i> (2008)
	Mismas concentraciones de espora y proteína al cambiar de escala ($k_L a$ y Q/V constante), 30 % mayor toxicidad que la observada en matraz.	15,150	0.3; 0.3-0.5	150, 500; 100-150	Yezza <i>et al.</i> (2005 ^a , 2005 ^b , 2004)
	Cambios en la concentración de proteína y espora, aumento en la toxicidad (5, 26, 70 OD, % de saturación).	1.6	----	500-1100	Kraemer y Moser, (1996)
	Aumentó la concentración de todos los nutrientes hasta 11 veces al inicio de la fermentación, incrementando la biomasa hasta el 7º aumento, donde los rendimientos caen.	3-6	0.5	500	Arcas <i>et al.</i> (1987)
Fed-Batch	Prueba dos métodos de alimentación el sustrato limitante (constante e intermitente), obteniendo mayores concentraciones de biomasa y espora en la alimentación intermitente.	2	2-3 ppm	----	Chul <i>et al.</i> (2001)
	Evalúa diferentes agentes de control de pH (NaOH/H ₂ SO ₄ ; NaOH/CH ₃ COOH NH ₄ OH/CH ₃ COOH; NH ₄ OH/H ₂ SO ₄) determinado que si influyen tanto en la actividad enzimática como en la concentración de proteína.	10	25 % OD*	500	Dang <i>et al.</i> (2009)

* El autor no reporta el valor de vvm, mantiene constante un valor de rpm y variable el flujo de oxígeno hasta alcanzar el valor deseado de oxígeno disuelto.

Se han realizado experimentos aumentando las concentraciones iniciales de nutrientes, sin embargo, aun cuando la concentración celular aumenta tiene $Y_{x/s}$ menores, y los costos aumentan, pero se observó que no hay una relación entre la fuente de carbono y la producción de los cuerpos paraesporales (Khodair *et al.*, 2008; Arcas *et al.*, 1987).

Un cultivo tipo lote alimentado representa una estrategia útil para incrementar la densidad celular, con base en la alimentación administrada del sustrato limitante del crecimiento celular, evitando la formación de metabolitos secundarios, en el cual las condiciones iniciales son las finales del cultivo en lote, con una solución de alimentación altamente concentrada para evitar la dilución del cultivo. Controlando con esto la velocidad específica de crecimiento (μ) y con ello aumentar la producción de proteína (Chul *et al.*, 2001).

Hasta la fecha no hay reportes de estudios enfocados en la producción de proteínas tipo S-layer en biorreactor, ni procesos que estén dirigidos a proteínas de superficie y qué estás cristalicen formado cuerpos de inclusión que se liberen al caldo de cultivo al final de la fermentación (lisis celular). Aunado a esto, se vuelve atractivo para llevar a escalas industriales un proceso de alta densidad celular que disminuya los costos de producción y aumente su valor agregado.

La cepa GP543 de *B. thuringiensis* que motiva éste estudio, es formadora de cuerpos de inclusión, que son cristales proteicos del tipo S-Layer. Si esta proteína se sintetiza durante la fase de crecimiento exponencial (duplicación vegetativa) (Peña *et al.*, 2006), podría representar una ventaja de producción realizarlo en un proceso Fed-Batch, ya que al aumentar el tiempo de la fase exponencial se aumentaría el tiempo de síntesis proteica.

La alta densidad celular obtenida en procesos Fed-Batch no solo implica un alto consumo de nutrientes y de oxígeno disuelto (este último es la limitación más común), sino también, la saturación del caldo de cultivo de productos de la fermentación no deseados (ácido acético). Aunado a esto, el CO₂ es muy soluble en agua y satura rápidamente el caldo de

cultivo, limitando la acumulación celular (Anderson *et al.*, 2002), por lo anterior es imperante establecer y estandarizar las condiciones de operación, en función de la producción de estas proteínas con actividad acaricida.

2. 6 Aislamiento y selección de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis*

Varias cepas de *B. thuringiensis* pertenecientes a la colección del Laboratorio de Parasitología Vegetal del Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEM fueron aisladas de diversos cadáveres de artrópodos (**Cuadro 6**), al ser sometidas a desafío contra *R. microplus* (Fernández *et al.*, 2010) se observó por primera vez la actividad contra este ectoparásito, este trabajo fue retomado por Adames en el 2010 y en esta ocasión se agregaron las cepas GP139 y GP543; los bioensayos fueron realizados por inmersión (Drummond y Whetstone, 1970).

Cuadro 6. Origen de las cepas de *Bacillus thuringiensis*, aisladas de cadáveres de artrópodos y utilizadas sobre *R. microplus*. Laboratorio de Parasitología Vegetal, CIB UAEM.

Cepa	Aislada de especie	Orden: Familia	Nombre común
GP123	<i>Epilachna varivestis</i>	Coleóptera : Coccinellidae	Conchuela del frijol
GP138	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Acari : Ixodidae	Garrapata común de perro
GP139	<i>Bemisia tabaci</i>	Hemíptera : Aleyrodidae	Mosquita blanca
GP140	<i>Tetranychus urticae</i>	Acari : Tetranychidae	Ácaro rojo, araña roja
GP543	<i>Rhipicephalus microplus</i>	Acari : Ixodidae	Garrapata común de bovinos

En estos bioensayos se empleó el complejo espora-cristal en concentraciones de 50 a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sumergiendo a hembras repletas durante cinco minutos. La mortalidad fue cuantificada en un periodo de 10 días. La cepa GP543 causó un 71.11 % de mortalidad a 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de espora cristal, siendo ésta la más activa de las cepas evaluadas.

Posteriormente, solo la cepa GP543 fue sometida a desafío con la intención de determinar si la patogenicidad observada es causada por los cristales proteicos, estos fueron purificados y solubilizados para probar diferentes concentraciones, desde 10 hasta 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y como control se usó agua, haciendo el conteo de mortalidad a los 8, 10, 12 y 14 días (Adames *et al.*, 2010), los resultados se muestran en la **Figura 4**.

En este bioensayo la concentración de 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ alcanzó un porcentaje de mortalidad del 62.2 % al día 14, siendo el porcentaje de mortalidad más alto; a los 14 días se incrementa notablemente el porcentaje de mortalidad para todas las concentraciones, incluso la concentración de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ que alcanza 35.5 % (Adames *et al.*, 2010).

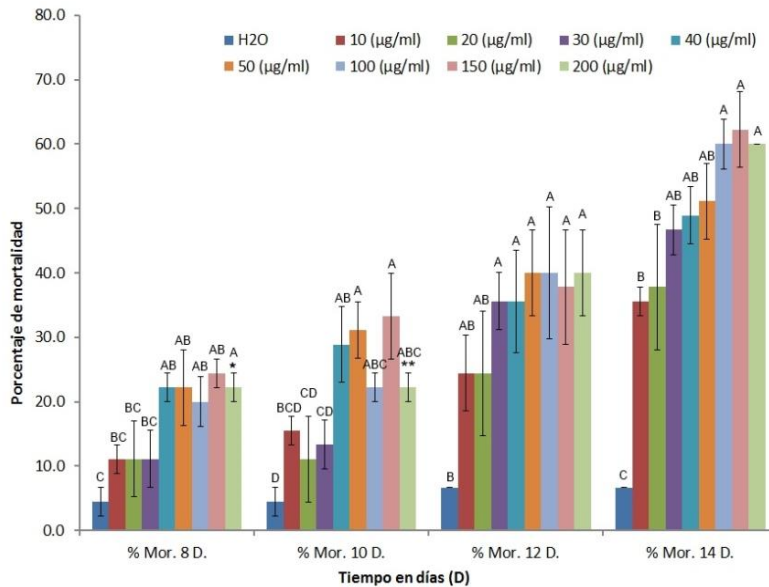


Figura 4 Bioensayo por inmersión para evaluar la patogenicidad de los cristales de la cepa GP543 de *B. thuringiensis* sobre *R. microplus* (Modificado de Adames, 2010).

2. 7 Purificación e identificación de la proteína S-layer contenida en el cuerpo paraesporal de la cepa GP543

Una vez determinada la toxicidad de la proteína que sintetiza la cepa GP543, fue necesario determinar la identidad de esta proteína, para lo cual se solubilizaron los cristales, la muestra se separó en un gel de poliacrilamida al 10%, cortando la banda mayoritaria de aproximadamente 100 KDa, se secuenció por medio de la técnica de espectrometría de masas (**Cuadro 7**).

La comparación de péptidos se realizó contrastando proteínas tipo S-layer de las cepas de *B. thuringiensis*, *B. Anthracis*, *B. cereus* contra los péptidos provenientes de la proteína de la cepa GP543, ya que por su peso molecular de 100 kd se esperaba que se tratase de una proteína tipo S-layer. Sin embargo, Bt es muy parecida filogenéticamente a *B. Anthracis* y *B. cereus* compartiendo el mismo nicho ecológico, diferenciándose únicamente por las proteínas activas que sintetizan (Anexo B). Este análisis muestra que todos los péptidos de la cepa GP543 presentan un 100% de identidad con la proteína S-layer de *B. thuringiensis* Cepa GP1 (GenBank # AAY28601.1 Peña *et al.*, 2006), por lo que podemos definir que se trata de una proteína tipo S-layer la responsable de la toxicidad, sin embargo, es necesario conocer la secuencia completa del gen, para determinar claramente si ésta es una proteína nueva (Adames *et al.*, 2010).

Cuadro 7. Porcentaje de identidad de los péptidos obtenidos de la cepa GP543 al compararlos con proteínas S-layer de *B. thuringiensis*, *B. Anthracis*, *B. cereus*.

ORGANISMO			
<i>B. thuringiensis</i> Cepa GP543	<i>B. thuringiensis</i> Cepa GP1	<i>B. anthracis</i> Cepa Ames	<i>B. cereus</i> Cepa 03BB102
PÉPTIDO	IDENTIDAD	IDENTIDAD	IDENTIDAD
1. DFALNSQNLVVGEK	100%	100%	85%
2. INIGTVLELEK	100%	100%	100%
3. LNDEKGNADVEYLNLDHDK	100%	95%	100%
4. SVNFKPVQTENFVEK	100%	100%	100%
5. VGQYGASPDTK	100%	90%	100%
6. NLDTPASAIK	100%	100%	100%

2. 8 Evaluación a nivel de establo de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis*

Ya demostrado *in vitro* que la proteína S-layer de la cepa GP543 tiene actividad sobre *R. microplus* se evaluó, a nivel de establo como prueba de factibilidad para aplicación en campo, para lo cual se sometió a desafío *in vivo* con bovinos infestados artificialmente con *R. microplus*, técnica estandarizada por el INIFAP (Romo, 2011).

Para este bioensayo *in vivo* se empleó la técnica de cámaras (Dowing *et al.*, 1977), la cual consiste en aislar con mangas de confinamiento zonas preestablecidas del bovino. Las cuales se infestaron con el ectoparásito consecutivamente con el objetivo de encontrar garrapatas en distintas fases de desarrollo (Osorio, 1989), así como dar seguimiento *in vitro* a los especímenes colectados postratamiento. Se aplicó el complejo espora-cristal en un volumen de 250 mL/cámara, se empleó agua y aceite mineral como testigo negativo y como testigo positivo Amitraz (ixodicida producido por síntesis química de uso común). Los efectos del complejo espora-cristal de la cepa GP543 sobre *R. microplus* se resumen en la **Cuadro 8**. En la cual se agrupan por estados de desarrollo del ectoparásito y muestra sus porcentajes de control como: la efectividad sobre la repleción (% E.R.) en la cual se cuentan los individuos que caen en las mangas después de la aplicación del tratamiento, inhibición de la oviposición (% I.O.) e inhibición del potencial reproductivo (% I.P.R.).

Cuadro 8. Porcentaje de control por etapa de desarrollo de *R. microplus* (tomado de Romo-Martinez, 2013).

Estadios	Tratamiento	Parámetros		
		% E.R.	% I.O.	% I.P.R.
Larva	Amitraz	100	100	100
	<i>B. thuringiensis</i>	98.02	0	99.99
	Emulsión de aceite mineral	0	26.52	40.42
Ninfa	Amitraz	100	100	100
	<i>B. thuringiensis</i>	98.99	53.98	99.99
	Emulsión de aceite mineral	30.72	5.13	44.8
Adultos	Amitraz	0	99.27	100
	<i>B. thuringiensis</i>	80.07	0	86.42
	Emulsión de aceite mineral	35.11	19.03	60.46

Bacillus thuringiensis muestra tener un alto control en el E.R.% para todos los estadios muy cercano al insecticida sintético, en las hembras repletas, aun cuando no impide la oviposición, si impactó en inhibición del potencial reproductivo al 100%.

El bioensayo a nivel de establo reafirma la efectividad de la cepa GP543, faltando evaluar su desempeño en campo. Para esto se requieren altos volúmenes de producto, en un proceso productivo estable, económico y con un producto de calidad controlada.

2. 9 Justificación

De los parásitos que más afectan la salud animal y que impactan económicamente las explotaciones pecuarias, se encuentra el ectoparásito *R. microplus* el cual tiene un alto índice reproductivo que lo vuelve una plaga. Aunado a esto, se han reportado cepas de este ácaro que ya presentan resistencia a uno o varios ixodicidas sintéticos. Por lo cual, es imperante desarrollar ixodicidas alternativos, amigables con el ambiente y que además sean activos hacia las diversas poblaciones de *R. microplus* que han desarrollado resistencia.

En este sentido *B. thuringiensis* ha mostrado ser efectiva contra *R. microplus*, presentando alta selectividad y un complejo mecanismo de acción, con lo que podría impedir o retrasar la aparición de cepas resistentes. El control que esta cepa ha mostrado sobre la repleción y el potencial reproductivo, colocan a la cepa GP543 como una alternativa para la generación de un novedoso ixodicida.

Sin embargo, para poder emplear a *B. thuringiensis* o las proteínas tipo S-layer como principio activo para el desarrollo de ixodicidas comerciales, hay que obtenerlas en cantidades masivas de forma controlada y económica. Para posteriormente ser evaluadas a nivel de campo. En este trabajo se plantea estandarizar el proceso de producción de *B.*

thuringiensis cepa GP543 bajo condiciones de alta densidad celular mediante fermentación en biorreactor tipo lote alimentado.

Este es un proyecto innovador que plantea por primera vez la producción de una proteína del tipo S-Layer en biorreactor tanque agitado, tampoco se ha reportado operando en altas densidades celulares. Aunado a esto, es la primera vez que se emplea una proteína del tipo S-layer con actividad toxica contra *R. microplus*.

Capítulo III

Hipótesis de trabajo

La proteína S-layer de la cepa GP543 de *B. thuringiensis* se produce durante la fase vegetativa y está asociada a la duplicación celular lo que permitirá medir los valores α y β de producción asociados a la duplicación celular de la ecuación de Luedeking-Piret.

3.1 Objetivo general

Caracterizar los valores cinéticos de crecimiento, producción, consumo de sustrato y emplearlos en un modelo logístico de crecimiento que permita resolver las ecuaciones de asociación de la producción a la duplicación celular que permitan el desarrollo de procesos de alto rendimiento.

3.2 Objetivos particulares

- A) Caracterizar los parámetros cinéticos y de producción del complejo espora-cristal de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis* en biorreactor de laboratorio tipo lote.
- B) Evaluar las constantes α y β de la ecuación de Luedeking-Piret mediante un modelo logístico de crecimiento y producción de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis*.
- C) Generar simulaciones que repliquen el comportamiento cinético de crecimiento y producción de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis* en biorreactor.
- D) Evaluar el efecto acaricida del complejo espora-cristal de los cultivos provenientes del proceso productivo estandarizado.

Capítulo IV

Materiales y Métodos

4.1 Microorganismo

Los experimentos se realizaron con la cepa GP543 de *B. thuringiensis*, una cepa silvestre de importancia veterinaria, resguardada en la colección del Laboratorio de Parasitología Vegetal del Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEM, la cual fue aislada de un cadáver de *R. microplus*.

4.2 Medios de cultivo

El microorganismo se cultivó en medio HCT con la siguiente composición en ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): KH_2PO_4 (3.4); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.0123); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.69×10^{-4}); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.4×10^{-3}); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.02); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.147); Glucosa (3); Triptona (4.5); Casa aminoácidos (1.79), para evitar precipitación de sales, este medio se prepara en 5 soluciones distintas, todas las fracciones se esterilizan por separado a 121 °C durante 15 minutos y se mezclan en campana de flujo laminar (Lecadet *et al.*, 1980).

El microorganismo se cultivó en medio GYS con la siguiente composición en ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): KH_2PO_4 (0.78); FeSO_4 (0.01); CuSO_4 (1×10^{-3}); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.015); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.0205); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2); K_2HPO_4 (1); Extracto de levadura (3); Glucosa (10), para evitar la precipitación de sales este medio se prepara en 5 soluciones distintas con agua estéril (almacenado en refrigeración), se mezclan y se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos (Rogoff y Yousten, 1969).

El microorganismo se activó y conservo en Luria-Bertani (L.B.) con la siguiente composición en ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): peptona (10); extracto de levadura (5); NaCl (10), se mezclan y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos (Difco, 1977).

4. 3 Inóculo

La preparación de los inóculos se realizó tomando una azada de un criotubo (glicerol-LB) que contiene la cepa GP543, se estrío en placa de Petri de 9 cm con LB sólido, se incubo durante 72 h; de esta placa se recuperó un tercio y se inoculo en un matraz de 250 mL con 100 mL de medio GYS y se incubo durante 18 h. Se tomó una muestra la cual se diluyo 1:10 y se realizó un conteo celular con la cámara de -Neubauer, se calculó cuantos mililitros se requieren para alcanzar 10^6 cel/ μL , el inoculo se calcula usando el 5% v/v.

4. 4 Identificación de especie mediante la amplificación del gen *gyrB*

Para la preparación del DNA total, se inoculo la cepa GP543 en una placa de Petri con medio LB y se incubo en condiciones estándar a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante una noche (overnight), se recuperaron 50 mg de biomasa en un microtubo de 1.5 mL y se purifico el ADN mediante el Kit de extracción de ADN genómico total (Easy-DNA™ de invitrogen, Ref. 45-0424). Posteriormente, se amplifico con la técnica de PCR el gen marcador *gyrB* (que codifica a la proteína ADN girasa subunidad B, un ADN topoisomerasa de tipo II) las condiciones de PCR utilizados se muestran en el **Cuadro 9**.

Cuadro 9. Cebadores y condiciones utilizadas en el PCR.

Cebadores	Gen	1 ciclo	34 ciclos			Final	Tamaño (pb)	Referencia
UP-1	<i>gyrB</i>	95°C	95°C	58°C	72°C	72°C	1260	Yamamoto y Harayama 1995
UP-2r		3 min	50 s	40 s	1:20 m	5 m		

4. 5 Cultivos en matraces

Los cultivos en matraz se realizaron con tres repeticiones independientes para el medio GYS y cuatro para el medio HCT, en matraces Erlenmeyer convencionales de 500 mL de volumen nominal conteniendo 100 mL de medio GYS o HCT, a una velocidad de agitación de 200 rpm, con una excentricidad 2.5 cm y 30 °C durante 71 h en una incubadora Barnstead-Lab-line modelo Max^Q 5000, se tomaron muestras cada 3 h para las determinaciones analíticas.

4. 6 Cultivos en fermentador

Los cultivos se realizaron en un fermentador de 7 L equipado con dos turbinas Rushton (diámetro del impulsor/diámetro del tanque= 0.4) con un volumen de trabajo de 5-L, el pH no se reguló. Las fermentaciones se corrieron con un flujo de aire constante (ambiental) de 0.8 vvm, a una velocidad de agitación de 300 rpm, llevando a cabo dos replicas, se tomaron muestras cada 3 h para las determinaciones analíticas.

4. 7 Cultivos en altas densidades celulares

Con el objetivo de alcanzar altas densidades celulares, se empleó un biorreactor de 7 L operando en lote con 3 L de medio GYS inicial y 0.8 vvm, 300 rpm a 30 °C, 2 horas antes de que el cultivo entro en fase estacionaria se alimentó de glucosa y otros nutrientes, con el objetivo de mantener la velocidad especifica de crecimiento $\frac{1}{2} \mu_{max} = 0.075 \text{ h}^{-1}$, esta se alimentó de forma exponencial, para los análisis y simulaciones del biorreactor operado en lote alimentado se empleó el siguiente modelo probado para *Bacillus thuringiensis* (Mignone *et al.*, 1993).

Es posible elegir diferentes condiciones de operación tanto las iniciales: V_0 , X_0 , S_0 (finales del lote), como caudales variables ($F = F(t)$), volumen de la concertación ($S_R = S_R(t)$); para simplificar la resolución de las ecuaciones se supuso que $F = \text{cte}$. Y $S_R = \text{cte}$, ; la **Figura 5**

muestra un biorreactor tanque agitado en el que se detalla las variables de operación iniciales (operando en lote y posterior en lote-alimentado).

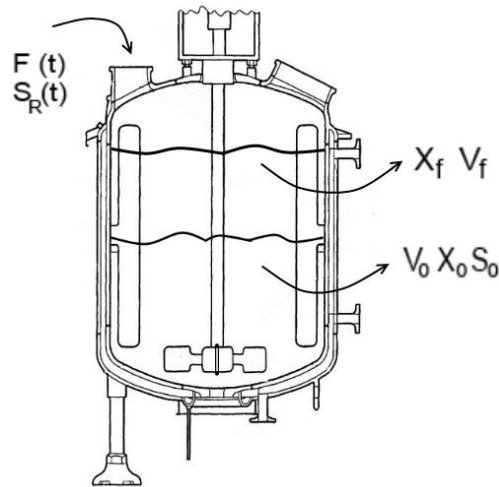


Figura 5 Variables de operación del biorreactor tipo lote y que son las iniciales del reactor lote-alimentado, en el biorreactor tanque agitado.

“Sustrato”

Acumulación = Suministro - Consumo

$$\frac{d(SV)}{dt} = FS_R - \frac{\mu XV}{Y_S \bar{X}}$$

Para un volumen constante

$$V \frac{d(S)}{dt} + S \frac{d(V)}{dt} = FS_R - \frac{\mu XV}{Y_S \bar{X}}$$

Para evitar acumular sustrato

$$S_0 = 0 \quad \text{y} \quad \frac{d(S)}{dt} = 0$$

“Biomasa”

$$\frac{d(XV)}{dt} = \mu XV = r_x V$$

$$r_x = \frac{1}{V} \frac{d(XV)}{dt}$$

$$FS_R = \frac{1}{V} \frac{d(VX)}{dt}$$

El valor de FS_R indica que la velocidad de acumulación de biomasa depende de la velocidad de alimentación de sustrato

De tal forma que:

$$XV = X_0 V_0 + \frac{Y_S}{\bar{X}} F S_R t$$

$$F S_R - \frac{\mu X V}{Y_S \bar{X}} = 0$$

Sí; $F = \frac{d(V)}{dt}$

Si suponemos que:

$$r_X = \mu X$$

Al integrar: $V = V_0 + Ft$

Al sustituir:

Donde r_X es la velocidad de producción de biomasa y que se ajusta a la velocidad de suministro de sustrato “modificable”

$$X = \frac{X_0 V_0}{Ft + V_0} + \frac{Y_S F S_R t}{Ft + V_0}$$

$$F S_R = \frac{r_X V}{Y_S \bar{X}}$$

Donde F debe respetar la siguiente

$$F S_R \leq \frac{\mu X V}{Y_S \bar{X}}$$

Con base en estas ecuaciones se puede calcular y diseñar el reactor lote alimentado, proyectando la concentraciones de biomasa final (X_f) y volumen final (V_f).

$$V_f - V_0 = Ft$$

Volumen total adicionado operando en reactor lote alimentado

$$t = t_f$$

Cuando

$$X_f V_f = X_0 V_0 + \frac{Y_X}{S} S_R F t_f$$

Al despejar S_R , encontramos la concentración de sustrato en el tanque de realimentación

$$S_R = (X_f V_f - X_0 V_0) / \left(\frac{Y_X}{S} - (V_f - V_0) \right)$$

Es posible que al inicio de la alimentación la μ sea igual a μ_{max} , por la glucosa residual en el caldo de cultivo. Las ecuaciones antes descritas no incluyen mantenimiento celular, que implica un gasto de la fuente de carbono, por lo que se empleará una estrategia de alimentación basa en la siguiente ecuación (Korz *et al.*, 1995; Seeger *et al.*, 1995).

$$G = \left[\frac{1}{Y_{X/S}} \mu_{set} + m \right] X_F V_F e^{[\mu_{set}(t-t_F)]}$$

Con la cual se puede calcular la concentración de reactivo limitante (G), basada en el gasto ($Y_{X/S}$) que es el rendimiento de biomasa por sustrato limitante, sumado al gasto por mantenimiento celular (m), multiplicado por los valores finales del reactor en lote como: biomasa final (X_F), volumen final (V_F) y tiempo final (t_F), de tal forma se puede plantear un tiempo final de fermentación para el cual calcular el sustrato limitante a un tiempo (t).

4. 8 Estimación de la biomasa por turbidimetría

Se tomó una alícuota de 1.0 mL del caldo de cultivo de los matraces, la cual se diluyó 1/10 con agua destilada, se homogenizó agitando vigorosamente en vortex (Fisher Scientific, Vortex Mixer), posteriormente se midió con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm (Mapada Instruments V-1200 Spectro). Los valores se usaron como una manera rápida para determinar el crecimiento bacteriano (Miranda, 1998).

4. 9 Determinación de la concentración de biomasa

La determinación de la concentración de la biomasa se realizó con un método gravimétrico en peso seco ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), se tomaron 10 mL a los cuales se les agregó 1 mL de EDTA (0.1 M) y 1 mL de NaCl (1.0 M) (Peña, 1998), se centrifugaron a 12,000 rpm (Spectra Fuse 16 M), se separó el sobrenadante, la biomasa (paquete celular) se lavó una vez más.

El paquete celular es suspendido en agua destilada y filtrada por vacío con una membrana taradas de $0.45\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro, posteriormente se secaron en un horno a $70\ ^\circ\text{C}$ durante 24 h, la diferencia de peso es el peso seco.

4. 10 Análisis del perfil proteico mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE

Las muestras desnaturalizadas con la mezcla lítica se cargaron en geles al 10% de poliacrilamida con sulfato dodecácil de sodio (SDS-PAGE). Las muestras se corrieron a 20 mA de corriente por cada gel hasta que el frente del colorante salió del gel. Las bandas proteicas se tiñeron con azul de comassie, el exceso de colorante se lavó con una solución de ácido acético:metanol:agua 10:10:80% v/v, posteriormente los geles se escanearon y el área e intensidad de las bandas se calcularon por densitometría de imagen.

4. 11 Cálculo de parámetros cinéticos y estequiométricos mediante un modelo logístico de crecimiento

Un modelo logístico simple se empleó para describir el crecimiento celular, con el objetivo de determinar con más precisión la velocidad específica de crecimiento, este modelo se

empleó para resolver las ecuaciones de producción y consumo de sustrato, mediante la siguiente expresión:

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \mu \max X \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right)$$

Donde:

$$\mu t = \ln \frac{X}{X_{max} - X} + \left(\ln \frac{X}{X_0} - 1 \right)$$

Integrando para $X_0 = X(t=0)$.

$$\mu t = \ln \frac{X}{X_{max} - X} + \left(\ln \frac{X}{X_0} - 1 \right)$$

Donde:

$$X^* = \frac{Xt}{X_{max}}$$

y (b) es el intercepto.

$$-b = \ln \left[\left(\frac{X_{max}}{X_0} \right) - 1 \right]$$

La velocidad específica de crecimiento (μ) fue calculada por regresión lineal de $(X^*/1-X^*)$ contra tiempo, el coeficiente angular de la tendencia lineal corresponde al valor de (μ).

4. 12 Modelo logístico de producción

La producción cinética fue evaluada por la ecuación de Luedeking & Piret (1959) que ha sido empleada exitosamente para describir cinéticas de producción de diversas bacterias (Luong

et al., 1988; Weiss y Ollis, 1980), donde, α es la constante de producción asociada con el crecimiento celular y β es la constante no asociada al crecimiento celular.

$$\frac{dp}{dt} = \alpha \frac{dN}{dt} + \beta N$$

El modelo logístico de crecimiento (X_t) fue remplazado en la expresión de Luedeking-Piret y después fue integrada, en la cual se tiene:

$$P_t = P_o + \alpha X_o \left[\frac{e^{\mu t}}{1 - \left[\left(\frac{X_o}{X_{max}} \right) (1 - e^{\mu t}) \right]} \right] + \beta \frac{X_{max}}{\mu} \ln \left[1 - \left(\frac{X_o}{X_{max}} \right) (1 - e^{\mu t}) \right]$$

Esta ecuación tiene tres parámetros (μ , α , β), (μ) fue descrita anteriormente y las condiciones iniciales como X_{max} , X_o y P_o . son:

$$\beta = \frac{\frac{\partial P}{\partial t}}{X_{max}}$$

Reorganizando

$$P_t - P_o - \beta B = \alpha A$$

En la cual (α) fue calculada por regresión lineal ($P_t - P_o - \beta B$) contra (A), el coeficiente angular de la tendencia a lineal corresponde a (α).

4. 13 Modelo logístico de consumo de sustrato

El consumo de sustrato cinético de glucosa fue evaluado por una modificación a la ecuación de Luedeking & Piret (1959), la cual evalúa tres variables crecimiento, producción y mantenimiento celular, como se muestra en la siguiente expresión:

$$\frac{\partial S}{\partial t} = \frac{\partial X}{Y_{S/X} \partial t} - \frac{\partial P}{Y_{S/P} \partial t} KeX$$

Empleando el producto de la ecuación:

$$\frac{\partial S}{\partial t} = - \left(\frac{1}{Y_{S/X}} + \frac{\alpha}{Y_{S/P}} \right) \frac{\partial X}{\partial t} - \left(\frac{\beta}{Y_{S/P}} + Ke \right) X$$

Remplazando e integrando:

$$S_o - St = \left(\frac{1}{Y_{S/X}} + \frac{\alpha}{Y_{S/P}} \right) (X - X_o) + \left(\frac{\beta}{Y_{S/P}} + Ke \right) \frac{Xmax}{\mu} \left\{ \ln \left[1 - \left(\frac{X_o}{Xmax} \right) (1 - e^{\mu t}) \right] \right\}$$

En la cual:

$$m = \left(\frac{1}{Y_{S/X}} + \frac{\alpha}{Y_{S/P}} \right) \quad n = \left(\frac{\beta}{Y_{S/P}} + Ke \right)$$

Y

$$n = \frac{\frac{\partial S}{\partial t} \text{ stationary}}{Xmax}$$

$$S_o - St - nN = m(X - X_o)$$

El valor de (m) fue calculado por regresión lineal de (S_o - St - nN) contra (X-X_o), el coeficiente angular de la tendencia lineal corresponde al valor de (m).

4. 14 Cuantificación de glucosa y metabolitos de fermentación por HPLC

La identificación y cuantificación de la glucosa y ácidos orgánicos se realizó mediante HPLC acoplado al detector de índice de refracción (IR) y al arreglo de diodos (UV), en una columna

HPX-87H con una fase móvil de H₂SO₄ 0.01 N con un flujo de 0.6 mL·min⁻¹ a una temperatura de 60 °C.

4. 15 Cuantificación de proteína total por Bradford y preparación de muestras para análisis por SDS-PAGE

Para calcular la proteína total se empleó como estándar albumina de suero de bovino de la cual se realizó una curva de calibración, con un rango de 2.5 a 20 µg. Se tomaron 10 muestras por cada repetición del experimento, una cada 3 h, y fueron procesadas de inmediato, de cada muestra se tomaron 50, 100, 200 µL los que se aforaron hasta 800 µL con H₂O destilada y se les adicionó 200 µL del reactivo Bradford, se agitó y tras 2 minutos se mide a 595 nm.

Para la preparación de muestras de SD-PAGE, se tomó una muestra de 1 mL del caldo de cultivo, esta se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se recuperó, teniendo entonces dos fracciones la biomasa y el sobrenadante.

A la biomasa, se le agregó 24 µL de agua destilada y 6 µL del buffer desnaturizante, esta mezcla se calentó a 98 °C durante 10 minutos, Se almacenó a -2°C para correr el gel de SDS-PAGE.

Al sobrenadante se le adicionó PMSF (concentración final de 1 mM/mL), posteriormente se agregó sulfato de amonio para alcanzar 40 % de saturación, se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante, a la capsula proteica se adicionó 24 µL de agua destilada y 6 µL del buffer desnaturizante, esta mezcla se calentó a 98 °C durante 10 minutos. Se almacenó a -2°C hasta que se corrió el gel de SD-PAGE.

La mezcla lítica contiene: 6 M Urea, 10% (v/v) β-mercaptanol, 10% (v/v) Tris-base 0.025 M (pH 7), 20% (v/v) glicerol, 4.6% (w/v) de SDS.

4. 16 Optimización de la concentración de biomasa de *Bacillus thuringiensis* mediante el método tendencia y máxima pendiente

Para observar la influencia de los diferentes factores (nutrientes) en la inmediata región de interés, se realizó un modelo de primer orden buscando la dirección de mayor respuesta (Box *et al.* 2008). El modelo general aplicado para “K” factores es:

$$\hat{y} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_KX_K$$

Para las variables medidas:

$$\Delta X_i = \frac{\beta_i}{\frac{\beta_j}{X_j}}$$

Para: $i= 1,2\dots, K \neq j$

4. 17 Optimización de la concentración de biomasa de *Bacillus thuringiensis* mediante el análisis de repuesta de superficie

Se empleó el módelo “diseño central compuesto” para optimizar la composición del medio cultivo para la producción de biomasa de la cepa GP543 de *B. thuringiensis*. Los experimentos se diseñaron utilizando el software Design Expert (State Ease Inc., Minneapolis, MN, USA). Los principales factores considerados por su correlación en la producción de biomasa son la triptona (X1), extracto de levadura (X2) y glucosa (X3).

Para un modelo factorial 2^3 diseñado con cuatro puntos axiales ($\alpha = \sqrt{3}$) y seis repeticiones ($n_0 = 6$) para un total de 20 experimentos que serán empleados en la optimización.

$$x_i = \frac{X_i - \bar{X}_i}{X_i}$$

Para: $i= 1, 2, 3\dots, K$

Donde x_i = es el valor adimensional de la variable independiente, X_i = valor real de la variable independiente, \bar{X}_i = valor real de la variable independiente en el punto central, ΔX_i = razón de cambio.

La matriz de cálculo y los niveles de las variables independientes elegidas para el estudio se muestran en la sección de resultados en unidades naturales de $g \cdot L^{-1}$, El análisis de regresión se realizó con el mismo software, que genero un polinomio que incluye todos los términos de interacción, se utiliza para calcular la respuesta pronosticada.

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{22} x_1^2 \dots \beta_K x_K^K$$

donde i = respuesta, x_1, x_2 y x_3 = variables independientes, β_0 = razón de cambio.

4. 18 Homogenización en peso de hembras repletas de *Rhipicephalus microplus*

Para tener una muestra homogénea en peso, se pesaron todas las hembras repletas, se seleccionaron los valores de mayor y menor peso: W_{max} y W_{min} , las restas de estos nos dan el rango (Ran), el intervalo en peso que presenta la muestra colectada.

$$Ran = W_{max} - W_{min}$$

Para poder dividir este rango (Ran) en bloques y homogenizar la población, se calculó el número de clases de acuerdo con el número de la muestra (n).

$$Num\ Clas = 1 + 3.32 * LOG(n)$$

El ancho de los bloques o intervalo de clase, se calculó dividiendo el rango entre el número de clases.

$$\text{Inter Clas} = \frac{\text{Ran}}{\text{Num Clas}}$$

Cada bloque tiene un límite superior e inferior en peso, sobre del cual calculamos el número de frecuencia, cada bloque se calcula con el peso mínimo más el intervalo de clase, y el siguiente bloque el valor mínimo es el límite superior del anterior, hasta completar el total de bloques.

$$\text{Bloque 1; Lim Inf} = W_{\min} , \text{Lim Sup} = W_{\min} + \text{Inter Clas}$$

$$\text{Bloque 2; Lim Inf} = \text{Lim Sup}_{\text{Bloque 1}} , \text{Lim Sup} = \text{Lim Sup}_{\text{Bloque 1}} + \text{Inter Clas}$$

Con los límites de cada bloque se realizó un análisis de frecuencia de los pesos. Se descartaron los extremos.

4. 19 Inmersión de hembras repletas con concentraciones múltiples

Se utilizaron hembras de *R. microplus* repletas de sangre de bovino, recién desprendidas, a las cuales se les aplicó el tratamiento el mismo día. Estas se lavaron suavemente con agua destilada, se pesaron individualmente y se homogenizaron en peso con el método antes descrito. Se repartieron completamente al azar en Cajas Cell Wells NUNC de 24 pozos, y se preparó la proteína a emplear en cada tratamiento, cada repetición experimental proviene de diferentes cultivos en biorreactor (Drummond y Whetstone, 1970).

Las concentraciones que se probaron fueron 50, 100, 150, 200, 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, mezcladas con agua destilada y un adherente (Tween 20 al 1% v/v), mientras que el control contenía agua destilada y adherente.

Se adiciono 1 mL de la concentración a probar en cada uno de los 24 pozos, cada placa es una unidad experimental y se realizaron por triplicado; a cada pozo se le colocó un individuo, permaneciendo éste sumergido por 5 minutos, posteriormente se colocaron en placas limpias. Se registró la mortalidad a los 8, 10, 12 y 14 días. En los mismos días se colectaron los huevos para medir el porcentaje de inhibición a la oviposición (% I.O.), y la inhibición del potencial reproductivo (% I.P.R.).

4. 20 Porcentaje de inhibición a la oviposición.

De la distribución completamente al azar del grupo homogéneo se pesaron nuevamente cada individuo de cada unidad experimental, en el día 15 posterior a la aplicación de los tratamientos, se pesó la masa de huevos colectada de cada uno de los individuos tratados.

Para calcular el porcentaje de inhibición a la oviposición se empleó la ecuación reportada por Drummond y Whetstone (1970).

$$\% \text{ I. O.} = \left(\frac{\text{PQLt}}{\text{PQLT}} - \frac{\text{PHLt}}{\text{PHLT}} \right) (100)$$

En la cual (PQLt) es el peso de las hembras del lote experimental, (PQLT) es el peso de las hembras del lote control, (PHLt) es el peso los huevos del lote experimental, (PHLT) es el peso los huevos del lote control.

Capítulo V

Resultados

4. 1 Identificación molecular de la cepa GP543 mediante el gen marcador *gyrB*

Mediante la técnica de PCR se amplificó el gen *gyrB* de la cepa GP543. Utilizando los cebadores del gen *gyrB*. El producto de PCR se corrió en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Green como lo muestra la **Figura 6**, mostrando una banda un poco mayor a los 1200 pb de acuerdo a lo reportado en el estudio de Yamamoto y Harayama (1995).

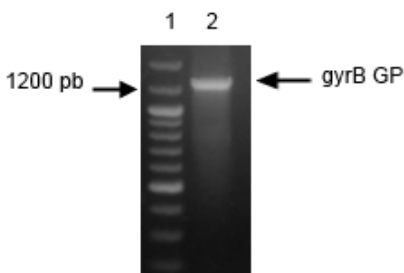


Figura 6. Gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Green. (1) marcador de peso molecular, (2) amplicón del gen *gyrB* de la cepa GP543.

4. 2 Análisis BLAST de la secuencia de nucleótidos del gen *gyrB* de la cepa GP543

La secuencia de nucleótidos de la amplificación del gen *gyrB* de la cepa GP543, se analizó por medio de la herramienta (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) de la base de datos NCBI, el **Cuadro 10** muestra las especies bacterianas con mayor identidad y el valor de E para cada una, así como, el número de acceso.

Cuadro 10 Identificación molecular de la cepa GP543 por alineamiento de la secuencia del gen *gyrB* como marcador molecular.

Cepa	Especie	Alineamiento	Identidad	E	Acceso
GP543	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Chromosoma, complete genome	99.58%	0.0	CP024771.1
	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar. Graciosensis	Gyrase subunidad B	99.58%	0.0	EF210274.1
	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar. Konkukian	Complete genome	99.58%	0.0	AE017355.1

En la **Cuadro 10** se observan identidades del 99.58% con cepas de la especie *B. thuringiensis*, no solo para los depósitos de secuencias del gen *gyrB*, también, con genomas completos de esta especie con un valor E = 0.0.

4. 3 Análisis filogenético de la cepa GP543 gen *gyrB*

Se elaboró un árbol filogenético con base en la matriz Neighbor Joining, al comparar la secuencia de nucleótidos del gen *gyrB* alineados contra la base de datos NCBI, en la cual se alinearon múltiples secuencias que presentaron identidad entre el 97.91 al 99.58% pertenecientes a las especies: *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. firmus* entre otras como lo muestra el árbol filogenético en la **Figura 7**.

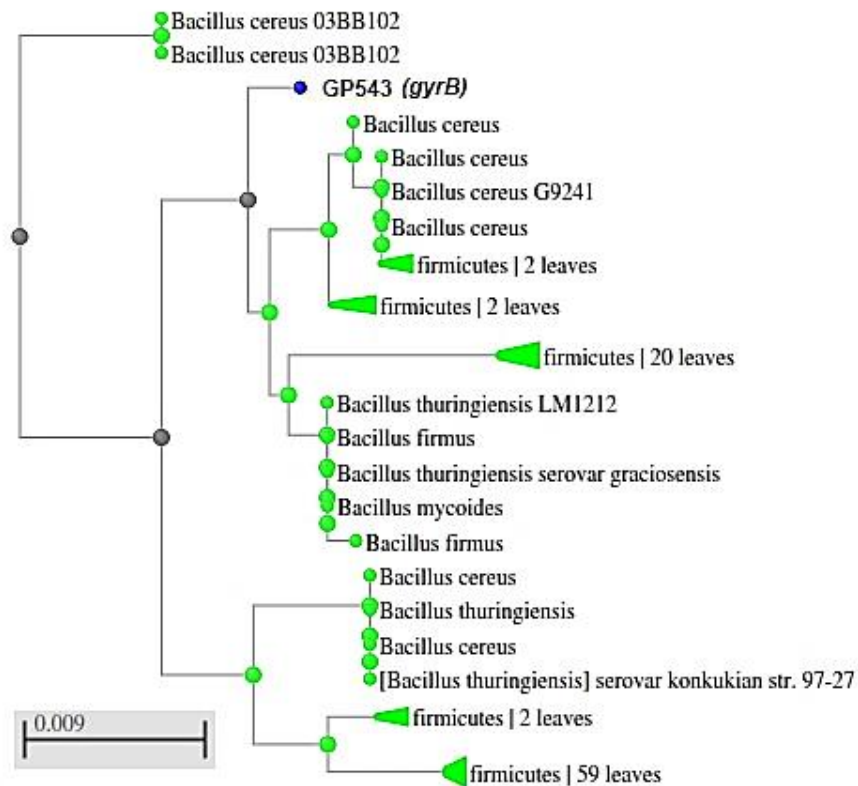


Figura 7. Árbol filogenético de la relación evolutiva cepa GP543 determinada por el gen *gyrB*.

Este árbol de distancias evolutivas muestra cuatro grupos de especies, todos con especies del género *Bacillus*, ubicando a la cepa GP543 flanqueada por dos grupos de *B. cereus*, sin embargo, la distancia evolutiva entre los taxones muestra que la cepa GP543 está más cercana al grupo de *B. thuringiensis*, la construcción de este árbol consideró un gran número de firmicutes con alta identidad lo que garantiza la determinación de la especie de la cepa GP543.

4. 4 Análisis del perfil proteico de la cepa GP543 en geles de SDS-PAGE

Para rastrear la proteína del tipo S-layer de 100 kDa y determinar en qué momento de la etapa del cultivo se está produciendo o si es extracelular, se muestreo cada 3 horas, las muestras se separaron en biomasa y sobrenadante. En la **Figura 8** se observa una proteína de 100 kDa que aparece desde las primeras 3 hasta las 13 horas, en donde comienza la esporulación y deja de observarse.

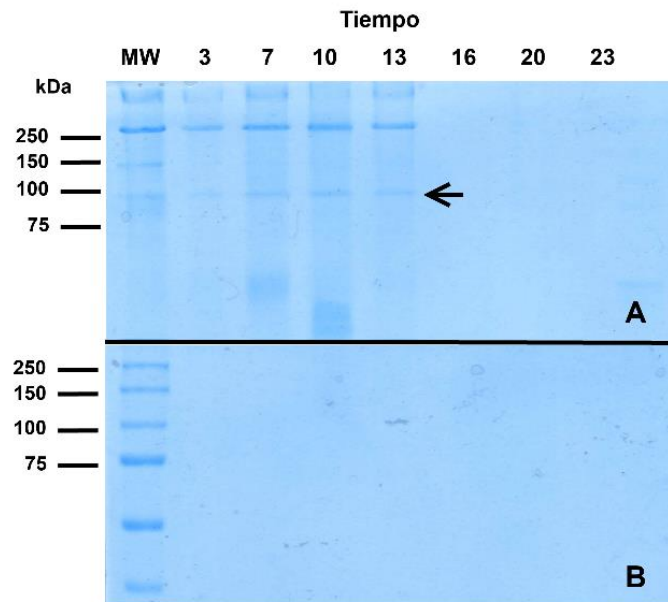


Figura 8. Geles de SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes. Biomasa (A), sobrenadante (B), producidas por la cepa GP543 de *B. thuringiensis* de muestras de la cinética de crecimiento en matraces.

4. 5 Cultivo de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis* a nivel de matraz

En la **Figura 9** se muestra la cinética de crecimiento en biomasa y producción de proteína total para los cultivos en matraces de 500 mL en condiciones estándar, con medio GYS y HCT y con una fuente de carbono de 10 y 3 g·L⁻¹ de glucosa respectivamente. El cultivo no presentó la etapa de adaptación para ninguno de los medios y los dos muestran un crecimiento casi lineal hasta las 10 horas de cultivo en donde alcanzan la biomasa máxima. Los parámetros cinéticos observados son: para GYS, $X_{\max} = 1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ con una velocidad específica de crecimiento $\mu = 0.098 \text{ h}^{-1}$, y para HCT, $X_{\max} = 1.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ con una velocidad específica de crecimiento $\mu = 0.26 \text{ h}^{-1}$, posteriormente el cultivo entro en fase estacionaria hasta la hora 20 donde esporuló rápidamente.

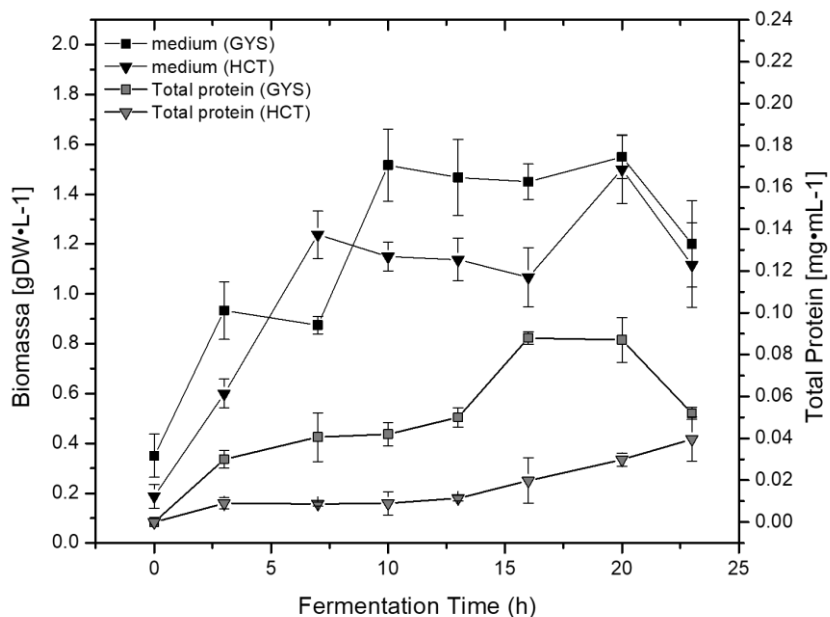


Figura 9. Cinética de crecimiento de biomasa y producción de proteína de la cepa GP543 de *B. thuringiensis* en matraces. Las barras de dispersión representan \pm SE.

El incremento en la concentración de proteína medida como proteína total (**Figura 9**), para el medio GYS tiene un máximo de $0.09 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ que se alcanza a las 16 horas de cultivo, seis horas después de estar el cultivo en fase estacionaria, manteniendo esta concentración

hasta las 20 horas. Para el medio GYS se tiene un máximo de $0.03 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ que se alcanza a las 16 horas de cultivo. En este medio la producción de proteína fue menor en el mismo orden de magnitud, pero es notable que aún en fase estacionaria la producción de proteína aumenta hasta el final del cultivo.

4. 6 Caracterización cinética de la proteína S-layer de la cepa GP543 en fermentador

Se analizó el perfil proteico con respecto a la cinética de crecimiento celular mediante geles de SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes. La **Figura 7(A)** fue teñida con Azul de Coomassie, mientras que en la **Figura 7(B)** la proteína de interés (cerca a los 100 kDa, GP543-SL) se observó mediante un anticuerpo policlonal específico anti-S-layer.

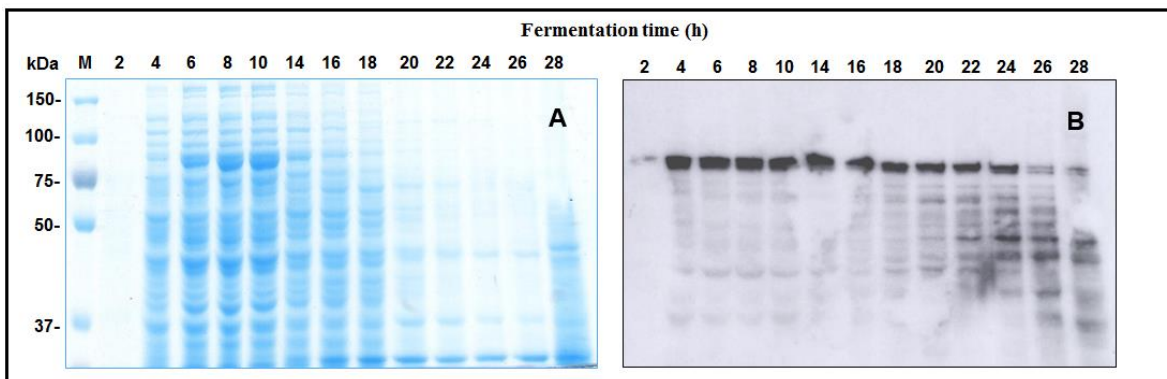


Figura 10. Perfil de proteico de la cepa GP543, cultivada en medio GYS en una fermentación discontinua. Las muestras visualizaron por SDS-PAGE por duplicado. Un gel fue teñido con azul de Coomassie y el otro se transfirió a una membrana de PVDF para realizar el análisis de transferencia de Western. (A) El perfil completo de proteínas durante el crecimiento de la cinética se tiñó con azul de Coomassie. (B) Detección de la proteína GP543-SL utilizando un anticuerpo específico anti-S-layer.

En la **Figura 10** (A) se observan un amplio bandeo de proteínas que pueden ser del metabolismo primario durante las primeras 10 horas de crecimiento exponencial, luego disminuye su concentración, el azul de coomassie muestra que la proteína GP543-SL es mayoritaria en la fase vegetativa. La **Figura 10** (B) confirma que durante el crecimiento vegetativo comenzó a sintetizarse la proteína GP543-SL alcanzando un máximo en la hora 14 donde comenzó la esporulación y el proceso de la síntesis de inclusiones cristalinas. Después de eso, la proteína de 100 kDa comenzó a degradarse al final de la fase estacionaria. Los productos de degradación, varias bandas de bajo peso molecular se detectaron en el análisis de transferencia Western con el anticuerpo anti-S-layer, pero la proteína GP543-SL (S-layer) es visible en todas las fases de crecimiento.

4. 7 Caracterización de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis* en fermentador

Las proteínas S-layer se expresan de forma continua, lo que permite emplear procesos de alto rendimiento como los lotes alimentados (restringido para Cry). Para lo cual, es necesario conocer las condiciones y parámetros cinéticos que permitirán realimentar al biorreactor tales como: la biomasa inicial, el volumen inicial del biorreactor alimentado, aunado, a los parámetros cinéticos: la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}) y el rendimiento biomasa-sustrato $Y_{x/s}$, que determinarán el caudal y la concentración del flujo de alimentación de sustrato. Por lo que es imperante que los valores del reactor tipo lote sean representativos del comportamiento de la cepa GP543 de *B. thuringiensis*.

La **Figura 11** muestra la cinética de crecimiento de biomasa operando en las condiciones estándar antes descritas, volumen nominal del fermentador 7 L y 5 de trabajo, con un suministro de potencia de 0.27 W/L estimada para las condiciones estándar, con medio GYS y 5 % de inóculo en volumen.

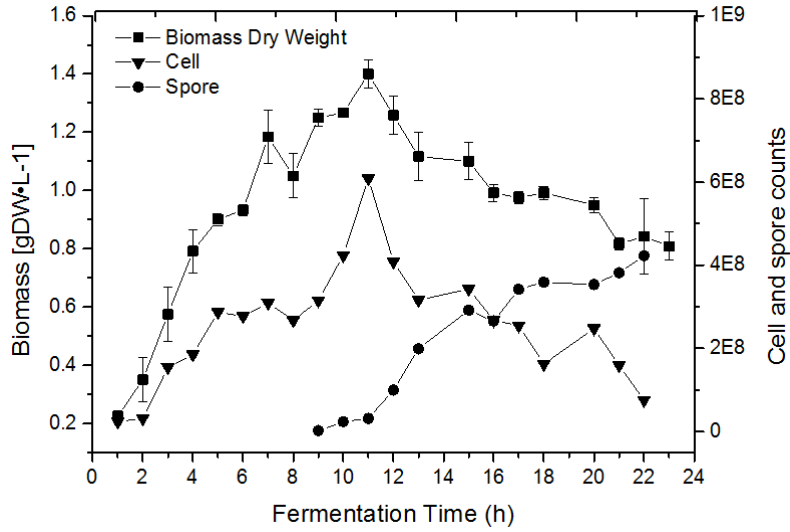


Figura 11. Cinética de crecimiento en peso seco y número de células vegetativas y esporas de la cepa GP543 de *B. thuringiensis* en medio GYS en biorreactor de tanque agitado. Los datos representan el valor promedio \pm SE.

Para establecer de forma confiable el valor μ_{Max} se registraron los valores de crecimiento celular, esporulación y producción cada hora. La **Figura 11** muestra que, no hay una fase de adaptación y durante la fase de crecimiento vegetativo, la cepa GP543 exhibió un crecimiento casi lineal hasta las once horas, $\mu = 0.42 \text{ h}^{-1}$, $R^2 = 0.94$ y $X_{max} = 1.4 \text{ gDW} \cdot \text{L}^{-1}$, $Y_{X/S} = 0.14$, aumentando la concentración de células vegetativas hasta alcanzar 6×10^8 a las 11 h. Para la segunda fase, se observó una disminución rápida en la concentración celular, y un aumento en la formación de esporas. Además, observamos la presencia de esporas a las nueve horas de cultivo hasta alcanzar más del 95% de la esporulación a las 23 h. El pH se mantuvo constante con un valor de siete mediante el sistema de control (HCl/NaOH) durante las 24 horas de cultivo donde alcanza arriba del 95 % de esporulación, medido por conteo celular.

Con el objetivo de caracterizar la relación entre la producción de proteína en función de la etapa de cultivo y de la concentración de biomasa se analizó mediante el rendimiento ($Y_{S/P}$) y productividad (Q_p) como lo muestra la **Figura 12**.

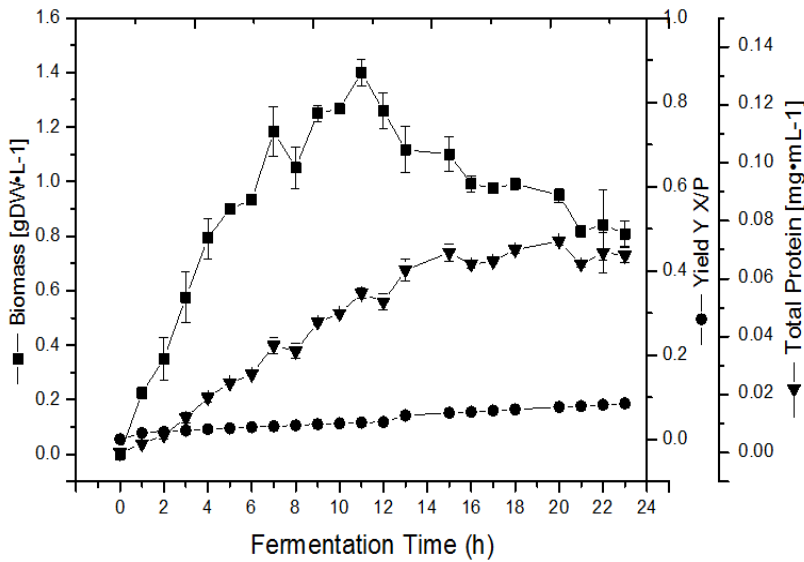


Figura 12. Cinética de crecimiento en peso seco, proteína y rendimiento $Y_{x/p}$ de la cepa GP543 de *B. thuringiensis* en medio GYS en fermentador. Los datos representan el valor promedio \pm SE.

Con respecto a la producción de proteína **Figura 12** se incrementó hasta las 18 horas y se mantuvo hasta el final del cultivo, la concentración máxima de proteínas fue de $P = 0.07 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, incluso cuando el cultivo entró en la esporulación a las once horas, la síntesis de proteínas continuó cuatro horas más. En cuanto a la evaluación de rendimiento del producto-biomasa en cada muestra, se observó que no hubo un cambio significativo hasta las 12 h, incluso cuando la biomasa estaba creciendo exponencialmente, seguido de un ligero aumento hasta el final del cultivo causado por la disminución de la biomasa.

Al resolver las ecuaciones del modelo de crecimiento logístico aplicado al fermentador tipo Batch, no solo, calculan valores cinéticos con precisión, también se pueden aplicar para reproducir el crecimiento celular, la producción y el consumo de la fuente de carbono, incluidas las constantes de crecimiento celular asociado y no asociado (Luedeking y Piret, 1959) como se muestra en la **Figura 13**.

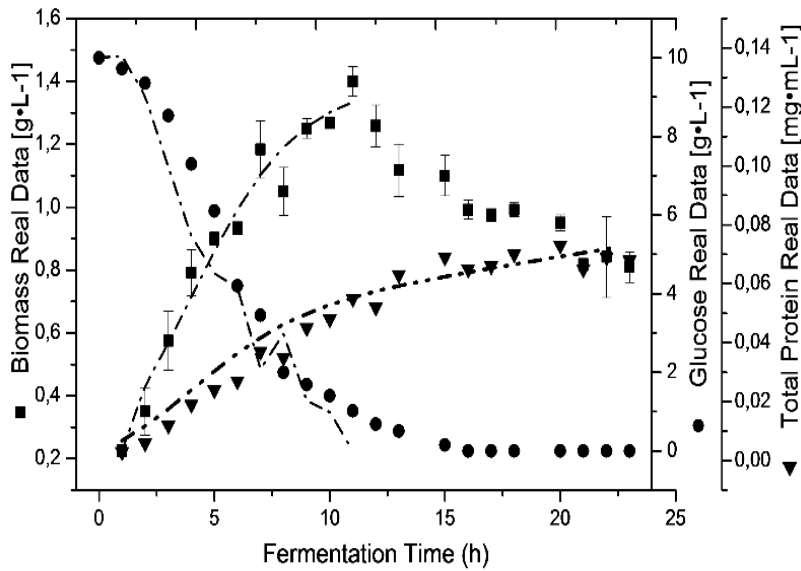


Figura 13. Cinética del crecimiento en peso seco, proteína total, glucosa y simulaciones de modelado de la cepa GP543 en medio de cultivo GYS en un biorreactor de tanque agitado. Los datos representan el promedio \pm SE.

En la **Figura 13** las viñetas son los valores reales de los datos de biomasa, proteínas y consumo de glucosa, y las líneas sólidas son el modelo matemático. El modelo representa de manera confiable cada uno de estos parámetros y permite el cálculo de la constante $\alpha = 0.033$ y $\beta = 0.001$ con $R^2 = 0.98$ para cada parámetro. También se observó que los $1.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucosa remanente en el medio el cultivo entró en la esporulación a las 11 horas, la glucosa se consumió en su totalidad a las 16 horas de fermentación.

4. 8 Cultivo de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis* en altas densidades celulares.

Adoptando los valores cinéticos obtenidos en el biorreactor operado en lote, podemos desarrollar un modelo que nos permita calcular la concentración del sustrato en el tanque de alimentación, la cual, permita alcanzar 140 g de biomasa y al disminuir la velocidad de crecimiento al menos a $\frac{1}{2} \mu_{\max}$, modelar el tiempo de cultivo, permitiendo elegir las

condiciones iniciales más convenientes operativamente para alimentar con el reactivo limitante.

Una de las condiciones de operación adoptadas son el volumen final del reactor en lote, ya que el biorreactor utilizado en el estudio tiene un volumen nominal de 7 y 5 L de trabajo, podría ser 2, 3, 4 L operados tipo lote y posteriormente ser alimentados con 3, 2, 1 L respectivamente de medio altamente concentrado del reactivo limitante, esto implica, que el flujo de alimentación en cualquiera de los caudales de alimentación permitirá llevar la biomasa inicial y el volumen inicial a 5 L y $140 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ final. El **Cuadro 11** contiene el volumen total a alimentar y la concentración de sustrato limitante por litro para alcanzar los $140 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomasa en tres volúmenes iniciales, para un rendimiento biomasa sustrato de $Y_{X/S} = 0.14$. y $X_0 = 1.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Cuadro 11. Fuente de carbono necesaria por litro en diferentes volúmenes iniciales.

Volumen inicial (L)	Volumen a alimentar (L)	Fuente de carbono ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Fuente de carbono total (g)	Saturación de agua
2	3	1659	4977	0.79
3	2	2483	4966	1.1
4	1	4957	4957	2.3
2	3	1659	4977	0.79

Para los valores de crecimiento y rendimiento celular que exhibe la cepa GP543 de *B. thuringiensis*, al disminuir el volumen de alimentación, la concentración de la fuente de carbono aumenta aún más de la saturación en condiciones estándar, por lo cual, no convienen volúmenes pequeños de alimentación. Por otro lado, los volúmenes altos son menores a la saturación facilitan disolver tal cantidad de carbohidratos, sin embargo, no se aprovecharía la capacidad total la alimentación y con ello un deficiente aprovechamiento del proceso. Para los experimentos sinsilicos se optó por 3 L de volumen en lote y 2 L de alimentación, para los cuales la concentración es muy cercana a la saturación aprovechando toda la capacidad de carga del agua a alimentar.

La **Figura 14** muestra que para alcanzar los 140 g de biomasa necesitamos por lo menos 90 horas de cultivo, la literatura reporta cultivos de 50 horas como máximo (Park *et al.*, 1992) lo que vuelve este proceso poco eficiente en tiempo; aunado a esto, durante las primeras horas de cultivo la biomasa es muy pequeña, pasando de 1.5 a 4.7 g en 16 horas de cultivo alimentado, lo que implica, inyectar al reactor 0.9 mL/h las primeras 10 horas y menos de 3 mL/h para las siguientes 6 horas, lo que operativamente es complicado, la alimentación de sustrato sobre una biomasa pequeña genera flujos de alimentación chicos y extiende el tiempo de cultivo importantemente.

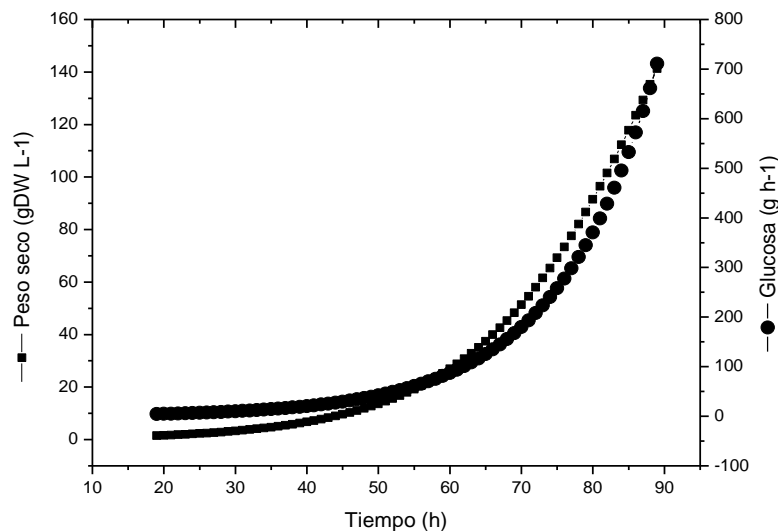


Figura 14. Cultivo in silico, cinética de crecimiento en biomasa consumo de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis* en altas densidades celulares en un fermentador lote alimentado de 5L con medio GYS.

4.9. Optimización de la producción de biomasa de *Bacillus thuringiensis* mediante el análisis de repuesta de superficie (MSR)

Un factor importante para la viabilidad del proceso lote alimentado fue aumentar la concentración de biomasa final de $X_{\max} = 1.4$ a $6 \text{ gDW} \cdot \text{L}^{-1}$ en cultivos operando en lote, también influyen velocidad específica de crecimiento μ_{\max} y la capacidad de convertir

sustrato en biomasa medio como rendimiento $Y_{X/S}$, impactando en el tiempo de cultivo (90 h) y operativamente en el caudal de alimentación de glucosa ($F \cdot S_R = 1 \times 10^{-3} \text{ L h}^{-1}$).

El medio HCT exhibe un rendimiento mayor de $Y_{X/S} = 0.56$, con una concentración de $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glucosa 1/3 de lo que contiene el medio GYS, lo que implica una correlación entre la biomasa y los nutrientes que contiene cada medio observándose en los parámetros cinéticos. El **Cuadro 12** muestra los valores cinéticos que se obtuvieron en matraz y reactor en lote con medio GYS y HCT.

Cuadro 12. Parámetros cinéticos obtenidos en matraz y biorreactor en dos medios de cultivo.

Biorreactor	Volumen de trabajo (L)	Medio de cultivo	μ_{\max} (h^{-1})	$Y_{X/S}$ ($\text{g} \times \text{g}^{-1}$)	X_{\max} ($\text{gDW} \cdot \text{L}^{-1}$)
Matraz	0.1	GYS (10 g Glu)	0.10	0.15	1.5
Matraz	0.1	HCT (3 g Glu)	0.26	0.56	1.7
Tanque agitado	5	GYS (10 g Glu)	0.15	0.14	1.4

En el **Cuadro 12** se observa que el medio HCT tiene una biomasa cercana a la mayor biomasa reportada y tiene el mayor rendimiento de biomasa por gramo de sustrato, empleando 56% de la glucosa disponible para generar biomasa, aunado, a la mayor velocidad específica de crecimiento. Si el rendimiento biomasa sustrato ($Y_{X/S}$) del medio de cultivo HCT, se mantuviera constante al enriquecer la fuente de carbono de 3 a $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ estas condiciones serían viables para el proceso de alto rendimiento en lote alimentado, aun más, conocer las relaciones entre los nutrientes limitantes del crecimiento celular y los parámetros cinéticos, permitirían una aplicación no solo de alta densidad celular sino de alta productividad.

4. 10 Determinación del efecto del extracto de levadura en la producción de biomasa de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis* por el método de la ruta del ascenso más pronunciado

Para probar si existen una deficiencia de nitrógeno en medio de cultivo, se planteó aumentar la concertación de extracto de levadura (Khedner et al., 2011) enriqueciendo el medio GYS con 0, 3, 4, 8 g·L⁻¹ para determinar las concentraciones optimas del nitrógeno orgánico, la glucosa y las sales minerales se mantuvieron constantes.

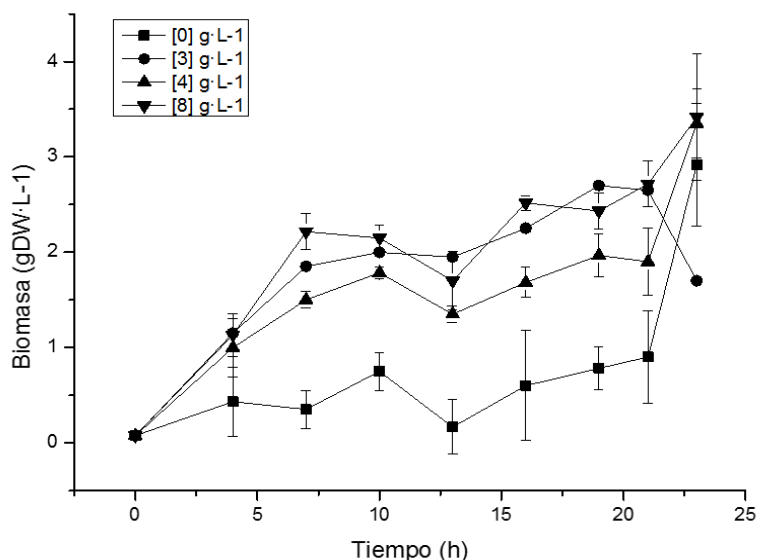


Figura 15. Cinética de crecimiento de biomasa de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis* en matraces de 500 mL y 100 mL de medio GYS enriquecido con 0, 3, 4, 8 g de extracto de levadura.

En la **Figura 15** se muestra la cinética de crecimiento de biomasa, para cultivos en matraces de 500 mL nominal y 100 mL de medio de cultivo GYS enriquecido. Únicamente la concentración de 3 g·L⁻¹ de extracto de levadura no tiene repeticiones ya que es la concentración usual del medio. Se observa una adaptación muy rápida desde las primeras horas del cultivo, la fase de crecimiento exponencial duró hasta la hora diez para cinéticas que contenían extracto de levadura. Aunque continúa creciendo la biomasa ya no es de forma exponencial. La cinética que no contenía extracto de levadura tuvo un crecimiento muy limitado, hasta la hora 21 con una $X_{\max} = 0.9$, en contraste, los cultivos que sí la

contenían presentaron mayor acumulación de biomasa, de $1.9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a $2.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a la hora 21 del cultivo. Sin embargo, el incremento en el extracto de levadura no representó el aumento en la biomasa requerido y aun cuando hay un incremento en la biomasa a $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de extracto de levadura la biomasa obtenida no es la requerida para iniciar el cultivo en biorreactor lote alimentado como lo sugiere el cultivo *in silico* **Figura 14**.

Otro factor importante para la viabilidad del proceso Lote-alimentado es la velocidad de crecimiento, la **Figura 16** muestra el valor del $\ln(X)$ contra tiempo, en esta se observa que no hay un cambio en la tendencia de crecimiento celular aun al aumentar hasta $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ la concentración de extracto de levadura, por no reducirá los tiempos de fermentación, el caculo de la regresión lineal para determinar la velocidad especifica de crecimiento se observa en la **Cuadro 13** esta muestra valores de 0.26 a 0.3 h^{-1} , aun cuando, la acumulación de biomasa aumento hasta $2.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ toda vía es un valor bajo.

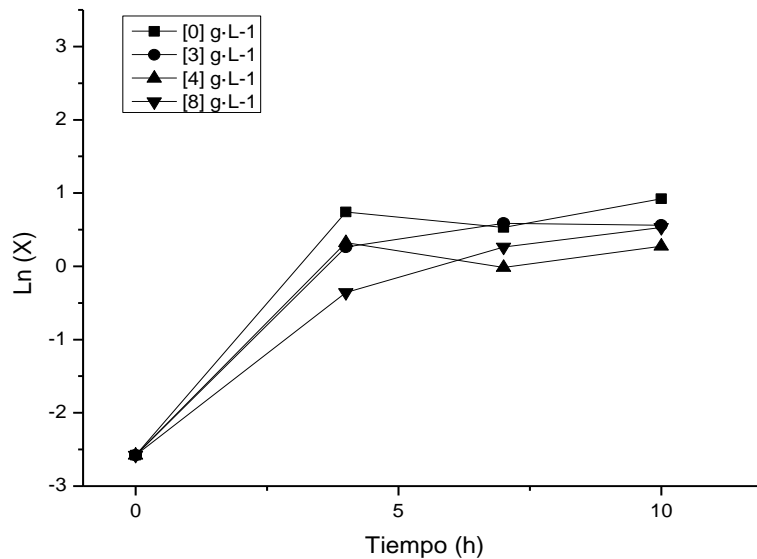


Figura 16. Cinética en logaritmo natural de biomasa de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis* en matraces de 500 mL y 100 mL de medio GYS enriquecido con 0, 3, 4, 8 g de extracto de levadura.

Cuadro 13. Velocidad de crecimiento de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis* con 0, 3, 4, 8 g de extracto de levadura (Fuente de nitrógeno).

Extracto de levadura (g·L ⁻¹)	Velocidad específica de crecimiento (μ)	Biomasa (10 h)
[0]	0.32	0.86
[3]	0.3	2.65
[4]	0.26	2.00
[8]	0.3	2.71

Para determinar si es posible aumentar acumulación de biomasa al aumenta la concentración de extracto de levadura arriba de los 8 g·L⁻¹, se graficó la repuesta de biomasa a la concentración de extracto de levadura como se muestra en la **Figura 17** en esta se observa que hay una afinidad por el sustrato hasta los 4 g·L⁻¹, permitiendo una acumulación de biomasa de 2.5 gramos, pero entra en una tendencia asintótica después de esta, por lo que, al aumentar la concentración de sustrato la biomasa no cambiaría.

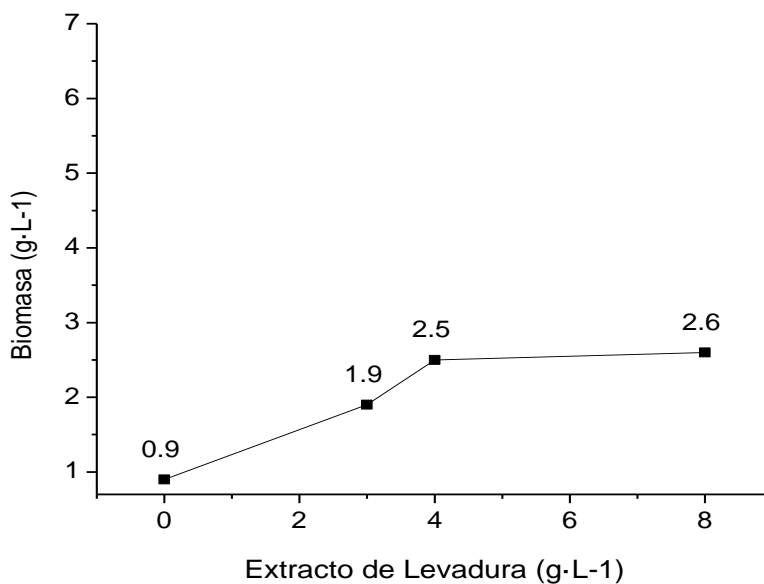


Figura 17. Repuesta de la biomasa a la concentración de extracto de levadura de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis* en matraces de 500 mL y 100 mL de medio GYS enriquecido con 0, 3, 4, 8 g de extracto de levadura.

Los principales requerimientos nutrimentales son cubiertos con el medio GYS, la fuente de carbono $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ glucosa, extracto de levadura que contiene todos los aminoácidos $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, y un grupo de sales minerales que permiten cumplir con las funciones celulares. En contraste, el medio HCT que contiene sólo $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucosa y 2 gramos de Casaminoácidos que contiene todos los aminoácidos excepto el triptófano (se degrada en la hidrólisis ácida) y que es suplementado con 5 gramos de Triptona, con un grupo de sales minerales parecido al GYS. Por lo tanto, al descartar-la glucosa para un posterior análisis, si el medio HCT muestra un rendimiento mayor $Y_{x/s}$ y es causado por una deficiencia nutricional por algún aminoácido esta debería estar expuesta a altas concentraciones de extracto de levadura y la **Figura 17** descarta esta posibilidad. Sin embargo, la hidrólisis ácida que se emplea en la fabricación de los Casaminoácidos genera pequeños péptidos que son de fácil metabolismo, proporcionando una fuente de nitrógeno orgánico. Para determinar la influencia de los Casaminoácidos, se planteó enriquecer al medio de referencia GYS.

4. 11 Determinación del efecto de los Casaminoácidos en la producción de biomasa de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis* por el método de la ruta del ascenso más pronunciado

Se adicionaron al medio GYS con concentraciones de 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 4, 8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Casaminoácidos, el extracto de levadura, la glucosa y las sales minerales se mantuvieron constantes, en matraces de 500 mL nominal y 100 mL de medio de cultivo GYS. En la Figura 18 se muestra la cinética de crecimiento de biomasa, sin repeticiones para cada punto, con la finalidad de evaluar más concentraciones. Podemos observar que sin Casaminoácidos el cultivo presenta el mismo crecimiento cinético descrito en la **Figura 18** con extracto de levadura, a $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Casaminoácidos la biomasa comienza a aumentar pasando de 1.5 a $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para la máxima concentración.

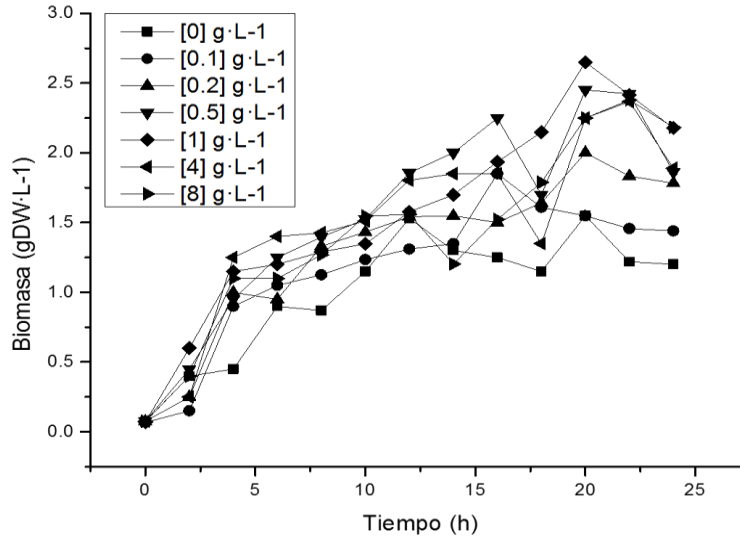


Figura 18 Cinética de crecimiento de biomasa, producidas por *B.acillus thuringiensis* en matraces con 50 mL de medio GYS enriquecido con 0, 0.1, 0.2,0.5, 1, 4, 8 g·L⁻¹ de casaminoácidos.

Las velocidades de crecimiento para este factor **Figura 19** se muestra como el valor del ln (X) contra tiempo, en esta se observa que no hay un cambio en la tendencia de crecimiento celular ni en las trazas de 0.1 o 0.2 g·L⁻¹ ni al aumentar hasta 8 g·L⁻¹ de Casaminoácidos, por lo que no reducirá los tiempos de fermentación al igual que el extracto de levadura.

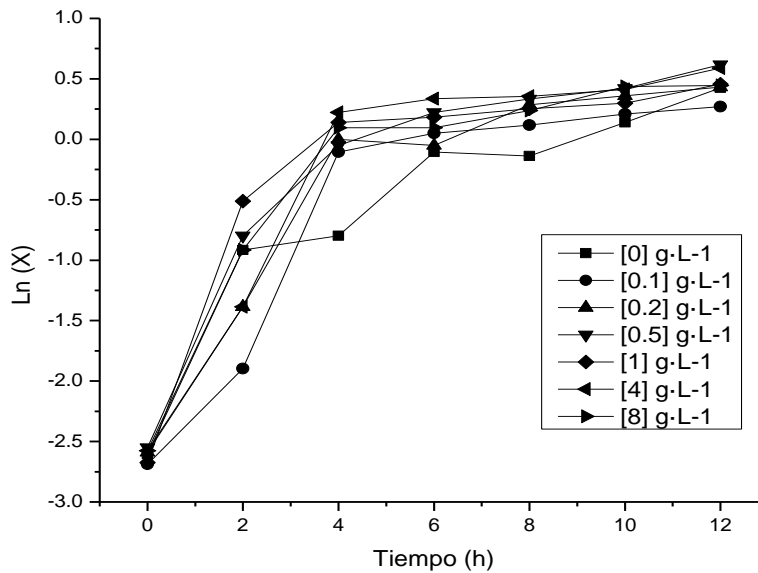


Figura 19. Cinética en logaritmo natural de biomasa de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis* en matraces de 500 mL y 100 mL de medio GYS enriquecido 0, 0.1, 0.2,0.5, 1, 4, 8 g·L⁻¹ de casaminoácidos.

El caculo de la regresión lineal para determinar la velocidad especifica de crecimiento se observa en la **Cuadro 14** esta muestra valores menores a los observados en el extracto de levadura de 0.2 h⁻¹, aun cuando, la acumulación de biomasa es baja para las 12 horas en las que se evaluó la velocidad y es toda vía es un valor bajo para el proceso lote-alimentado.

Cuadro 14. Velocidad de crecimiento de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis* con 0, 0.1, 0.2,0.5, 1, 4, 8 g·L⁻¹ de casaminoácidos. (Fuente de nitrógeno).

casaminoácidos (g·L ⁻¹)	Velocidad especifica de crecimiento (μ)	Biomasa (12 h)
[0]	0.21	1.5
[0.1]	0.23	1.3
[0.2]	0.22	1.5
[0.5]	0.22	1.9
[1]	0.19	1.6
[4]	0.23	1.8
[8]	0.21	1.6

La **Figura 20** muestra la repuesta de biomasa a la concentración de los casaminoácidos, para determinar si es posible aumentar acumulación de biomasa.

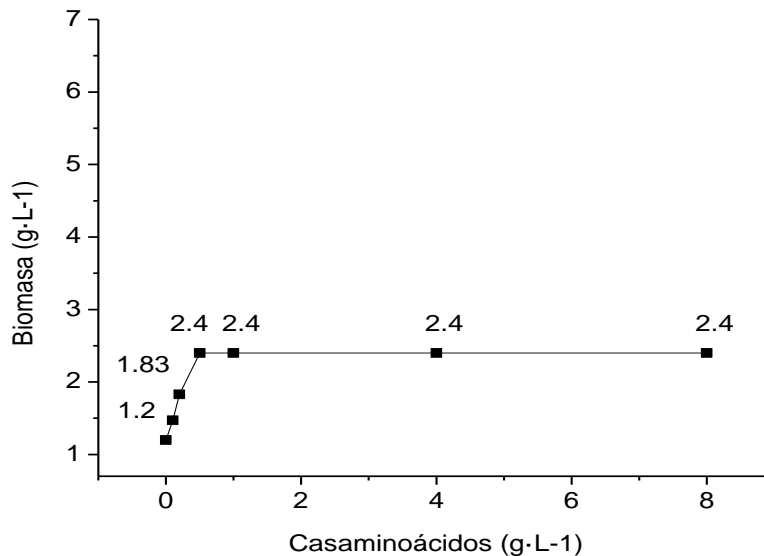


Figura 20. Repuesta de la biomasa a la concentración de extracto de levadura de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis* en matraces de 500 mL y 100 mL de medio GYS enriquecido con 0, 0.1, 0.2,0.5, 1, 4, 8 g·L⁻¹ de casaminoácidos.

en esta se observa que hay una afinidad por el sustrato muy corta cerca de $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, permitiendo una acumulación de biomasa de 2.4 gramos, pero entra en una tendencia asintótica marcada, por lo que, al aumentar la concentración de sustrato la biomasa no cambiaría. Se observa que, aún aumentado la concentración de casaminoácidos hasta $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, la biomasa no aumenta de forma considerable, y aunque haya aumentado $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ más, la biomasa obtenida en la fermentación con los medios originales, no es la requerida para iniciar el cultivo en biorreactor lote alimentado como lo sugiere el cultivo *in silico* (**Figura 12**).

4. 12 Determinación del efecto del triptófano en la producción de biomasa de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis* por el método de la ruta del ascenso más pronunciado

El único aminoácido no explorado era el triptófano, que el extracto de levadura ya contenía, pero en bajas concentraciones apenas $1.2 \text{ g}/100\text{g}$. Para determinar si el triptófano se encuentra en concentraciones limitantes en el medio GYS se planteó adicionarlo, enriqueciendo el medio GYS con concentraciones de 0.1, 0.2, 0.5, 1, $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de triptófano, todos los componentes del medio de cultivo se mantuvieron constantes.

En la **Figura 21** se puede observar una fase de crecimiento exponencial que duró hasta la hora nueve de cultivo y que muestra el mismo comportamiento para todas las concentraciones ensayadas, ya para esta hora de cultivo la biomasa ha superado todos los experimentos antes descritos con $3.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, posterior a esta hora la mayoría de las cinéticas cambió su velocidad de crecimiento, entrando en fase estacionaria y al final del cultivo de la hora 21 a 24 aumentando biomasa un poco más, excepto la de 1 g de triptófano que continuó creciendo hasta alcanzar los $5.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomasa.

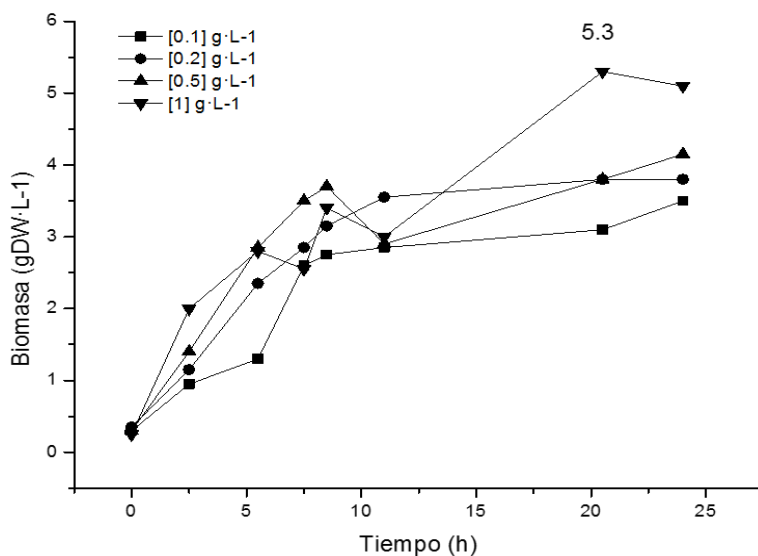


Figura 21. Cinética de crecimiento de biomasa, producidas por *B. thuringiensis* en matraces con 100 mL de medio GYS enriquecido con 0.1, 0.2, 0.5, 1 g·L⁻¹ triptófano.

Las velocidades de crecimiento para este factor triptófano se muestran en la **Figura 22** como el valor del ln (X) contra tiempo, en esta se observa un pequeño cambio en las velocidades hasta la hora 9 donde convergen, los cálculos de velocidad se realizaron hasta la hora 12.

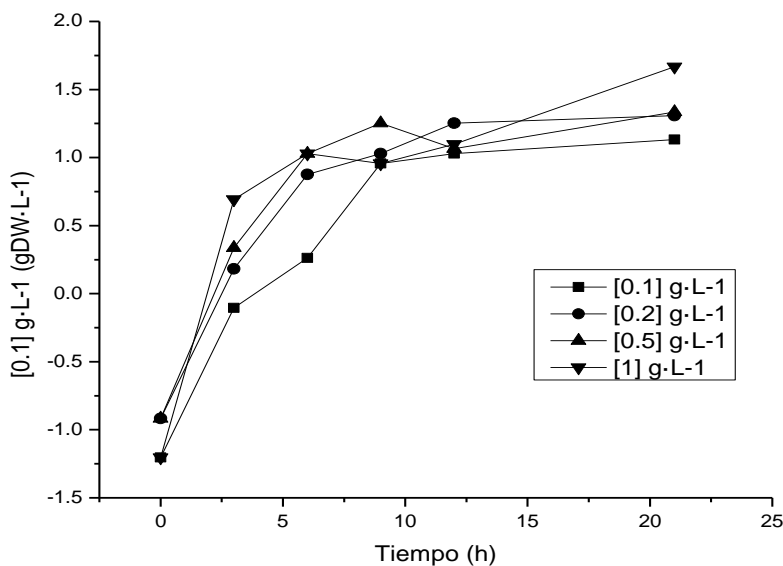


Figura 22. Cinética en logaritmo natural de biomasa de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis* en matraces de 500 mL y 100 mL de medio GYS enriquecido con 0.1, 0.2, 0.5, 1 g·L⁻¹ triptófano.

Se observa que, aumentado la concentración de triptófano hasta $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, la biomasa aumenta de forma considerable de 2.4 a $5.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ en comparación con la biomasa obtenida en la fermentación con los medios originales y es la requerida para iniciar el cultivo en biorreactor lote alimentado como lo sugiere el cultivo *in silico* (**Figura 12**).

El cálculo de la regresión lineal para determinar la velocidad específica de crecimiento se observa en la **Cuadro 14** esta muestra valores menores a los observados en el extracto de levadura de 0.2 h^{-1} , aun cuando, la acumulación de biomasa es baja para las 12 horas en las que se evaluó la velocidad y es toda vía es un valor bajo para el proceso lote-alimentado.

Cuadro 14. Velocidad de crecimiento de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis* con 0.1, 0.2, 0.5, $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ triptófano. (Fuente de nitrógeno).

triptófano ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Velocidad específica de crecimiento (μ)	Biomasa (12 h)
[0.1]	0.18	2.8
[0.2]	0.17	3.5
[0.5]	0.16	2.9
[0.1]	0.16	3

La **Figura 23** muestra la respuesta de biomasa a la concentración de triptófano para determinar si es posible aumentar acumulación de biomasa con este factor. En esta se observa que hay afinidad por el sustrato hasta $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, permitiendo una acumulación de biomasa de 5.3 gramos, y no entra en una tendencia asintótica marcada, por lo que, podría al aumentar la concentración de sustrato y aumentar la biomasa. La biomasa obtenida es la es la requerida para iniciar el cultivo en biorreactor lote alimentado como lo sugiere el cultivo *in silico* (**Figura 12**).

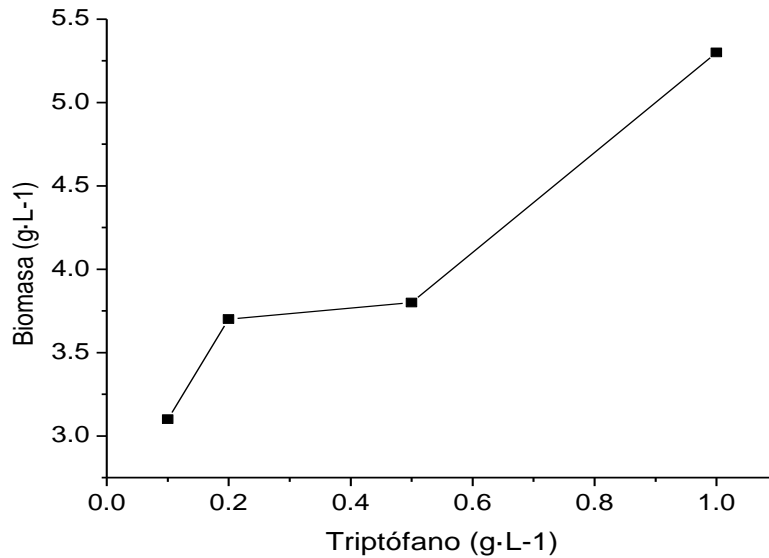


Figura 23. Repuesta de la biomasa a la concentración de extracto de levadura de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis* en matraces de 500 mL y 100 mL de medio GYS enriquecido con 0.1, 0.2, 0.5, 1 g·L⁻¹ triptófano.

Estos resultados indican que el triptófano está en concentraciones limitantes en el medio GYS y es posible plantear un cultivo en biorreactor lote alimentado con una mayor biomasa inicial.

El triptófano es un elemento recurrente de las proteínas, por ello, el medio HCT contiene 5 g·L⁻¹ sólo de este aminoácido. Una mayor concentración de triptófano en el medio podría cambiar la velocidad específica de crecimiento como un segundo reactivo limitante o es un elemento necesario para los procesos celulares, incluidos la duplicación celular. Si analizamos la **Figura 22** sólo desde la hora dos hasta la hora ocho podemos calcular la velocidad específica de crecimiento y compararlas.

En el **Cuadro 15** podemos observar que la velocidad de crecimiento μ_{\max} es muy parecida para los experimentos uno, tres, siete, ocho y nueve, aun cuando la biomasa máxima y el

rendimiento obtenidos son muy diferentes; uno y tres contienen concentraciones muy pequeñas de triptófano proveniente del extracto de levadura. Los experimentos siete, ocho y nueve contienen triptófano (reactivo adicionado) en bajas concentraciones y aunque no se modificó su velocidad de crecimiento si permitió aumentar de dos a cinco veces la biomasa obtenida. Para el experimento 10 podemos observar que con $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de triptófano sí se modificó la velocidad de crecimiento $\mu_{\max} = 0.29 \text{ h}^{-1}$ muy parecida a los experimentos con el medio HCT completo que contiene $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de triptófano (experimentos dos, cinco y tres).

Cuadro 15. Parámetros cinéticos obtenidos en matraz y biorreactor con dos medios de cultivo.

No	Biorreactor	Volumen de trabajo (L)	Medio de cultivo	$\mu_{\max} (\text{h}^{-1})$	$Y_{x/s} (\text{gx gs}^{-1})$	$X_{\max} (\text{gL}^{-1})$
1	Matraz	0.1	GYS (Estan.)	0.10	0.15	1.5
2	Matraz	0.1	HCT (Estan.)	0.26	0.56	1.7
3	Tanque agitado	5	GYS (Estan.)	0.15	0.14	1.4
4	Tanque agitado Simulación	5	HCT (10 g Glu)	0.26	0.56	5.6
5	Matraz	0.1	HCT (5 g Glu)	0.31	1	5.4
6	Matraz	0.1	HCT (10 g Glu)	0.34	0.63	6.3
7	Matraz	0.1	GYS (0.1 g Trip)	0.19	0.35	3.5
8	Matraz	0.1	GYS (0.2 g Trip)	0.16	0.38	3.8
9	Matraz	0.1	GYS (0.5 g Trip)	0.16	0.41	4.1
10	Matraz	0.1	GYS (1 g Trip)	0.29	0.53	5.3

Concentraciones bajas de triptófano modifican moderadamente la velocidad de crecimiento, pero permite alcanzar mayor biomasa, funcionando como un componente necesario para las funciones celulares en la fase vegetativa, y únicamente cuando las concentraciones de triptófano superan $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ se triplica la velocidad de crecimiento ($\mu_{\max} = 0.3$) y esta se mantiene al menos hasta los $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de triptófano (experimentos dos, cinco, seis y 10).

Se realizó una búsqueda dirigida en reportes técnicos con aminoácidos en la producción bacteriana y del género *Bacillus*, hay un único reporte de Prabakaran y Hoti (2008), sin

embargo, postulan que se trata de nitrógeno libre como una medida de la concentración de aminoácidos individuales y péptidos pequeños, probando solo diferentes concentraciones y marcas de peptona. Estos autores encuentran un aumento en la biomasa, pero no por los factores que ellos suponen.

La peptona proviene de un proceso enzimático que no daña al triptófano por lo cual se esperaba un efecto similar, se realizó una cinética con diferentes concentraciones de peptona como se muestra en la **Figura 24**.

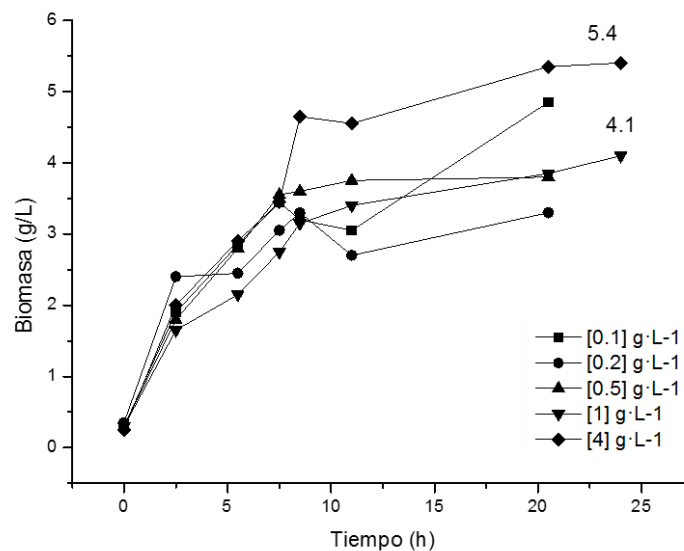


Figura 24. Cinética de crecimiento de biomasa, producidas por *Bacillus thuringiensis* en matraces con 100 mL de medio GYS enriquecido con 0.1, 0.2, 0.5, 1, 4 g·L⁻¹ Peptona.

En la **Figura 24** se puede observar una fase de crecimiento exponencial que duró hasta la hora nueve de cultivo similar a los experimentos con triptófano y que muestra el mismo comportamiento para todas las concentraciones ensayadas hasta esta hora. Posteriormente la mayoría de las cinéticas cambiaron su velocidad de crecimiento, aumentando muy poco hasta el final del cultivo, excepto la de 4 g·L⁻¹ de peptona que continuó creciendo hasta alcanzar los 5.4 g·L⁻¹ de biomasa.

4 veces más en el rendimiento, $Y_{X/S}$, podría emplearse con intención de mejorar el cultivo en lote y comenzar la alimentación en condiciones más ventajosas. Por lo que se planteó se enriqueciera de glucosa hasta $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ el medio HCT.

Si el rendimiento ($Y_{X/S}$) del medio de cultivo HCT, se mantuviera constante al enriquecer la fuente de carbono de 3 a $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, manteniendo fijas todas las condiciones de cultivo tales como: temperatura, velocidad de agitación, % de inóculo, volumen nominal y de trabajo, siendo la única diferencia el medio de cultivo y si es éste el que causa un aumento de 4 veces más en el rendimiento, $Y_{X/S}$, podría emplearse con intención de mejorar el cultivo en lote y comenzar la alimentación en condiciones más ventajosas. Por lo que se planteó se enriqueciera de glucosa hasta $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ el medio HCT.

La **Figura 12** muestra el cultivo *in silico* lote alimentado generado con hoja de cálculo, parte de un cultivo en lote-*in vivo* de 19 horas bajo los supuestos que el medio HCT mantiene los parámetros cinéticos al enriquecerlo con 10 g de glucosa, las condiciones de cultivo son: volumen nominal 7 L , volumen final de lote alimentado 5 L , volumen operado en lote 3 L , biomasa inicia previa a la alimentación $X_0 = 5.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, rendimiento biomasa sustrato $Y_{X/S} = 0.56$, velocidad específica de crecimiento $\frac{1}{2} \mu_{\max} = 0.13 \text{ h}^{-1}$ con una biomasa final de $X_f = 140 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

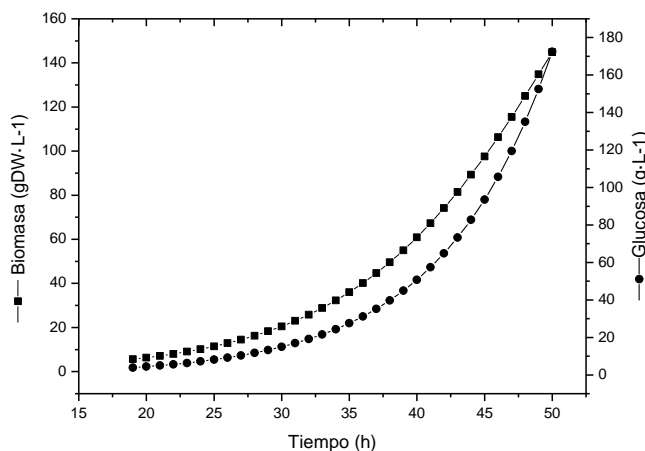


Figura 25. Cultivo *in silico*, cinética de crecimiento en biomasa consumo de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis* en altas densidades celulares en un fermentador lote alimentado de 5 L con medio HCT enriquecido con 10 g de glucosa y alimentado con 2 L de solución saturada de glucosa.

Podemos observar en la **Figura 25** que el tiempo de fermentación disminuyó casi 40 h, y aunque, el caudal de glucosa inyectado sigue siendo pequeño pasado de 4 a 10 mL en las primeras ocho horas, ya es posible inyectar estos caudales con equipos de laboratorio. Estos cambios operativos y cinéticos permitirían alcanzar la biomasa máxima planteada, siempre que puedan ser replicados por algún medio de cultivo o técnica de cultivo.

4.13 Selección de un grupo homogéneo en peso de las muestras de *Rhipicephalus microplus*.

La variable medida de mortalidad es sensible al efecto dosis-repuesta causado por el peso de los individuos de *R. microplus*, ya que durante las colectas se registraron los pesos de las garrapatas muy heterogéneas, por lo que se decidió desarrollar una disposición de frecuencias en un histograma que nos permita seleccionar en peso a un grupo que no tuviera tanta variabilidad. El número de hembras repletas de la muestra fue de 761 unidades, las cuales se pesaron y distribuyeron mediante los cálculos descritos en métodos, el peso de cada individuo se colocó en el intervalo superior e inferior y se contó la frecuencia como lo muestra el **Cuadro 16**.

Cuadro 16. Tabla de distribución de pesos de *Rhipicephalus microplus*.

Max=	480.4	Clase	Lim. Inf.	Lim. Sup.	Media	Frecuencia
Min=	23.8	1	23.8	69.5	46.6	2
Rango =	456.6	2	69.5	115.1	92.3	3
Num. Clase.	10.6	3	115.1	160.8	138.0	39
	10.0	4	160.8	206.4	183.6	150
Int. Cla =	45.7	5	206.4	252.1	229.3	248
		6	252.1	297.8	274.9	199
		7	297.8	343.4	320.6	93
		8	343.4	389.1	366.3	22
		9	389.1	434.7	411.9	4
		10	434.7	480.4	457.6	0
						760

Las unidades que pesaron menos de 138 y más de 366 mg se retiraron del bioensayo, un total de 163 unidades; el bloque homogéneo contenía un total de 597 unidades, lo que permitió evaluar seis concentraciones del complejo espora-cristal y cuatro repeticiones independientes por concentración. En la **Figura 25** se puede observar que la muestra tiene una dispersión normal en peso, también los bloques que fueron eliminados y el grupo homogéneo, esta muestra homogénea se distribuyó en placas de 24 pozos de forma completamente al azar.

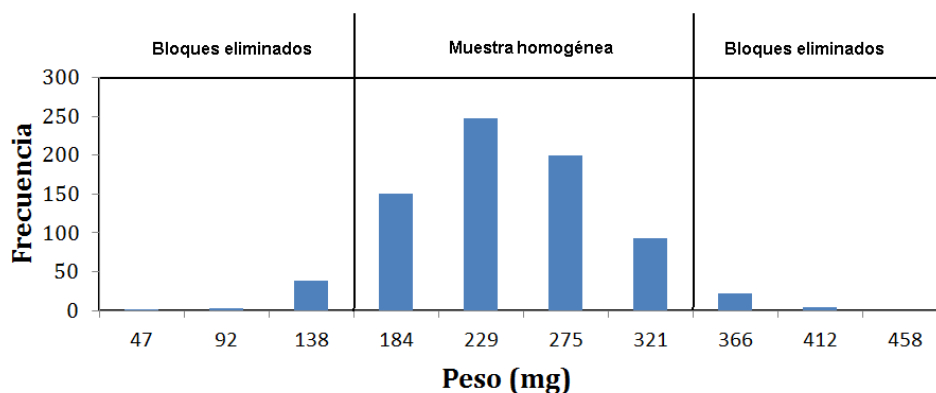


Figura 25. Distribución normal en peso de *Rhipicephalus microplus*.

4 14 Evaluación de la actividad toxica del complejo espora-proteína S-layer en concentraciones múltiples producida en fermentador.

Se sometieron a desafío seis concentraciones: Control, 50, 100, 150, 200 a 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, la proteína empleada fue obtenida mediante fermentación en tanque agitado de 5 L tipo lote la cual se detuvo a las 27 horas. Se midió la proteína total por medio de la técnica de Bradford. El Biorreactor para este tiempo contenía 0.11 mg/mL de proteína total; se ajustaron las concentraciones al volumen requerido con agua destilada y tween 20, conforme a lo descrito en métodos.

En la **Figura 26** la concentración más baja del complejo causó más de 50.0 % de mortalidad a los 14 días, y la mortalidad más alta fue de 75.0 % con 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en este día. El análisis estadístico muestra que, a los ocho días no hay diferencias significativas entre los tratamientos y esta tendencia continúa hasta el día 12 donde la concentración de 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ causó una mayor mortalidad con diferencias significativas. Al final del bioensayo, se observó una mortalidad diferencial en relación con la concentración del complejo, pero desde la concentración de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ hay una mortalidad mayor al 60.% de los individuos de *R. microplus*.

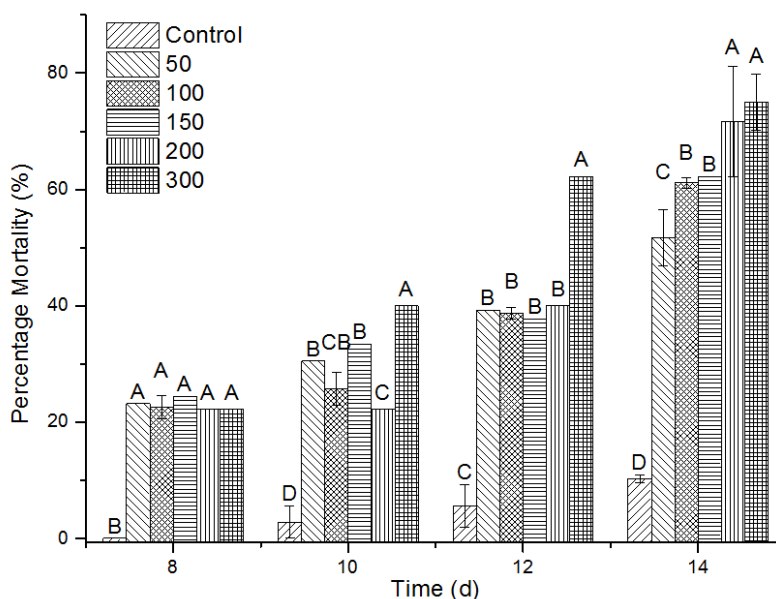


Figura 26. Virulencia del complejo espora-proteína S-layer de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis* contra *Rhipicephalus microplus*. Los valores en cada columna de cada tratamiento con la misma letra no difieren significativamente, y los datos se evaluaron mediante la prueba de Tukey. Los datos representan el valor promedio \pm SE.

4 15 Efectos pos tratamientos sobre el potencial reproductivo de *R. microplus*

La aplicación de estos tratamientos causó que varios individuos no ovipositaran y que el peso de los huevos ovipositados disminuyera (% I.O.), pero sobre todo el impacto en potencial reproductivo (% I.H.) es fuerte.

Todas las concentraciones causaron disminución en la oviposición del 5 al 10 %, pero 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ causó una inhibición arriba del 15% como lo muestra la **Figura 27**. Sin embargo, no solo se afectó la oviposición sino también la viabilidad (% I.H.), con mayor inhibición de la eclosión de huevos a la concentración de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Al final del bioensayo, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, y todos los tratamientos mostraron una inhibición de la eclosión superior al 85%. En contraste, el control eclosionó con un alto porcentaje cercano al 90% hasta el día 14 que se dio seguimiento al bioensayo.

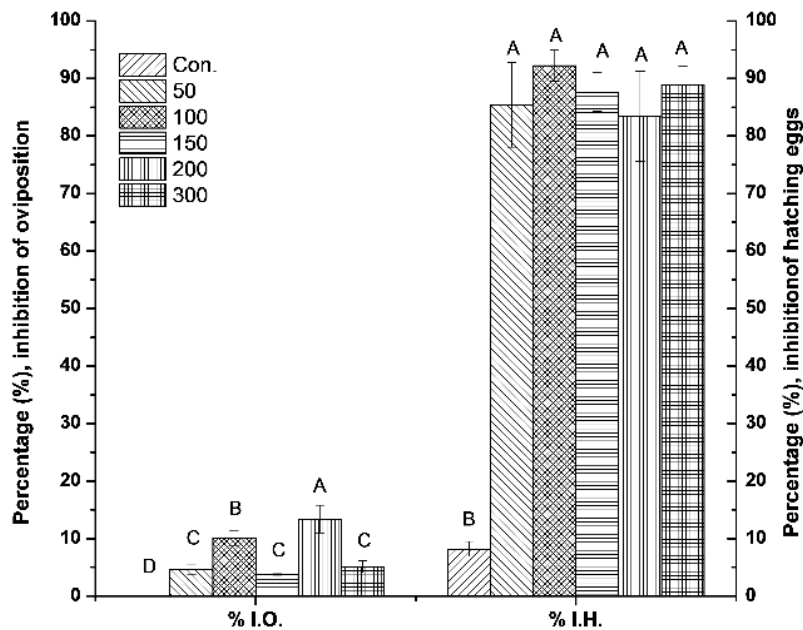


Figura 27. Inhibición de la oviposición (% I.O.) y eclosión de los huevos (% I.H.) causada por el complejo espóra-cristal S-layer de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis* contra *Rhipicephalus microplus*.

4. 16 Evaluación de la actividad toxica del complejo espora-cristal S-layer producida en fermentador a diferentes tiempos de cultivo.

Para determinar la actividad de la proteína con respecto al tiempo de fermentación, se realizó un experimento de contraste sólo con dos concentraciones por triplicado 50 y 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, la proteína fue obtenida a las 32 h y 72 h. La primera muestra, se extrajo del biorreactor el volumen suficiente para el desafío con una concentración proteína total de 758.20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para las dos concentraciones 50 y 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Los tratamientos se prepararon de la forma antes descrita y se refrigeraron a $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su aplicación. Para la segunda muestra se detuvo el biorreactor a las 72 h, en la que la concentración de proteína fue de 1634 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, se prepararon dos concentraciones y el control bajo las condiciones antes descritas, se refrigeraron a $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su aplicación.

4 14 Selección de un grupo homogéneo en peso de las muestras de *Rhipicephalus microplus*.

Las hembras repletas colectadas se lavaron ligeramente con agua destilada, el número de la muestra fue de 615 unidades, la cuales se pesaron y distribuyeron como lo muestra el **Cuadro 17**. Las unidades que pesaron menos de 154 y más de 312 mg, se retiraron 99 unidades del bioensayo. El bloque homogéneo contenía un total de 516 hembras, para un total de 21 unidades experimentales. Permitiendo realizar los experimentos de contraste, esta muestra homogénea se distribuyó en placas de 24 pozos de forma completamente al azar.

Cuadro 17. Tabla de distribución de pesos de *Rhipicephalus microplus*.

Max=	410.8	Clase	Lim. Inf.	Lim. Sup.	Media	Frecuencia
Min=	15.5	1	15.5	55.0	35.3	3
Rango =	395.3	2	55.0	94.6	74.8	9
Num. Clase.	10.3	3	94.6	134.1	114.3	35
	10.0	4	134.1	173.6	153.9	81
Int. Cla =	39.5	5	173.6	213.2	193.4	142
		6	213.2	252.7	232.9	173
		7	252.7	292.2	272.4	120
		8	292.2	331.7	312.0	43
		9	331.7	371.3	351.5	9
		10	371.3	410.8	391.0	0
						615

En la **Figura 28** se puede observar que la muestra tiene una dispersión normal en peso, también los bloques que fueron eliminados y el grupo homogéneo, esta muestra homogénea se distribuyó en placas de 24 pozos de forma completamente al azar.

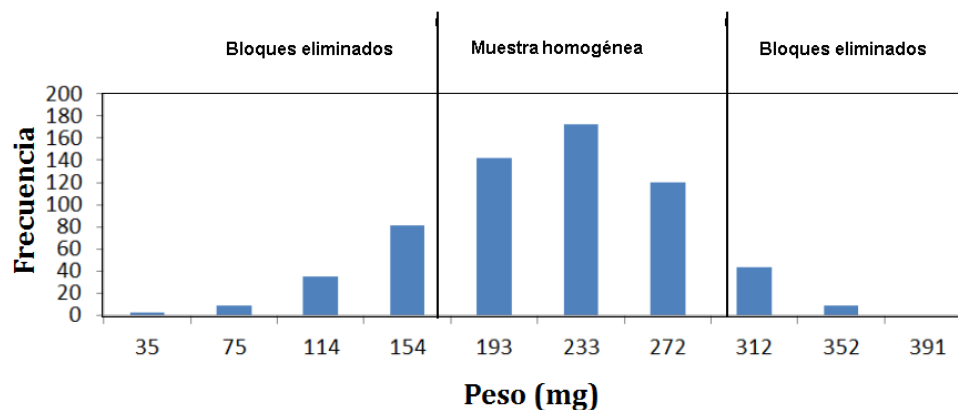


Figura 28. Distribución normal en peso de *Rhipicephalus microplus*.

Para el bioensayo de contraste se prepararon 15 unidades experimentales, para dos concentraciones y un blanco, por triplicado (50 y 300 mg/mL, la proteína fue obtenida por

fermentación a las 32 h y 72 h). El **Cuadro 18** se muestra los porcentajes de mortalidad causada por el complejo espora-cristal. La mayor actividad se observó en la concentración 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (72 h fermentación) con un valor del 75.00 % a los 14 días, valor que es 27.8 % mayor que la misma concentración a 36 horas de fermentación, de igual forma que la concentración de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (72 h fermentación) alcanzado una mortalidad 16.2 % mayor. Esta tendencia se presentó en todas las observaciones.

Cuadro 18. Patogenicidad del complejo espora-cristal de la cepa GP543 de *B. thuringiensis* sobre *R. microplus*.

$[\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}]$	Ocho días	Diez días	Doce días	Catorce días
300 (72 h)	22.22 \pm 0.00	40.00 \pm 0.00	62.22 \pm 0.00	75.00 \pm 4.81
300(36 h)	16.67 \pm 2.40	23.62 \pm 1.38	36.11 \pm 2.78	47.22 \pm 3.68
50 (72 h)	23.15 \pm 0.93	30.46 \pm 0.65	39.17 \pm 0.83	51.70 \pm 2.06
50 (36 h)	11.11 \pm 1.39	22.22 \pm 5.01	27.72 \pm 6.11	34.72 \pm 1.19
H ₂ O	0.00 \pm 0.00	2.78 \pm 4.72	5.56 \pm 3.67	10.28 \pm 0.65

Capítulo VI

Discusión

5. 1 De la Identificación molecular de la cepa GP543

La cepa GP543 es una bacteria de un gran interés en salud pecuaria y comercial, por lo que determinar de manera confiable su especie es imperante, ya que si su especie tuviera algún reporte como patógena a humanos o animales no sería aplicable en campo, al menos en su forma silvestre. Esta cepa bacteriana por sus características morfológicas, tales como, la formación de usos y estructuras celulares tipo cañas con bordes redondeados que pertenece al género *Bacillus* y la formación de cristales proteicos paraesporales sugiere que es la especie *B. thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis esta estrechamente relacionada con más de cinco especies bacterianas que no se pueden distinguir entre si claramente, entre ellas están: *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. firmus*, y *B. mycoides* entre otras. Una opción es emplear el gen marcador típico 16S rRNA. Sin embargo, múltiples reportes han concluido que este gen marcador no llega a definir claramente a la especie. Otra opción, el gen *gyrB*, que codifica para la subunidad B de la proteína girasa del ADN, y que ha mostrado poder llegar a nivel de especie en cepas del género *Bacillus* como un marcador filogenético alternativo (Wang *et al.*, 2007).

De esta forma, se secuencio el gen *gyrB* de la cepa GP543 de acuerdo a lo reportado por Yamamoto y Harayama (1995), para la identificación de especie y para el análisis filogenético. Durante la identificación la cepa GP543 tuvo identidad con miembros de la de especie *B. thuringiensis* tanto para genomas completos como para el gen *gyrB* en los datos de hibridación ADN-ADN. Los rangos de nucleótidos *gyrB* y las similitudes de secuencia de aminoácidos traducidas entre las cuatro cepas con mayor identidad fueron del 99.58% respectivamente como lo muestra el **Cuadro 6**. Los resultados mostraron que las secuencias

del gen *gyrB* proporcionan una alta resolución. Concluyendo que cepa GP543 pertenece a la especie *B. thuringiensis*.

5. 2 Análisis filogenético de la cepa GP543 gen *gyrB*

El árbol filogenético de la cepa GP543 de *B. thuringiensis* se decidió realizar con la matriz Neighbor Joining, por que agrupa los taxones con distancias evolutivas más cercanas y podemos comparar cepas del género *Bacillus* con distintos orígenes geográficos como lo reportado por Chen y Tsen (2002). De esta forma el árbol creado con la base de datos del NCBI compara entre más de 100 cepas de genero *Bacillus*.

El árbol filogenético muestra cuatro grupos, el primero únicamente con cepas de *B. cereus*, seguido de la cepa GP543 y luego otro grupo de *B. cereus*. Los otros grupos están mezclados entre *B. thuringiensis*, *B. cereus* y *B. mycooides*. Esta posición de la cepa GP543 muestra que ha evolucionado de forma muy emparentada a *B. cereus* como lo muestra la **Figura 4**, por esta razón es tan difícil distinguir entre ellas. Sin embargo, al sumar las distancias evolutivas horizontales el recorrido de la cepa GP543 hacia *B. thuringiensis* es menor a 0.02 por lo que se trata de una cepa de *B. thuringiensis*.

La amplificación del gen *gyrB* es de 1260 pb y el producto de la secuenciación del gen *gyrB* de la cepa GP543 es de 689 pb, sería deseable secuenciar el gen completo para reforzar estos resultados. Preferentemente, el genoma completo daría pie a nuevas investigaciones con este tipo de cepas que son diferentes a todo lo que se ha estudiado de *B. thuringiensis*.

5. 3 Análisis del perfil proteico de la cepa GP543 en geles de SDS-PAGE

Uno de los objetivos fue determinar en qué etapa de la cinética de crecimiento se produce la proteína S-layer y si era secretada al medio de cultivo como lo describe la literatura. Con base en lo reportado por Adames (2010), sabíamos que es cristalizada en la esporulación, pero no en qué fase de desarrollo se sintetiza, ya que las proteínas Cry se sintetizan en la fase de esporulación, podría ser un mecanismo parecido. Mediante una cinética de crecimiento en medio líquido, por centrifugación se separó la biomasa antes de la esporulación y el sobrenadante, como se observa en la **Figura 5**. Esto confirma que la proteína S-layer se sintetiza durante la fase vegetativa y que es intracelular y soluble durante las primeras horas del cultivo.

5. 4 Caracterización cinética de la proteína toxica de la cepa GP543 en fermentador

Para determinar claramente la fase de síntesis de la proteína toxica, se inmunodetectó mediante un anticuerpo policlonal específico anti-S-layer, como se observa en el Western de la **Figura 7**, se detecta una proteína del tipo S-layer cercana a los 100 kDa, que hemos denominado GP543-SL. Esta se sintetiza desde las primeras horas de cultivo y tiene su máxima concentración cercana a las 10 horas, posterior a esta, la concentración disminuye y se detectan otras bandas de menor peso, podrían ser fragmentos de la proteína de 100 kDa ya que el anticuerpo las reconoce.

5. 5 Caracterización de la cepa GP543 de *Bacillus thuringiensis* en fermentador

En los últimos 100 años, la producción de *B. acillus thuringiensis* se ha basado en cepas que expresan proteínas relacionadas con la esporulación (proteínas Cry y Cyt) pero con una baja producción de esporas y proteínas. Incluso en un proceso con alto rendimiento, como es el Fed-Batch, ya que se enfocan en la fase de crecimiento exponencial, solo aumenta la

biomasa y no la síntesis de cristales proteicos. Aunque la biomasa aumenta, los efectos de la comunicación celular disminuyen la síntesis de proteínas durante la esporulación (López-López y De la Torre, (2005). Un segundo enfoque es alimentar durante la fase estacionaria (esporulación) para redireccionar el metabolismo, lo que aumenta la síntesis, pero la síntesis aún permanece en un nivel bajo (Khodair *et al.*, 2008; Mignone *et al.*, 1993). Este es el primer reporte de la producción de una proteína de tipo S-layer que se sintetiza durante la etapa vegetativa, presenta una asociación con la duplicación celular, que es responsable de la toxicidad y la formación de inclusiones de cristales proteicos. Aunque hay otras proteínas que se sintetizan durante la fase vegetativa (VIP y SIP), estas proteínas son solo cofactores de virulencia (Chakroun *et al.*, 2016; Palma *et al.*, 2014), que son solubles y pueden ser secretadas pero no forman inclusiones cristalinas proteicas.

Como la mayoría de las cepas de *B. thuringiensis*, la cepa GP543 muestra una baja conversión de glucosa a biomasa, apenas alcanza $X_{\max} = 1.5 \text{ gDW}\cdot\text{L}^{-1}$ de los $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucosa del medio, con un rendimiento del $Y_{X/S} = 0.17 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$. Sin embargo, *B. thuringiensis* regularmente tiene una baja conversión de la fuente de carbono en biomasa. En los reportes de procesos alimentados tipo Fed-Batch se ha logrado modificar el perfil metabólico aumentando la síntesis de proteínas, aunque de forma limitada; muestran una posible represión por catabolito de carbono. La cepa GP543 no es un caso aislado, la mayoría de las cepas silvestres o modificadas tienen un metabolismo oxidativo bajo, por lo que para incrementar la biomasa se ha recurrido a diseños de medios cargados de los reactivos limitantes comunes. Podemos ver medios que varían de 10 a $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucosa y extracto de levadura (que puede utilizarse como fuente de carbono), entre 3 y $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ con resultados de baja biomasa y peor rendimiento. Incluso aplicando diseños estadísticos experimentales o análisis de superficie de respuesta a los componentes del medio de cultivo. Por otro lado, los esfuerzos para mejorar el metabolismo a través de la oxigenación han llevado a un pequeño aumento en la biomasa (Boniolo *et al.*, 2012). Al mantener una alta oxigenación de al menos el 50%, mejora el metabolismo celular y produce un ligero aumento en la biomasa de $2.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, aunque esto incrementa el costo a gran escala. Sin

embargo, la alta oxigenación durante la esporulación disminuyó la toxicidad y cuando se aplica una baja oxigenación durante la fase de esporulación, la toxicidad aumenta considerablemente, por lo que el control de oxigenación requiere un balance fino. Pero la inversión en nutrientes continúa siendo muy alta es muy alta de 30 g·L⁻¹ de glucosa y 12 extracto de levadura g·L⁻¹. Esto sugiere que la mayoría de las cepas de *B. thuringiensis* tienen un tipo de metabolismo de Crabtree, ya que, a altas concentraciones de glucosa, incluso con alta oxigenación, tiene valores bajos de biomasa y además la formación de subproductos no deseados de la fermentación.

Bacillus thuringiensis es una bacteria cosmopolita que se ha aislado de diversos nichos, el más común es de suelos, sin embargo, las cepas con mayor actividad tóxica proviene de cadáveres de insectos. Por lo tanto, el ciclo de vida natural se encuentra en la hemolinfa del insecto; en la que la concentración de carbohidratos es baja, por lo que requiere metabolizar otras fuentes de carbono, como el de las proteínas, es un proceso lento que evita la represión por catabolito de carbono. Una pista de este metabolismo se observa en las investigaciones con medios de cultivo alternativos en los que se utilizan residuos industriales como la carne de pescado o camarón como sustrato, en donde si la biomasa máxima obtenida es baja, al comparar con el rendimiento ($Y_{X/S}$) muestran una buena conversión a biomasa (Zouari *et al.*, 1999). Este mismo efecto puede observarse en cultivos con subproductos industriales como medios basados en “melaza” de caña de azúcar que contienen 50 g·L⁻¹ como fuente de carbono y se complementa con 50 g·L⁻¹ de harina de soja como la fuente de nitrógeno. Con este medio, se obtuvo un $X_{max} = 3$ gDW·L⁻¹ con un rendimiento de $Y_{X/S} = 0.06$ g·g⁻¹, una pobre conversión de biomasa del 6% además, sin contar la soja, un comportamiento típico de *B. thuringiensis* mal aprovechamiento de la fuente de carbono. Otro medio de cultivo se basó en el suero de queso suplementado con 15 g·L⁻¹ sacarosa como fuente de carbono, alcanzó una biomasa máxima de $X_{max} = 6$ gDW·L⁻¹ con un rendimiento de $Y_{X/S} = 0.4$ g·g⁻¹, duplicando así la biomasa con tres veces menos fuente de carbono (Magallon *et al.*, 2015). El suero de queso contiene lactosa de 4,5 a 5,3 g·L⁻¹ y β-D-galactopiranosilo, que no causa inhibición por la represión del catabolito de carbono y

permite que se logre una mayor biomasa. Aun así, la mayoría de las proteínas estudiadas y producidas por *B. thuringiensis* están relacionadas con la fase de esporulación del cultivo, donde los nutrientes se han agotado y los únicos recursos disponibles son intracelulares y compiten con la síntesis del cristal y la generación de la espora.

La cepa GP543 expresa su proteína toxica durante la fase vegetativa, por lo que, los cultivos de alta eficiencia con una baja concentración de glucosa (Fed-Batch) serían una alternativa para regular la inhibición por catabolito de carbono estimulando la síntesis de esta proteína, siempre y cuando la producción de esta proteína esté asociada al crecimiento, por lo que fue uno de los objetivos de esta investigación. Ya se han desarrollado estrategias de alimentación en Fed-Batch que han permitido alcanzar una biomasa de $X_{\max} = 72 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Kang *et al.*, 1992). Independientemente del aumento de la biomasa, la relación estricta entre la síntesis de proteínas tóxicas y la esporulación ha restringido el uso de procesos de alto rendimiento, lo que le da una ventaja a la cepa GP543.

Las proteínas S-layer, son las más abundantes en bacterias y arqueas, son sintetizadas durante la fase vegetativa. La presencia de proteínas S-layer toxicas y formadoras de cuerpos de inclusión paraesporales, como es caso la cepa GP543 de la especie *B. thuringiensis* podría estar relacionado al nicho ecológico donde se encuentran. Por lo que, las cepas productoras de proteínas S-layer toxicas provenientes de cadáveres, la toxicidad puede ser especifica al hospedero (Daamgard, 2000). Aún más, estas son un grupo nuevo que no se ha explorado y comercializado que podrían ser una alternativa a las proteínas Cry y con la aplicación de modelos de alta densidad celular podrían competir en costos con los productos químicos. Por lo que fue importe en este proyecto establecer la factibilidad de estos procesos de alto rendimiento, el primer paso fue determinar la relación de producción y duplicación celular, medida por Luedeking y Piret (1959). Mediante un modelo logístico de crecimiento se calcularon los parámetros cinéticos con gran precisión para el crecimiento, la producción y el consumo de carbohidratos. Estos valores se utilizaron para resolver la ecuación de Luedeking y Piret, que mostró un coeficiente de producción

asociado con un crecimiento de $\alpha = 0.033$ y un coeficiente de producción no asociado con un crecimiento de $\beta = 0.001$, debido a que la proteína S-layer GP543-SP tiene una importante tasa de formación durante el crecimiento exponencial y una pequeña tasa durante la fase estacionaria, este es el primer informe de estos valores para una proteína S-layer tóxica de *Bacillus thuringiensis*, por lo que no se pudieron hacer comparaciones de rangos.

La velocidad de formación de la proteína GP543-SL se relaciona directamente con la velocidad de crecimiento específica $\mu = 0,42 \text{ h}^{-1}$, además, α y β permanecen constantes durante su fase de cultivo con un $R^2 = 0.9$. Tal vez debido a que la proteína GP543-SL tiene una función estructural importante en la membrana celular, pero esta cepa forma cuerpos proteicos cristalinos, el rendimiento $Y_{X/S} = 0.14$, Figura 6, muestra que la concentración de proteína por gramo de biomasa se mantiene constante durante la fase exponencial y aumenta ligeramente en la fase estacionaria, ya que la síntesis de esta proteína continúa incluso en la fase estacionaria, lo que concuerda con los valores α y β . La misma tendencia se puede observar con la detección de Western blot (Figura 7) en la que se observó la síntesis desde las primeras horas de crecimiento vegetativo y en la que alcanzó la concentración más alta, pero la proteína GP543 SL sigue siendo visible durante toda la fermentación, para las últimas horas de cultivo el Western blot detecta un bandeo de bajo peso molecular, estas podrían ser que la proteína se está fragmentado. Algunas proteínas de Bt requieren una activación por la acción de enzimas metaloproteasas, en caso de las proteínas S-layer no conocemos el mecanismo de acción, podría requerir de una activación previa, pero la proteína de 100 kDa y los fragmentos se cristalizan en un cuerpo de inclusión proteico.

La cepa GP543 de *B. thuringiensis* se aisló de un cadáver de *R. microplus* y sintetiza una proteína de tipo S-layer que forma inclusiones de cristales paraesporales. Mostrando patogenicidad en bioensayos a hembras repletas de *R. microplus*, se observaron mortalidades superiores al 75% con $200 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y al 60% con $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Además, la

proteína S-layer causó una disminución en la oviposición de un 13% de inhibición, esta inhibición es un síntoma inicial de un efecto drástico en la inhibición a la eclosión de los huevos ovipositados, desde la concentración más baja se alcanza de un 85 a 92% de inhibición de la eclosión. La cepa GP543 de *B. thuringiensis* podría ser una alternativa para controlar *R. microplus* sin el uso de control químico clásico, ya que se puede producir masivamente.

XI Literatura citada

- Abbas, R. Z., Zaman, M. A., Colwell, D. D., Gilleard, J., & Iqbal, Z. (2014). Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. *Veterinary parasitology*, 203(1-2), 6-20.
- Adames M. 2010. Patogenicidad y virulencia de cepas de *Bacillus thuringiensis* e interacción con *Metarhizium anisopliae* sobre *Boophilus microplus*. **Tesis de Doctorado**. Programa de Ciencias Naturales, Centro de investigaciones en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 47-87.
- Andrade A.E., Tridade, G.V., Hernan C.R.J., Lopes J. 2015. Utilisation of response surface methodology to optimise the culture medium for *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. **Biocontrol sci techn.** **25:4**, 414-428.
- Almazán C., Lagunes R., Villar M., Canales M., Rosario-Cruz R., Jongejan F., de la Fuente J. 2010. Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. **Parasitol Res.** **6:471-497**.
- Alonso-Días M.A. Acosta R.R. 2004. Estrategias de control de la garrapata *Boophilus microplus* en la ganadería bovina. UNAM. Fac. de medicina Veterinaria y Zootécnica. Centro de Enseñanza, Investigación y extensión en ganadería tropical. Rancho el "Clarín". 12º día del ganadero. H. Tlapacoyan, Veracruz, México. **Boletín informativo**.
- Alonso-Días M.A., García L., Galindo-Velasco E., Lezama-Gutierrez R., Angel-Sahagún C.A., Rodríguez-Vivas R.I., Fragoso-Sánchez H. 2007. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. **Vet Parasitol.** **147:336-340**.
- Amicarelli A., Sciascio F.D., Toibero J.M., Alvarez H. 2009. Including dissolved oxygen dynamics into the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins production process model and its application to process control. **Braz J Chem Eng.** **27(01):41-62**.
- Anderson R.K.I., Jayaraman K. 2005. Impact of balanced substrate flux on the metabolic process employing fuzzy logic during the cultivation of *Bacillus thuringiensis* var. *Galleriae*. **World J Microb Biot.** **21:127-133**.

- Anderson R.K.I., Jayaraman K., Voisard D., Marison W.I., Stockar V.U. 2002. Heat flux as an on-line indicator of metabolic activity in pilot scale bioreactor during the production of *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae*-based biopesticides. **Thermochim Acta.** **19**:127–138.
- Arcas J., Yantorno Q., y Etrola R. 1987. Effect of concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* cultures. **Biotechnol Lett.** **9 (2)**:105-110.
- Aslim B., Yuksekdag Z.N., Beyatli Y. 2002. Determination of PHB growth quantities of certain *Bacillus* species isolated from soil. **Turk Electron J Biotechnol.** 24-30.
- Atehortúa P., Álvarez H., Orduz S. 2007. Modeling of growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* in an intermittent fed batch culture with total cell retention. **Bioproc Biosyst Eng.** **30**:447-456.
- Avignone-Rossa C., Mignone C.F. 1995. *Bacillus thuringiensis* growth and toxicity. Basic and applied considerations. **Mol Biotechnol.** **4**:55-71.
- Baffi M. A., de Souza G. R. L., Vieira C. U., de Sousa C. S., Goullart L. R., y Bonetti A. M. (2007). Identification of point mutations in a putative carboxylesterase and their association with acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary parasitology*, 148(3-4), 301-309.
- Beegle C.C., Yamamoto T. 1992. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner Research and Development. **Can. Entomol.** **124**: 587-616.
- Berbert-Molina M.A., Prata A.M.R., Pessanha L.G., Silveira M.M. 2008. Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* growth on high glucose concentration. **J Ind Microbiol Biotechnol.** **35**:1397–1404.
- Box, G. E., Hunter, J. S., & Hunter, W. G. (2008). Estadística para investigadores. Editorial Reverté.

- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** **72**:248-254.
- Bull M.S., Swindale S., Overend D., Hess E.A. 1996. Survey of *Boophilus microplus* populations with fluzuron an acarine growth regulator. **Aust Vet J.** **74(6)**: 468-470.
- Céspedes N.S., Vargas M.S., Sánchez, H.F., Vásquez, Z.G. 2002. Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en **México. Téc. Pec. Mex.** **40(1)**: 8192.
- Chang M., Zhou S.G., Lu N., Ni J.R. 2008. Starch processing wastewater as a new medium for production of *Bacillus thuringiensis*. **World J Microb Biot.** **24**:441-447.
- Chen, M. L., y Tsen, H. Y. (2002). Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *Journal of Applied Microbiology*, **92(5)**, 912-919.
- Cooper Mc.D., Robertson L.T.D. 1974. Control de las garrapatas del ganado vacuno. **Berkhamsted.** 66-68.
- Cordero del Campillo M., Rojo F., Martínez A., Sánchez M., Hernández S., Navarrete I., Díez P., Quiroz H., Carvalho M. (1999). Parasitología Veterinaria. 1a ed. Madrid: McGraw Hill, pp. 968.
- Chul B.K., Yup S.L., NAM h.C. 2001 Enhanced spore production of *Bacillus thuringiensis* by Fed-Batch culture. **Biol letters.** 721-726.
- Dang V.K., Tyagi R.D., Valero J.R., Surampalli R.Y. 2009. Impact of different pH control agents on biopesticidal activity of *Bacillus thuringiensis* during the fermentation of starch industry wastewater. **Bioproc Biosyst Eng.** **32**:511–519.
- Drummond R.O. Whetstone T.M. 1970. Oviposition of the cayenne tick, *A. cajennense*, in the laboratory. **T AM Entomol Soc.** **68 (2)**: 214-216.
- Difco. 1977. Manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures. **Difco Laboratories Incorporated**, (9th Ed). 451-452.

- Engelhardt H. 2007. Are S-layers exoskeletons? The basic function of protein surface layers revisited **J Struct Biol.** **160**: 115–124.
- Federici B.A. 2005. Insecticidal bacteria: An overwhelming success for invertebrate pathology. **J Inver Pathol.** **89**: 30-38.
- Feitelson J.S., Payne J., Kim L. 1992 *Bacillus thuringiensis* insects and beyond. **Biotechnology.** **10**: 271-275.
- Farrera R.R., Pérez-Guevara F., de la Torre M. 1998. Carbon:nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis*. HD-73. **Appl Microbiol Biotechnol.** **49**: 758-765.
- Fernández-Ruvalcaba M., Peña-Chora M., Romo-Martínez A., Hernández-Velázquez V., la Parra A.B., de la Rosa D.P. 2010. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* pathogenicity for a strain of the tick, *Rhipicephalus microplus*, resistant to chemical pesticides. **J Insect Sci.** **10**: 186.
- Galindo E. 1996. Traslación de escala. **Notas del XXI Curso Latinoamericano de Ingeniería Bioquímica**, Valparaíso, Chile, 231-252.
- Guglielmone A. A., Robbins R. G., Apanaskevich D. A., Petney T. N., Estrada-Peña A., Horak I. G., y Barker S. C. (2010). **The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names.** *Zootaxa*, 2528(6), 1-28.
- Higa, L. D. O. S., Piña, F. T. B., da Silva Rodrigues, V., Garcia, M. V., Salas, D. R., Miller, R. J., ... & Andreotti, R. (2020). Evidence of acaricide resistance in different life stages of *Amblyomma mixtum* and *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) collected from the same farm in the state of Veracruz, Mexico. *Preventive veterinary medicine*, 174, 104837.
- Hugh-Jones M. 1991. The remote recognition of ticks habitats. **J Agric Entomol.** **8(4)**: 309-315.
- Holmberg A., Sievänen R. 1980. Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for exotoxin production: process analysis study. **Biotechnol Bioeng.** **22**: 1707–1724.

- Khedher S. B., Kamoun A., Jaoua S., Zouari N. 2011. Improvement of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide production by sporeless and sporulating strains using response surface methodology. **New Biotechnol.** **28**: 6.
- Khodair T.A., Abdelhafez A.A.M., Sakr H.M., Ibrahim M.M.M. 2008. Improvement of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide production by fed-bach culture on low cos effective medium. **Res j Agric Biol Sci.** **4(6)**: 923-935.
- Korz D.J., Rinas U., Hellmuth K., Sanders E.A., Deckwer W.D. 1995. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. **J Biotechnol** **39**: 59-65.
- Kraemer A.S., Moser A. 1996. Kinetic study of *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis* in lab. scale Batch process. **Bio Eng.** 139-144.
- La Duc, M. T., Satomi, M., Agata, N., & Venkateswaran, K. (2004). *gyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis*–*cereus*–*thuringiensis* group. *Journal of microbiological methods*, *56*(3), 383-394.
- Lecadet M.M., Blondel M.O., Ribier J. 1980. Generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* 1715, using bacterial phage CP54 Ber. **J Gen Microbiol.** **121**: 203-212.
- Lereclus D., Agaisse H., Gominet M., Salamitou S., Sanchis V. 1996. Identification of a gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. **J Bacteriol.** **178**: 2749-2756.
- Li A.Y., Davey R.B., Miller R.J., George J.E. 2003. Resistance to coumaphos and diazinon in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) and evidence for involvement of an oxidative detoxification mechanism. **J Med Entomol** **40(4)**: 482-490.

- López-y-López, V. E., y De la Torre, M. (2005). Redirection of metabolism during nutrient feeding in fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. **Applied microbiology and biotechnology**, 67(2), 254-260.
- Luedeking, R., & Piret, E. L. (1959). A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, 1(4), 393-412.
- Luong J.T., Mulchandini A., LeDuy A. 1988. Kinetics of biopolymer synthesis: a revisit. **Enzyme Microb Tech**, 10: 326-322.
- Miranda L. 1998. Evaluación de cepas mutantes de *Azotobacter vinelandii* en la producción de alginato. **Tesis de ingeniería Química**. Facultad de Ciencias Químicas e Ingenierías, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 32-45.
- Mignone C.F. 1993. A simple method for designing Fed-Batch cultures with linear gradient feed of nutrients. **Process Biochem**. 28: 405-4 10
- Muley R., Sarkar S., Aurunkumar B., Narayanam M., Naik S. 1999. Scale-up approach for fermentation production of *Bacillus thuringiensis* var *Kenyae* based biopesticide. **J Sci Ind Res**. 58(10): 781-784.
- Nava, S., Venzal, J. M., Acuña, D. G., Martins, T. F., & Guglielmone, A. A. (2017). Ticks of the southern cone of America: diagnosis, distribution, and hosts with taxonomy, ecology and sanitary importance. Academic Press.
- Navarro A.K., Farrera R.R., Lopez R., Perez-Guevara F. 2006. Relationship between poly- β -hydroxybutyrate production and δ -endotoxin for *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Biotechnol Lett** 28:641–644.
- Navarro-Mtz A. K., Pérez-Guevara F., 2014. Construction of a biodynamic model for Cry protein production studies. **AMB Express**. 4:79.

Neighbor Joining (Saitou N and Nei M, Mol Biol Evol, 4:406-25, 1987 PMID: 3447015)

Osorio M.J., 1989. Efecto de diferentes concentraciones de deltametrina sobre 6 cepas de ixodidos mediante la prueba de establo con cámaras. Tesis de licenciatura en Biología. Facultad de Biología Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 80

Park Y.S., Kai K., Iijima S., Kobayashi T. 1999. Enhanced B-galactosidase production by high cell-density culture of recombinant *Bacillus subtilis* with glucose concentration control. **Biotechnol Bioeng** 40: 686-696.

Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., y Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*, 6(12), 3296-3325.

Peña C. 1998. Producción de alginatos bacterianos por fermentación líquida: estudio de los factores determinantes en la biosíntesis y composición del alginato producido por *Azotobacter vinelandii*. **Tesis de Doctorado**. Instituto de Biotecnología. UNAM.

Peña G., Miranda-Rios J., de la Riva G., Pardo-López L., Soberón M., Bravo A. 2006. A *Bacillus thuringiensis* S-Layer Protein Involved in toxicity against *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). **Appl Environ Microb**. 1: 353-360.

Peter R.J., Bossche V., Penzhorn P., Sharp B. 2005. Tick, fly, and mosquito control-lessons from the past, solutions for the future. **Vet Parasitol** 132: 205-215.

Popovic M., Liu W.M., Iannotti E.L., Bajpai R.K. 2001. A mathematical model for vegetative growth of *Bacillus thuringiensis*. **Eng Life Sci**. 8:85-90.

Prabakaran G., Hoti S.L. 2008. Influence of amino nitrogen in the culture medium enhances the production of δ -endotoxin and biomass of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the large-scale production of the mosquito control agent. **J Ind Microbiol Biotechnol** 35:961-965.

Quintero R.R. 1990. Ingeniería bioquímica Teoría y aplicaciones. **Alambra mexicana**. 97-113.

- Ramírez R, (2017). Identificación de nuevos antígenos con potencial inmunoprotector en tejidos de intestino y ovario de la garrapata del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, a través de un enfoque inmunoproteómico. (Tesis de Doctorado) CENTRO DE INVESTIGACION Y ASISTENCIA EN TECNOLOGIA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
- Rivera D., Margaritis A., De Lasa H. 1999. A sporulation kinetic model for batch growth of *B. thuringiensis*. **Can J Chem Eng.** **77**:903–910.
- Rogoff M.H., Yousten A.A. 1969. Metabolism of *Bacillus thuringiensis* in relation to spore and crystal formation. **J. Bacteriol.** **100**: 1229-1236.
- Rodríguez M.M., de la Torre M. 1996. Effect of the dilution rate on the biomass yield of *Bacillus thuringiensis* and determination of its rate coefficients under steady-state conditions. **Appl Microbiol Biotechnol.** **45**:546–550.
- Rodríguez Vivas R.I., Rosado Agilar A., Basto-Estrella G., García-Vázquez Z., Rosario- Cruz., Fragoso-Sanches H. 2006. Manual técnico para el control de garrapatas en el ganado bovino. **IFARVETUDY-SAGARPA-INIFAP.**
- Romo, M. 2011. Evaluación de productos naturales de origen natural para el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) en bovinos infestados artificialmente. **Tesis de maestría**, facultad de agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Travis G., Caradus J., Gelernter W., Jackson T., Keyhani N., Köhl J., Marrone P., Morin L., Stewart A., 2012. Have biopesticides come of age?. **Trends Biotechnol.** **5**: 250-258.
- Sara M., Sleytr B. U. 2000. S-layer proteins. **J Bacteriol.** 859-868.
- SAGARPA-SEMACICA 2013: Campaña nacional contra la garrapata *Boophilus* en México. [Revisión]. Extraída el 23 de junio, 2013 del sitio web: http://senasicaw.sensica.sagarpa.gob.mx/portal/html/saludanimal/campanas_zoosanitarias/campana_nacional_cont--ra_la_garrapata_boophilus_en_mexico.html.
- Soberanes-Céspedes N., Santamaría-Vargas M., Fragoso-Sánchez H. y García-Vázquez Z. 2002. Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. **Téc. Pec. Mex.** **40**(1):8192.

- Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiol Mol Biol R.** **62**: 775-806.
- Seeger A., Schneppe B., McCarthy J.E.G., Deckwer W.D., Rinas U. 1995. Comparison of temperature- and isopropyl-P-D-thiogalacto-pyranoside-induced synthesis of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. **Enzyme microb tech.** **17**:947-953.
- Siqueira F.B., Cardoso R.R., Ramalho P.A.M., López M.L., Jacinto T., Moura S.M., Berbert-Molina M.A. 2011. Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentations: Bringing new insights on their impact on sporulation and δ -endotoxin production. **Appl Microbiol Biotechnol.** DOI 10.1007/s00253-011-3746-9.
- Suárez, M.P., Méndez, M.L., Valdez, M., Souza, M.R., Camargo, A.R., Vargas, N.M. y Ascanio, E. 2007. Control de *R. microplus* en la ganadería cubana y en regiones de Latinoamérica con la aplicación del inmunógeno Gavac dentro de un programa de lucha integral. Red Electrónica de Garrapatas y Enfermedades Transmitidas por Garrapatas para América Latina y el Caribe, **Red Ectopar. Sexta Conferencia Electrónica.** 1-17.
- Vimala D.P.S., Ravinder T., Jaidev C. 2005. Cost-effective of production of *Bacillus thuringiensis* by solid-state fermentation. **J Invertebr Pathol.** **88**: 163–168.
- Wang, L. T., Lee, F. L., Tai, C. J., y Kasai, H. 2007. Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **57**(8), 1846-1850.
- Weiss M., Ollis D.F. 1980. Extracellular microbial polysaccharides I. Substrate, biomass and product kinetic equations for batch gum fermentation. **Biotechnol Bioeng.** **12**: 854-873.
- Yamada, S., Ohashi, E., Agata, N., & Venkateswaran, K. (1999). Cloning and nucleotide sequence analysis of gyrB of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B.*

anthracis and their application to the detection of *B. cereus* in rice. **Appl. Environ. Microbiol.**, **65**(4), 1483-1490.

Yamamoto and Harayama. 1995. PCR Amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains.

Yeruham I., Hadani A., Galker F. 1998. Some epizootiological and clinical aspects ovine babesiosis cauded by *Babesia ovis*. **Vet Parasitol** **74**: 153-163.

Yeza A., Tyagi R.D., Valéro R.J., Surampalli Y.R., Smith J. 2004. Scale-up of biopesticide production processes using wastewater sludge as a raw material. **J Microbiol Biotechn.** 1850-1857.

Yeza, A., Tyagi, R.D., Valéro, R.J. y Surampalli, Y.R. 2005. Bioconversion of industrial wastewater and wastewater sludge into *Bacillus thuringiensis* based biopesticides in pilot fermentor. **Bioresource Technol.** 1850-1857.

Yeza A., Tyagi R.D., Valéro R.J., Surampalli Y.R. 2005. Influence of pH control agents on entomotoxicity potency of *Bacillus thuringiensis* using different raw materials. **World J Microb Biot.** **21**: 1549–1558.

OPEN

Mass production of a S-layer protein of *Bacillus thuringiensis* and its toxicity to the cattle tick *Rhipicephalus microplus*

Caleb C. Lormendez¹, Manuel Fernandez-Ruvalcaba², Markis Adames-Mancebo¹, Victor Manuel Hernandez-Velazquez¹, Fernando Zuñiga-Navarrete³, Gabriela Flores-Ramirez³, Laura Lina-Garcia¹ & Guadalupe Peña-Chora ^{4*}

The most commonly used biopesticides to control agricultural, forest and insect vectors of human diseases are derived from the bacterium *Bacillus thuringiensis*, which begins to produce Cry and Cyt insecticidal proteins during the onset of the sporulation phase. Some *B. thuringiensis* strains also produce S-layer proteins that are toxic to certain pests. S-layer proteins are the most abundant proteins in bacteria and archaea. This proteins' key trait to design high performance processes for mass production is their continuous expression during the vegetative phase, unlike Cry and Cyt, which are restricted to the sporulation phase. In this work, a S-layer protein expressed by the GP543 strain of *B. thuringiensis* that is toxic to the cattle tick *Rhipicephalus microplus* was mass produced using the batch culture fermentation technique. In addition, the spore-protein complex showed a mortality rate of 75% with a dose of 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ on adult females of *R. microplus* after fourteen days. The lethal concentration 50 was 69.7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The treatment also caused a decrease of 13% in the weight of the mass of oviposited eggs with 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of the spore-protein complex and inhibition of the hatching of eggs from 80 to 92%. Therefore, this could be a good option for controlling this parasite. The advantages of S-layer protein synthesis are focused on the production of a new generation of proteins in pest control. This is the first report on the mass production of an S-layer protein that is responsible for toxicity.

B. thuringiensis has 57% of the world's biopesticide market, and it is by far the best alternative to chemical insecticides for pest control¹ with the advantage of being safe to non-target organisms. The production of *B. thuringiensis* in bioreactors has been performed just with a few strains that synthesize δ -endotoxins, which comprise two family proteins, Cry and Cyt, that crystallize in parasporal bodies and have widespread activity against insect pests. However, in the majority of the strains, protein synthesis is related to the sporulation phase². Additionally, spores and Cry protein yields are usually low³, so they often cannot compete with chemical insecticides. Furthermore, some strains express other protoxins in the vegetative phase (VIP, β -exotoxins and S-layer), and some virulence factors have synergism with the Cry proteins, thereby increasing toxicity to its host⁴.

S-layer proteins are most abundant in archaea and bacteria; the first report demonstrating that a S-layer protein was involved in toxicity to an insect pest was against *Epilachna varivestis*⁵, and this S-layer protein represented a new group of proteins that could be used in insect pest control. The importance of this kind of protein is that it is expressed in the vegetative phase. This could have favourable implications in mass production, such as the design of a fed-batch process and the modification of feeding rates of carbon sources to overcome catabolite repression and enhance the production of the S-layer protein⁶ without using modified organisms. This research

¹Universidad Autonoma del Estado de Morelos, Centro de Investigacion en Biotecnologia, Av. Universidad 1001, Colonia Chamilpa, CP 62209, Cuernavaca, Morelos, Mexico. ²Centro Nacional de Investigaciones en Parasitologia Veterinaria INIFAP, Km. 11.5 Carretera Federal Cuernavaca, Cuautla, Col. Progreso, Jiutepec, Morelos, CP 62550, Mexico. ³Institute of Virology, Biomedical Research Center, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská Cesta 9, 845 05, Bratislava, Slovakia. ⁴Universidad Autonoma del Estado de Morelos, Centro de Investigaciones Biologicas, Avenida Universidad 1001, Colonia Chamilpa, CP 62209, Cuernavaca, Morelos, Mexico. *email: penacg@uaem.mx

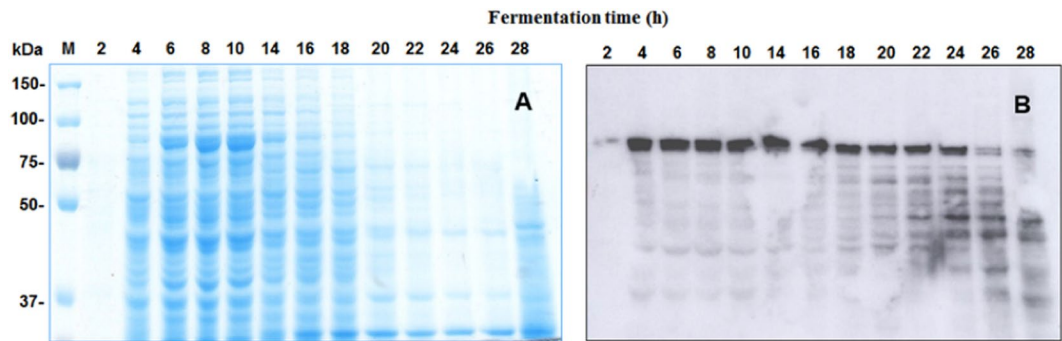


Figure 1. Protein profile synthesized during kinetic growth of the GP543 strain grown in GYS medium. Samples of culture from a batch fermentation were taken every two hours until 28 hours of culture was reached. The samples were resolved by SDS-PAGE in duplicate: (A) protein profile in SDS-PAGE gel stained with Coomassie blue (B) Western blot analysis using a specific anti-S-layer antibody detected the production of the S-layer protein (around 100 kDa).

was focused on the production of the S-layer protein by batch fermentation with the strain *B. thuringiensis* GP543 that synthesizes it in parasporal crystalline inclusions; this protein has toxic activity *in vitro* and *in vivo* against adult females of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*⁷.

R. microplus is the most harmful ectoparasite affecting the livestock industry and is widely distributed in tropical and subtropical areas⁸. This tick is a vector of protozoa, spirochaetes, rickettsiae and viruses that cause diseases in livestock, humans and companion animals. It is controlled by chemical acaricides, but it has developed resistance⁹, and some strains are multiresistant^{10–12}. Therefore, it is of great interest to develop a bioacaricide for the control of this pest, which has lost sensitivity to chemical products. In concordance, the S-layer protein produced by the strain GP543 of *B. thuringiensis* has shown toxic activity to *R. microplus* and could be an option for chemical acaricides.

Results

Identification of the S-layer protein from the GP543 *Bacillus thuringiensis* strain. The protein profile was analysed with respect to the kinetics of bacterial growth using SDS-PAGE gels in denaturing conditions. Samples from every two hours of fermentation were run in duplicate (Fig. 1A) and one gel was stained with Coomassie blue while the other (Fig. 1B) was transferred to PVDF membrane for western blot detection. The protein of interest (close to 100 kDa, GP543-SL) was observed at the first hours of vegetative growth, reaching a maximum at hour 10 coinciding with the beginning of the sporulation and crystalline inclusions formation processes. The band of around 100 kDa was analysed by MALDI-TOF mass spectrometer and the MASCOT search results indicated that the peptide mass fingerprinting (PMF) of the sequenced protein is 58% similar to a S-layer protein from *Bacillus thuringiensis* (AAY28601.1) (Supplemental 1). This band was also the predominantly detected in the Western blot assay performed with a S-layer antibody (Fig. 1B).

After 14 hours of culture, the 100 kDa protein began to degrade and the degradation products coincided with the detection of several bands of low molecular weight in the Western blot (Fig. 1B). In addition, this result confirms that the protein is continuously expressed until the exponential phase and decreases in concentration at the end of the stationary phase.

Batch fermentation. S-layer proteins are continuously expressed, which allows high-performance processes such as fed-batch culture; therefore, it is necessary to know the values associated to cell duplication (Luedeking-Piret equation). To this end, the values of cell growth, sporulation and production were recorded every hour in GYS medium that contained $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ of glucose. The conversion to biomass and product was analysed as well as whether this conversion was related to the carbon source in a process of controlled feeding for biomass production and S-layer protein synthesis. Figure 2 shows that during the first hours, the GP543 strain exhibited exponential growth until eleven hours with $\mu = 0.42 \text{ h}^{-1}$, $R^2 = 0.94$ and $X_{\text{max}} = 1.4 \text{ gDW} \cdot \text{L}^{-1}$, $Y_{\text{S/X}} = 0.14$, resulting in an increase in the concentration of vegetative cells reaching a value of 6×10^8 after 11 h of growth. In the second growth phase, a rapid decrease in vegetative cell concentration but an increase in spore formation was observed. Additionally, we observed the presence of spores after nine hours of culture and continued until more than 95% of sporulation was reached at twenty-three hours.

The relationship between the protein production as a function of the stage of the culture and the biomass concentration was analysed by yield ($Y_{\text{X/P}}$), productivity (Q_p) and the Luedeking-Piret equation, and the production and yield are shown in Fig. 3.

Regarding the protein production, which increased until eighteen hours and then remained stable until the end of the culture, the maximum protein concentration was $P = 0.07 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and even when the culture entered sporulation at eleven hours, the synthesis of protein continued during four hours more. The biomass production kept a steady exponential growth until the twelve hours, when a slight decline that was maintained until the end of the culture started. When solving the equations of the logistic growth model applied to the fermentation batch, the growth parameters can be calculated and predicted with precision, including the constants of associated and non-associated cell growth, as shown in Fig. 4. The symbols are the real data of biomass, protein and

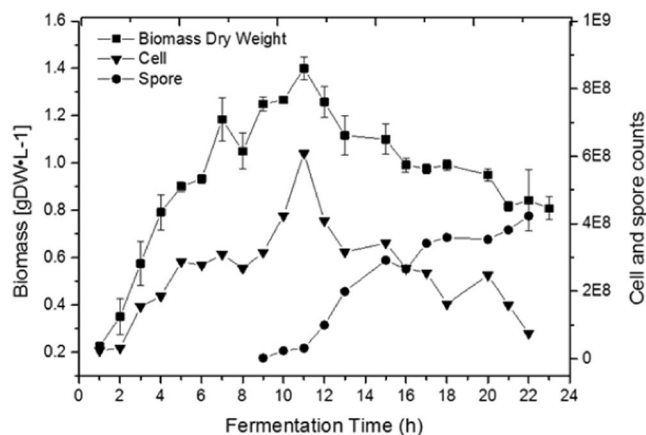


Figure 2. Kinetics of growth in dry weight and the number of vegetative cells and spores of the GP543 strain in GYS culture medium in a stirred tank bioreactor. Data are represented as the mean value \pm SE.

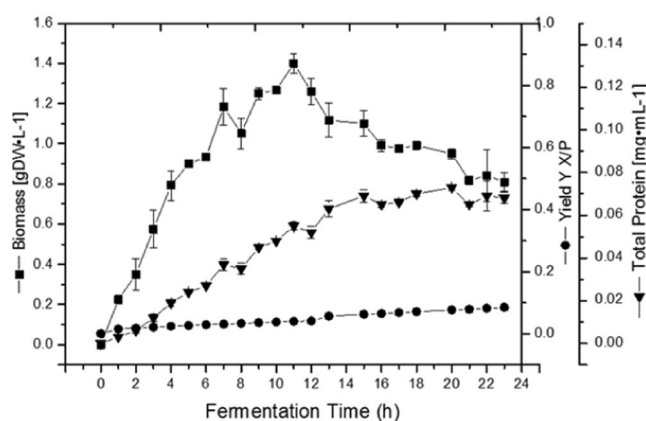


Figure 3. Kinetics of the growth in dry weight, total protein and yield $Y_{X/P}$ of the GP543 strain in GYS culture medium in a stirred tank bioreactor. Data are represented as the mean value \pm SE.

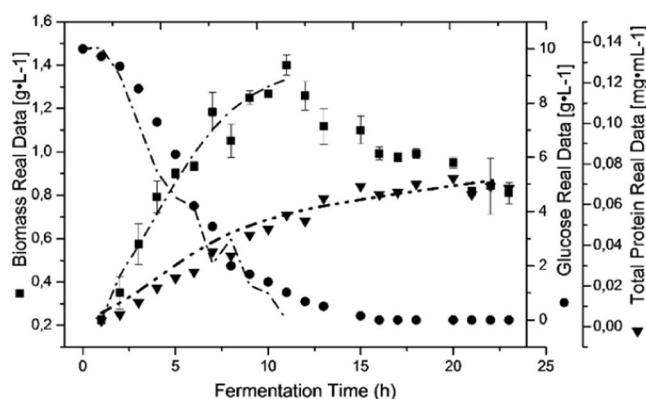


Figure 4. Comparison between the kinetic simulated using the calculated model and the kinetic obtained from experimental data for the GP543 strain cultured in GYS medium in a stirred tank bioreactor. Data are represented as the mean value \pm SE.

glucose consumption, and the solid lines are the modelling. The model reliably represents each of these parameters and allows calculation of the constants $\alpha = 0.033$ and $\beta = 0.001$ with $R^2 = 0.98$ for every parameter. It was also observed that the 1.4 gL^{-1} of glucose added when the culture entered sporulation at eleven hours was consumed after sixteen hours of fermentation.

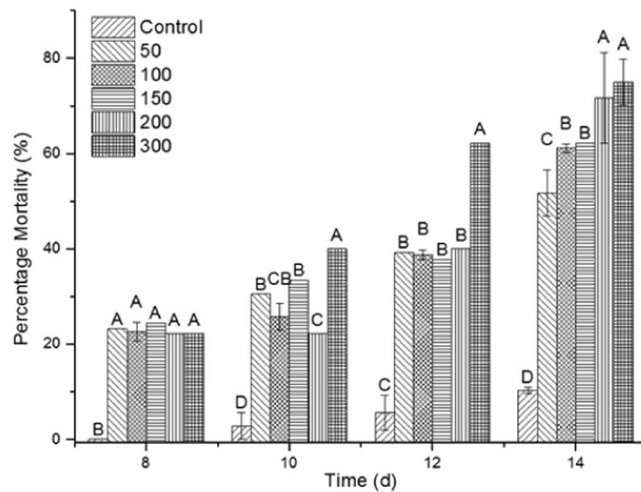


Figure 5. Virulence of the spore-protein S-layer complex of the *B. thuringiensis* strain GP543 against *R. microplus*. According to Tukey's test, values in each column of each treatment with the different letter differ significantly. Data are represented as the mean value \pm SE.

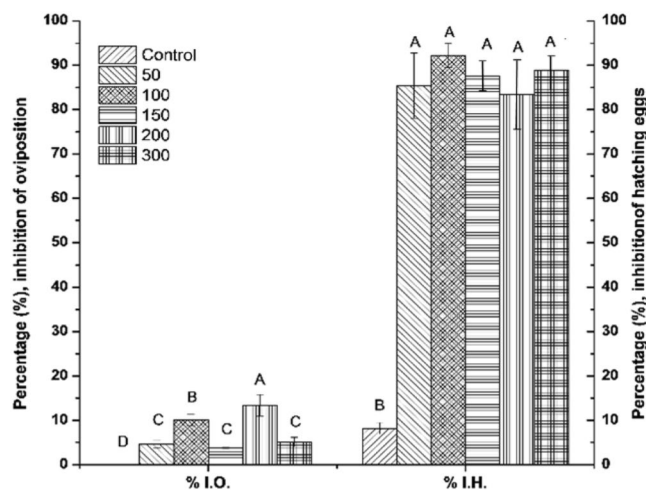


Figure 6. Inhibition of oviposition (% I.O.) and the hatching of eggs (% I.H.) caused by the spore-S-layer protein complex of the *B. thuringiensis* strain GP543.

Immersion bioassay with spore protein S-layer complex. The spore-protein S-layer complex of the GP543 strain of *B. thuringiensis* was produced in bioreactor and its virulence against *R. microplus* tested by immersion bioassays. Seven hundred engorged ticks were homogenized by weight and separated into experimental units. Different concentrations of spore-protein complex (0, 50, 100, 150, 200 and 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) were tested against the ticks and the mortality rates were measured in each case. As shown in Fig. 5, the lowest concentration of the complex caused more than 50.0% mortality at fourteen days, and the highest mortality was 75.0% with 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ on this day. The statistical analysis shows that at eight days, there were no significant differences between treatments, however, after twelve days of treatment, the concentration of 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ caused a statistically significant higher mortality. Under this conditions, the spore-S-layer complex showed a 50% lethal concentration (LC 50) of 69.7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Interestingly, several ticks that survived the treatments with the spore-S-layer complex were unable to oviposit (% I.O.) or laid eggs masses with decreased weight. The greatest inhibition of oviposition was caused by the 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ concentration, which caused an inhibition of 13.4%, as shown in Fig. 6. However, not only the oviposition was affected but also the viability (% I. H.), with the highest inhibition of the hatching of eggs at the 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ concentration. At the end of the inhibition assay, all doses tested showed greater than 85% inhibition of the hatching.

Immersion bioassay with purified S-layer protein. To test the virulence of the purified S-layer protein, the engorged ticks were exposed to several concentrations of purified S-layer protein (0, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150 and 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). As shown in Fig. 7, the S-layer protein was toxic by itself to the ticks since all the

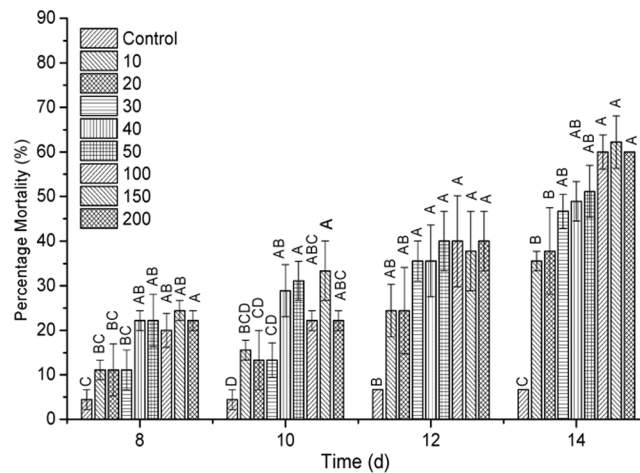


Figure 7. Virulence of purified S-layer protein of the *B. thuringiensis* strain GP543 against *R. microplus*. Measures in each column of each treatment with the different letter differ significantly, according to Tukey's test. Data are represented as the mean value \pm SE.

tested concentrations are statistically different to the control. The lowest concentrations of 10, 20 and 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ showed a very similar mortality of less than 46.67%, with no significant statistical differences throughout the bioassay. In a similar way, the higher concentrations of 100, 150, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ showed a similar effect among themselves, causing mortalities between 60 and 62.22% (Fig. 7) at 14 days. However, the two groups of concentrations (low and high) were statistically different. The pure protein showed a LC_{50} of 75.72 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Discussion

In the last century, the production of *B. thuringiensis* has been based on strains that express proteins related to sporulation (Cry and Cyt proteins) but with a low mass of spore and protein production. Even in a process with high yield such as fed-batch, because the focus is on the exponential growth phase, only the biomass is increased and not the crystal protein synthesis. Although biomass increases, the effects of cellular communication decrease protein synthesis during sporulation. An alternative approach has been to feed the culture during the stationary phase (sporulation) to redirect metabolism, achieving a slightly synthesis increasing^{13,14}. Using this approach, in this work we show the mass production of a S-layer protein using the *B. thuringiensis* strain GP543. This is the first report of the production of a S-layer protein whose synthesis during the vegetative stage is associated with cell duplication. We also demonstrate that the crystalline inclusions constituted by this S-layer protein are toxic against the cattle tick *R. microplus*.

Although there are other proteins that are synthesized during the vegetative phase (VIP and SIP), these proteins are only virulence cofactors^{15,16} that are soluble and may be secreted but do not form crystalline protein inclusions. Similarly to most *B. thuringiensis* strains, GP543 showed a low conversion of glucose to biomass and barely reached $X_{\text{max}} = 1.5 \text{ gDW}\cdot\text{L}^{-1}$ with $Y_{\text{S/X}} = 0.17 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ at $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Although *B. thuringiensis* regularly presents a low conversion of the carbon source into biomass, it is possible to modify the metabolic profiles in fed processes. These data suggest that carbon catabolite repression, influencing growth and perhaps protein synthesis is not an isolated case; most wild-type strains or modified strains have low oxidative metabolism and hence, many studies explore the effects of the culture media. We can see that culture media ranging from 10 to 40 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of glucose (disregarding the yeast extract that can be used as a carbon source, varying from 3 to 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) results in low biomass, even applying a statistical experimental design or using response surface to the components of the culture medium. Efforts to improve metabolism through oxygenation have led to a small increase in biomass¹⁷ by maintaining a high oxygenation of at least 50%, which improves cellular metabolism and results in a slight increase in biomass of 2.4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, although this increases the cost on a large scale. However, it is important to emphasize that high oxygenation during sporulation decreased toxicity, and when low oxygenation is applied during the sporulation phase, the toxicity increases considerably, although the investment in nutrients is very high at 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of glucose and 12 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ yeast extract. These data suggest that many strains of *B. thuringiensis* may have a type of Crabtree metabolism, since at high concentrations of glucose, even in high oxygenation, they resulted in low values of biomass and product-forming fermentation by-products.

B. thuringiensis is widespread and can be isolated from soils and insect corpses, principally. In the insect haemolymph, *B. thuringiensis* is able to grow even with a low carbohydrates concentration, and thus metabolizing other carbon sources such as proteins. This metabolism is found in reports of alternative culture media in which fish or shrimp meat is used as substrate to growth *B. thuringiensis* strains, and even when the biomass obtained is low, the yields are very high with respect to the carbon source¹⁸. In other tests with several industrial by-products for the production of *B. thuringiensis*, one method is based on sugar cane molasses (50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) as the carbon source and is supplemented with 50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of soybean flour as the nitrogen source. With this medium, a $X_{\text{max}} = 3 \text{ gDW}\cdot\text{L}^{-1}$ with a yield of $Y_{\text{S/X}} = 0.06 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ was obtained, without counting the soybean, to the advantage of 6%; the production of biomass was very poor, and moreover, this is typical for *B. thuringiensis*. In another report a culture medium was based on cheese whey supplemented with 15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose as the carbon source, which reached

a maximum biomass of $X_{\max} = 6 \text{ gDW} \cdot \text{L}^{-1}$ with a yield of $Y_{S/X} = 0.3 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, thus doubling the biomass with three times less carbon source¹⁹. The cheese whey contains lactose from 4.5 to 5.3 g and β -D-galactopyranosyl, which does not cause inhibition by carbon catabolite repression and allows higher biomass to be produced. However, most of the proteins studied and produced by *B. thuringiensis* are related to the sporulation phase of the culture, where the nutrients have been exhausted and the only resources available are intracellular and divided between with the synthesis of the crystal and generation of the spore.

The cultures with a low glucose concentration are an alternative to regulate inhibition by carbon catabolite and have already been developed as feeding strategies that allow the biomass to reach up to $X_{\max} = 72 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ in a fed-batch process¹⁶. Regardless of the increase in biomass, the strict relationship between the synthesis of toxic protein and sporulation has restricted the use of high-yield processes. In this report we identified by mass spectrometry analysis a S-layer protein from the GP543 strain whose production is associated with cell duplication. We calculated this parameter using the Luedeking and Piret (1959) relation by means of a logistic model of growth (see Material and Methods). To this end, we applied pressure to the kinetics of growth and the production and consumption of carbohydrates. The calculated values were used to solve the Luedeking and Piret equation, showing a coefficient of production associated with growth of $\alpha = 0.033$ and a coefficient of production not associated with growth of $\beta = 0.001$. Since this is the first report of these values for a toxic protein produced by a *B. thuringiensis* strain, there are no comparisons of ranges. The GP543 strain has a high rate of protein synthesis during exponential growth and a small rate during the stationary phase. The rate of synthesis of the S-layer protein of the GP543 strain is directly related to the specific growth rate $\mu = 0.42 \text{ h}^{-1}$; furthermore, α and β remained constant as the physiological age of the cells or the conditions of the process changed with $R^2 = 0.9$. Perhaps the S-layer protein has an important structural function in the cell membrane, but GP543 strain forms protein crystal, with the yield $Y_{S/X} = 0.14$. Figure 3 shows that the protein concentration per gram of biomass remains constant during the exponential phase and increases slightly in the stationary phase since the synthesis of S-layer protein continues, even in the stationary phase, which agrees with the values α and β . The same tendency can be observed with the Western blot detection (Fig. 1) in which the synthesis is observed after the first hours of vegetative growth, but our data indicate that the S-layer protein is visible during all fermentation times. The relationship between production and cell growth shown by the GP543 strain makes it suitable for production in real processes of high yield, making it exceptional among the strains that are currently used for mass production.

B. thuringiensis strain GP543 was isolated from a *R. microplus* corpse and the combination of spores and crystalline inclusions that forms, showed toxicity against *R. microplus* engorged females in pathogenicity bioassays. The mix reached mortalities above 75% with 200 mg \cdot mL⁻¹ and above 60% with 100 mg \cdot mL⁻¹. Additionally, the S-layer protein caused a 13% inhibition of oviposition, this was an initial symptom low inhibition is an initial symptom of a drastic control effect because the oviposited eggs were infertile, since we show here that the lowest concentration of S-layer protein caused 85 to 92% inhibition of egg hatching. The purified protein S-layer also caused mortality on *R. microplus* engorged females at fourteen days in a range of 35.56% to 62.22% with concentrations between 10 to 200 mg/mL⁻¹ and this demonstrate that the S-layer protein by itself is active against this tick. Thus, all the evidence here showed indicate that the strain GP543 of *B. thuringiensis* is potentially useful to be produced in enough amounts to constitute a viable alternative for the control of *R. microplus*.

Methods

Animal rights. The production of thick on cattle was approved by the Animal Experimentation and Ethics Committee of the Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENIDSAI) part of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). This research took ethic and methodological aspects into considerations in accordance with the Mexican regulations on use, housing and transportation of experimental animals (NOM-062-ZOO-1999 and NOM-051-ZOO-1995).

Animal care of the New Zealand White rabbit was at the Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, according the official Mexican regulations (NOM-062-ZOO-1999) in strict accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institute of Health (NIH), ensuring compliance with the established international regulations and guidelines. The production of the anti-S-layer antibody was approved by the Ethics Committee and Animal Experimentation of the Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Microorganism and conditions of fermentation. The *B. thuringiensis* GP543 strain used in this research was kindly supplied by the Plant Parasitology Laboratory from the Center of Biological Research of the Autonomous University of Morelos State, Mexico. This wild-type strain was isolated from a female corpse of *R. microplus*. The inoculations for all experiments were carried out with a culture at a concentration of 5×10^6 cells \cdot mL⁻¹. Modified HCT²⁰ and GYS²¹ media were used in production. Fermentation conditions were carried out in a stirred-tank equipped with sensors and manual control systems for DO, pH, antifoam, impeller speed, aeration rate and temperature. The fermentor dimensions are as follows: 7 L of total volume, 5 L of working volume, and one impeller Rushton turbine (Applikon controller P140). The fermentor was inoculated with GP543 strain at 5% (v/v) with the pre-culture. The fermentor was kept at 1 vvm, pH = 7, and $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$. Samples were taken every 2 hours.

Estimation of biomass yield and cell productivity. The substrate to biomass conversion was calculated as the yield ($Y_{S/X} = \Delta X / \Delta S$; $X = \text{gDW} \cdot \text{L}^{-1}$, $S = \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), the biomass X_{\max} corresponded to the maximum cell concentration, $t_{\max} = h$, the total protein concentration was quantified by the Bradford technique²² as $P = \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, and cell productivity was calculated as the yield $Y_{X/P} = \Delta P / \Delta X$. The volumetric productivity was calculated as $Q_p = P/t$, where (t) is the total time of fermentation.

Anti-S-layer antibody production. A New Zealand White rabbit was immunized with the solubilized and purified by anion-exchange chromatography S-layer protein produced by the GP543 strain by subcutaneous injections. It was injected three times at five sites on the back of the rabbit every 15 days. The doses were 1 mg of protein mixed with incomplete Freund's adjuvant. Five days after the third immunization the rabbit was bled. The blood was allowed to stand for one hour at room temperature and centrifuged five minutes at 2000 rpm to recover and store the serum. Detection was done with anti-GP543 SL polyclonal antibody (dilution, 1:30,000; 1 h) and visualized with a goat anti-rabbit antibody coupled with horseradish peroxidase (Sta. Cruz Biotechnology) (dilution, 1:50,000; 1 h), followed by Super Signal chemiluminescent substrate (Thermo Scientific) as described by the manufacturers⁵.

Western blot analysis. From a fermentation batch, 1 mL of sample was taken every 2 hours. The samples were centrifuged at $12,000 \times g$ for 10 minutes, the supernatant was discarded, the pellet was suspended in 100 μ L of phosphate buffer and 1 μ L of PMSF was added to the new sample. From the concentrated sample, 6 μ L were taken, mixed with Laemmli buffer and solved by SDS-PAGE in 8% gels. The full set of samples was solved in duplicate, with one of the gels stained with Coomassie blue and the other transferred to PVDF membrane (BioRad; Alfred Nobel Drive Hercules, California 94547). For the Western blot, the membrane was blocked with 2% BSA in phosphate buffer plus 0.1% Tween 20 (PBS-T) for 2 hours at room temperature. The detection was achieved with the primary anti-S-layer antibody at a concentration of 1:30,000 in PBS-T for 1 hour followed by the secondary anti-rabbit antibody coupled to peroxidase (Sta. Cruz Biotechnology) at a concentration of 1:50,000 in PBS-T for 1 hour. The membrane was developed using the substrate Supersignal West pico (Thermo Scientific).

Logistic growth model. A simple logistic model was employed to describe cell growth to accurately determine the specific growth rate, which was used to replace the model for the production and consumption of substrate by the following equation:

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \mu \max X \left(1 - \frac{X}{X \max} \right) \quad (1)$$

Logistic model for production. The production kinetics were evaluated by the Luedeking-Piret equation²³, where α is a constant of production associated with growth and β is a constant not associated with growth:

$$\frac{dp}{dt} = \alpha \frac{dN}{dt} + \beta N \quad (2)$$

The logistic growth model (Xt) was replaced in the Luedeking-Piret equation and then integrated:

$$Pt = P_o + \alpha X_o \left[\frac{e^{\mu t}}{1 - \left(\frac{X_o}{X \max} \right) (1 - e^{\mu t})} \right] + \beta \frac{X \max}{\mu} \ln \left[1 - \left(\frac{X_o}{X \max} \right) (1 - e^{\mu t}) \right] \quad (3)$$

Logistic model for consumption of substrate. The consumption kinetics of glucose were evaluated by a modified Luedeking-Piret equation in which three growth variables, substrate consumption, biomass increase and production, were evaluated, as shown in the following equation:

$$S_o - St = \left(\frac{1}{Y_{S/X}} + \frac{\alpha}{Y_{S/p}} \right) (X - X_o) + \left(\frac{\beta}{Y_{S/p}} + Ke \right) \frac{X \max}{\mu} \left\{ \ln \left[1 - \left(\frac{X_o}{X \max} \right) (1 - e^{\mu t}) \right] \right\} \quad (4)$$

Immersion bioassays. Pathogenicity bioassays were carried out with the GP543 strain against engorged ticks by immersion²⁴. Increasing concentrations of spore-protein complex ranging from 50 to 300 μ g \cdot mL⁻¹ were employed and distilled water was used as a negative control. The female ticks were placed individually into one well (Cell Wells NUNC) of 24 wells and remained in immersion for five minutes in 1 mL of spore-protein solution. The ticks were dried and placed in a clean well and incubated for 14 days in a humid chamber at 90% RH and 25 ± 2 °C. For pathogenicity bioassay using pure S-protein, the concentrations ranged from 10 to 200 μ g \cdot mL⁻¹. A sample of 1200 engorged ticks was homogenized by weight and divided in experimental units. To each experimental unit a concentration of purified S-layer protein was applied.

Purification of the crystal inclusion of s-layer protein produced by the GP543 strain. The bacteria was grown in petri dishes containing solid HCT²⁰ medium. The spore-crystal mixture was collected in 5 mL of sterile water and centrifuged for 10 min at 10,000 rpm. The pellet containing only spores was discarded and the supernatant was recovered. The process was repeated for five times until the spores were removed. The last supernatant was centrifuged at 19,000 rpm for 30 min to recover the crystal inclusions. The crystals were solubilized in 50 mM Na₂CO₃, pH 10.5, with 0.2% β -mercaptoethanol and purified by anion-exchange chromatography in a Q-Sepharose column (HiTramTM), using liquid chromatography⁵.

Experimental design and analysis. Each experimental unit had 24 *R. microplus* individuals, and each treatment was used in each experimental group. The ticks were homogenized by weight; each individual was weighed using an analytical balance (OHAUS AS 120; OHAUS Corporation). With these weights, we generated a

graph (frequency vs weight) with a Gaussian distribution, which allowed us to discard the ends of the distribution (heaviest and lightest) to select a homogeneous sample. After this selection, the ticks were distributed completely at random in Cell Wells NUNC. This experiment was replicated four times, and the mortality percentages were calculated at 8, 10, 12 and 14 days after treatment. A completely randomized experimental design was employed to evaluate the range of concentrations of the spore-protein complex and analysed by Tukey's multiple range tests. SAS software (Version 9.0) was employed for statistical analyses.

Mortality percentage of *R. microplus*. Dead and live ticks were counted at 8, 10, 12 and 14 days after the exposure to treatment. It was determined by observation using a stereoscopic microscope that the ticks were dead when they did not have abdominal movement even with the application of a tactile stimulation with a brush and they remained motionless until the end of the experiment.

Percentage inhibition of oviposition. The percentage of oviposition (% I.O.) was determined²⁴ after 14 days of incubation. The eggs laid throughout the experiments were collected and weighed by experimental unit using an analytical balance (OHAUS AS 120; OHAUS Corporation). The equation described was used to determine % I.O.:

$$\% \text{I.O.} = (\text{PQL}_t / \text{PQLT} - \text{PHL}_t / \text{PHLT}) * 100 \quad (5)$$

where PQL_t = weight of female ticks in the experimental unit, PQLT = weight of female ticks in the control unit, PHL_t = weight of oviposited eggs in the experimental unit and PHLT = weight of oviposited eggs in the control stock.

Protein sequencing. The solubilized protein from crystal-spore was solved by 9% SDS-PAGE. The band of around 100 kDa was excised from the gel, trypsin digested²⁵ and analyzed with an Ultraflex Extreme MALDI-TOF/TOF (Bruker). Peptide mass fingerprinting analyses were performed using the Flex Analysis 3.5 software (Bruker) and the Mascot Server (Matrix Science) using the NCBI database. Accepted peptide scores were equal or higher than 95% identification confidence threshold^{23,26}.

Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 22 March 2019; Accepted: 4 November 2019;

Published online: 26 November 2019

References

- Glare, T. *et al.* Have biopesticides come of age? *Trends Biotechnol.* **30**, 250–258 (2012).
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J. & Caballero, P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins (Basel)*. **6**, 3296–3325 (2014).
- López-Y-López, V. E. & De La Torre, M. Redirection of metabolism during nutrient feeding in fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**, 254–260 (2005).
- Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M., Salamitou, S. & Sanchis, V. Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. *J. Bacteriol.* **178**, 2749–56 (1996).
- Peña, G. *et al.* A *Bacillus thuringiensis* S-layer protein involved in toxicity against *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 353–360 (2006).
- Ghribi, D., Zouari, N., Trabelsi, H. & Jaoua, S. Improvement of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin production by overcome of carbon catabolite repression through adequate control of aeration. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 614–622 (2007).
- Romo-Martínez, A. *et al.* Evaluation of natural origin products for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle artificially infested. *Basic Res. J. Agric. Sci. Rev.* **2**, 64–79 (2013).
- Jongejan, F. & Uilenberg, G. The global importance of ticks, <https://doi.org/10.1017/S0031182004005967> (2017).
- Céspedes, N. S., Vargas, M. S., Sánchez, H. F. & Vázquez, Z. G. Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. *Rev. Mex. Ciencias Pecu.* **40** (2012).
- Li, A. Y., Davey, R. B., Miller, R. J. & George, J. E. Resistance to Coumaphos and Diazinon in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) and evidence for the involvement of an oxidative detoxification mechanism. *J. Med. Entomol.* **40**, 482–490 (2003).
- Fernandez-Salas, A., Rodríguez-Vivas, R. I. & Alonso-Díaz, M. A. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. *Vet. Parasitol.* **183**, 338–342 (2012).
- Reck, J. *et al.* First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. *Vet. Parasitol.* **201**, 128–136 (2014).
- Khodair, T. A., Abdelhafez, A. A. M., Sakr, H. M. & Ibrahim, M. M. M. Improvement of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide production by fed-batch culture on low cost effective medium. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* **4**, 923–935 (2008).
- Mignone, C. F. & Avignone Rossa, C. A simple method for designing fed-batch cultures with linear gradient feed of nutrients. *Process Biochem.* **28**, 405–410 (1993).
- Chakroun, M., Banyuls, N., Bel, Y., Escriche, B. & Ferré, J. Bacterial vegetative insecticidal proteins (Vip) from entomopathogenic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80**, 329–50 (2016).
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J. & Caballero, P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins* **2014**, 3296–3325 (2014).
- Boniolo, F. S. *et al.* Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentations: bringing new insights on their impact on sporulation and δ -endotoxin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**, 625–636 (2012).
- Zouari, N. & Jaoua, S. The effect of complex carbon and nitrogen, salt, Tween-80 and acetate on delta-endotoxin production by a *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 497–502 (1999).
- Salazar-Magallon, J. A., Murillo-Alonso, K. T., Lina-García, L., Peña-Chora, G. & Hernández-Velázquez, V. M. Scale-up from from a shake flask to a bioreactor, based in oxygen transfer for the production of spore-crystal complexes from *Bacillus thuringiensis*. *J. Pure Appl. Microbiol.* **10**, 871–878 (2016).

20. Lereclus, D., Lecadet, M.-M., Ribier, J. & Dedonder, R. Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: conserved sequences through 11 crystalliferous strains. *MGG Mol. Gen. Genet.* **186**, 391–398 (1982).
21. Hiraishi, A. & Kitamura, H. Distribution of phototrophic purple nonsulfur bacteria in activated sludge systems and other aquatic environments. *Nippon Suisan Gakk.* **50**, 1929–1937 (1984).
22. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
23. Luedeking, R. & Piret, E. L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* **1**, 393–412 (1959).
24. Drummond, R. O. & Whetstone, T. M. Oviposition of the gulf coast tick. *J. Econ. Entomol.* **63**, 1547–1551 (1970).
25. Shevchenko, A., Tomas, H., Havliš, J., Olsen, J. V. & Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* **1** (2007).
26. Kang, B. C., Lee, S. Y. & Chang, H. N. Enhanced spore production of *Bacillus thuringiensis* by fed-batch culture. *Biotechnol. Lett.* **14**, 721–726 (1992).

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledged CONACyT (National Council of Science and Technology) for the scholarship granted to Caleb Lormendez C. for his doctorate degree (CVU 419143). This work is part of a PhD thesis.

Author contributions

C.L.C. design the experiments, performed the bioassays, was in charge of the mass production of the S-layer protein, and wrote the manuscript; M.F.R. was in charge of the mass production of *Rhipicephalus microplus*; M.A.M. performed bioassays with pure protein; V.M.H.V. did the statistical analysis, and wrote the manuscript; F.Z.N. made the western blot, and analyzed the data; G.F.R. sequenced the protein; L.G.L. did bioassays and wrote the manuscript; G.P.Ch. design the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53854-3>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to G.P.-C.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 27 febrero de 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Guadalupe Peña Chora (Tutor)
Dr. Manuel Fernández Ruvalcaba (Co Tutor)
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega
Dr. Iván Arenas Sosa
Dra. Mary Carmen Torres Quintero

Tesis: "PRODUCCIÓN DEL COMPLEJO ESPORA_S-LAYER DE LA CEPA GP543 DE *Bacillus thuringiensis* EN CULTIVOS A ALTA DENSIDAD CELULAR

Alumno que la presenta a revisión: **CALEB CASTILLO LORMENDEZ**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. GUADALUPE PEÑA CHORA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 27 febrero 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Guadalupe Peña Chora (Tutor)
Dr. Manuel Fernández Ruvalcaba (Co Tutor)
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega
Dr. Iván Arenas Sosa
Dra. Mary Carmen Torres Quintero

Tesis: "PRODUCCIÓN DEL COMPLEJO ESPORA_S-LAYER DE LA CEPA
GP543 DE *Bacillus thuringiensis* EN CULTIVOS A ALTA DENSIDAD CELULAR

Alumno que la presenta a revisión: **CALEB CASTILLO LORMENDEZ**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para
editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. MANUEL FERNANDEZ RUVALCABA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 27 febrero 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Guadalupe Peña Chora (Tutor)
Dr. Manuel Fernández Ruvalcaba (Co Tutor)
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega
Dr. Iván Arenas Sosa
Dra. Mary Carmen Torres Quintero

Tesis: "PRODUCCIÓN DEL COMPLEJO ESPORA_S-LAYER DE LA CEPA GP543 DE *Bacillus thuringiensis* EN CULTIVOS A ALTA DENSIDAD CELULAR

Alumno que la presenta a revisión: **CALEB CASTILLO LORMENDEZ**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 27 febrero 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Guadalupe Peña Chora (Tutor)
Dr. Manuel Fernández Ruvalcaba (Co Tutor)
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega
Dr. Iván Arenas Sosa
Dra. Mary Carmen Torres Quintero

Tesis: "PRODUCCIÓN DEL COMPLEJO ESPORA_S-LAYER DE LA CEPA GP543 DE *Bacillus thuringiensis* EN CULTIVOS A ALTA DENSIDAD CELULAR

Alumno que la presenta a revisión: **CALEB CASTILLO LORMENDEZ**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. RAMON SUAREZ RODRIGUEZ



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 27 febrero de 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Guadalupe Peña Chora (Tutor)
Dr. Manuel Fernández Ruvalcaba (Co Tutor)
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega
Dr. Iván Arenas Sosa
Dra. Mary Carmen Torres Quintero

Tesis: "PRODUCCIÓN DEL COMPLEJO ESPORA_S-LAYER DE LA CEPA GP543 DE *Bacillus thuringiensis* EN CULTIVOS A ALTA DENSIDAD CELULAR

Alumno que la presenta a revisión: **CALEB CASTILLO LORMENDEZ**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. MARIA LUISA TERESA VILLARREAL ORTEGA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 27 febrero de 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Guadalupe Peña Chora (Tutor)
Dr. Manuel Fernández Ruvalcaba (Co Tutor)
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega
Dr. Iván Arenas Sosa
Dra. Mary Carmen Torres Quintero

Tesis: "PRODUCCIÓN DEL COMPLEJO ESPORA_S-LAYER DE LA CEPA
GP543 DE *Bacillus thuringiensis* EN CULTIVOS A ALTA DENSIDAD CELULAR

Alumno que la presenta a revisión: **CALEB CASTILLO LORMENDEZ**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para
editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. IVAN ARENAS SOSA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 27 febrero de 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Guadalupe Peña Chora (Tutor)
Dr. Manuel Fernández Ruvalcaba (Co Tutor)
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega
Dr. Iván Arenas Sosa
Dra. Mary Carmen Torres Quintero

Tesis: "PRODUCCIÓN DEL COMPLEJO ESPORA_S-LAYER DE LA CEPA
GP543 DE *Bacillus thuringiensis* EN CULTIVOS A ALTA DENSIDAD CELULAR

Alumno que la presenta a revisión: **CALEB CASTILLO LORMENDEZ**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para
editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. MARY CARMEN TORRES QUINTERO