



# BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

---

---

Instituto de Ciencias  
Centro de Investigaciones en ciencias  
Microbiológicas  
Posgrado en Microbiología

EVALUACION DE LA SOBREVIVENCIA DE *Bacillus thuringiensis* POR LA SOBREXPRESIÓN DE LOS GENES *radA* y *splB* RELACIONADOS CON LA REPARACION DEL DAÑO A DNA CON RADIACION ULTRAVIOLETA (260 nm).

Tesis que para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Microbiológicas con opción Bioquímica y Genética Microbiana

PRESENTA:  
BIOL. KARINA ENID SAAVEDRA CORTES

ASESORES:  
D.C. CANDELARIO VÁZQUEZ CRUZ  
D.C. PATRICIA SANCHEZ ALONSO

## INDICE

|   |    |
|---|----|
| INTRODUCCION  | 3  |
| Importancia de <i>Bacillus thuringiensis</i> en el control biológico                                    | 3  |
| Aspectos generales de <i>Bacillus thuringiensis</i>   | 3  |
| Estructura de la toxina Cry   | 5  |
| Mecanismo de acción de la $\delta$ -Endotoxina  | 7  |
| Genética de <i>Bacillus thuringiensis</i>   | 8  |
| Ecología de <i>Bacillus thuringiensis</i>   | 9  |
| Uso de productos de <i>Bacillus thuringiensis</i>   | 9  |
| Resistencia de esporas de <i>Bacillus</i> a ambientes extremos  | 10 |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> y su resistencia a la luz.  | 12 |
| Mecanismos de reparación a DNA dañado por luz Uv.   | 15 |
| JUSTIFICACION   | 19 |
| OBJETIVOS   | 20 |
| ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO  | 21 |
| MATERIALES Y METODOS  | 23 |
| RESULTADOS  | 31 |
| • Diseño de oligonucleotidos  | 31 |
| • Amplificación por PCR y clonación en pBluescript KS(-)  | 31 |
| • Subclonación en pHT 3101  | 34 |
| • Determinación de la integridad de los plásmidos que contenían los fragmentos subclonados en pHT 3101. | 37 |
| • Evaluación de la sobrevivencia por exposición a luz Uv  | 38 |
| • Evaluación de la sobrevivencia por exposición a luz solar   | 44 |
| DISCUSION   | 46 |
| CONCLUSIONES  | 50 |
| PERSPECTIVAS  | 51 |
| BIBLIOGRAFIA  | 52 |

## INTRODUCCION

### IMPORTANCIA DE *Bacillus thuringiensis* EN EL CONTROL BIOLÓGICO

Desde los inicios de la agricultura hasta la fecha el hombre ha sufrido frecuentemente la devastación de sus cosechas por los ataques de las plagas de insectos, las cuales son consideradas una amenaza constante para la calidad de vida humana (Dulmage, *et al.*, 1990). Para reducir muchas especies de insectos la única forma de control ha sido usar pesticidas químicos, los cuales también son considerados altamente perjudiciales tanto para los humanos como para los ecosistemas, ya que además de su persistencia en el medio ambiente, favorecen la aparición de resistencia en los insectos. En 1987 ya se tenían reportados alrededor de 500 insectos resistentes a uno o más pesticidas, aunque dicha cifra sigue aumentando con los años de uso (Macias, 1995).

Como consecuencia los agricultores usan dosis mas altas de insecticidas y los productores de insecticidas diseñan más y nuevos tóxicos (Torres *et al.*, 2002). Ante esta presión medio ambiental en muchos países se han establecido reglamentaciones mas estrictas en la manufactura, registro y uso de pesticidas, aumentando así el costo y disminuyendo la disponibilidad de estos productos. Una alternativa para solucionar estos problemas es aplicar el control biológico, definido como la disminución de insectos que se comportan como plagas, mediante el uso de organismos vivos considerados sus enemigos bajo condiciones naturales (Galán *et al.*, 1996).

Ignoffo y Link en 1996, reportaron la existencia de mas de 1500 especies de microorganismos entomopatógenos con potencial para el control microbiano de insectos, dentro de estos microorganismos se tienen a hongos, virus, protozoarios y bacterias; en donde las últimas son las de mayor importancia. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) se encuentra dentro las bacterias la más sobresaliente debido a su capacidad entomotóxica con un gran potencial para la producción de bioinsecticidas (Badii *et al.*, 1996).

### ASPECTOS GERNERALES DE *Bacillus thuringiensis*.

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria gram positiva, formadora de esporas, que posee un cristal el cual es sintetizado durante la fase estacionaria tardía, en una cinética de cultivo (Beegle y Yamamoto, 1992). El cristal se acumula en la célula madre como inclusiones intracelulares, que corresponden aproximadamente entre el 20 y 30 % del peso seco de las células esporuladas (Figura 1). Las células vegetativas tienen forma de un bastón de 2-5 x 1 µm; presenta flagelos peritricos y se dividen por fisión binaria (Agaisse, 1995).

Esta bacteria se ha catalogado como un organismo patógeno de insectos, dicha actividad se le atribuye en gran parte a su cristal parasporal. Estas observaciones han alentado el desarrollo de bioinsecticidas basados en *B. thuringiensis* para el control de ciertos tipos de insectos entre las cuales están los órdenes de Lepidópteros, Dípteros y Coleópteros (Beegle y Yamamoto, 1992).

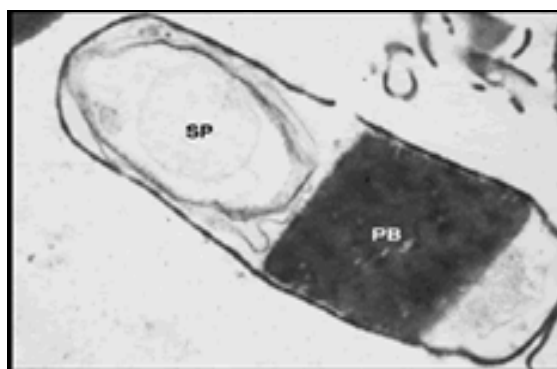


Figura No.1 Micrografía de transmisión electrónica de una célula de *B. thuringiensis* (SP: espora, PB: cuerpo proteico) (De Maagd *et al.*, 2001)

El cristal de *Bacillus thuringiensis* codificado por los genes *cry*, está compuesto por una mezcla de proteínas (Cry), que se encuentran en forma de protoxinas, las cuales tienen una masa molecular que va de 70 a 140 KDa. La estructura de las proteínas Cry puede ser dividida en dos secciones, una con un extremo N-terminal que es el responsable de la toxicidad y otra que posee el extremo C-terminal, que participa en el proceso de cristalización. Las proteínas Cry además de poseer variadas formas, se agrupan en clases, dependiendo de la plaga a la que intoxican (Tabla 1). Algunas cepas de *Bt* pueden producir varias proteínas Cry, relacionadas como patotipos, lo cual amplía el nivel de actividad contra un insecto específico o amplía el espectro de especies de insectos susceptibles a estas cepas (Höfte y Whiteley, 1989) (Figura 2).

| Grupos | Proteínas   | Orden susceptible a las toxinas |
|--------|---|---------------------------------|
| 1      | Cry 1, Cry 2, Cry 9                                   | lepidópteros                    |
| 2      | Cry 3, Cry 7, Cry 8                                   | coleopteros                     |
| 3      | Cry 1B, Cry 11  | actividad dual                  |
| 4      | Cry 5, Cry 12, Cry 13, Cry 14                         | nemátodos                       |
| 5      | Cry 2, Cry 4, Cry 10, Cry 11, Cry 16, Cry 17, Cry 19. | dípteros                        |

Tabla 1. Grupos de algunas Toxinas Cry.

Dentro del grupo de proteínas cristalinas se tiene otro subgrupo, las denominadas Cyt, que también forman parte de los cristales parasporales en *Bt* y que tiene actividad hemolítica (Crickmore, *et al.*, 1998). Estas proteínas Cyt muestran tener actividad sinérgica con diferentes toxinas Cry, aumentando así la toxicidad de algunas cepas contra dípteros. Su estructura consiste en dos pares de hélices  $\alpha$  enlazadas flanqueando a un núcleo de hojas  $\beta$  mezcladas, responsables de la toxicidad y de la unión a lípidos. Existen varias hipótesis acerca de su mecanismo de acción, algunos autores proponen un mecanismo en donde la toxina se inserta en la bicapa lipídica formando poros que provocan un desequilibrio osmótico y la lisis celular. Otra hipótesis propone que las  $\alpha$  hélices son demasiado cortas para formar poros y se sugiere que las toxinas podrían oligomerizarse en la membrana causando defectos en el empaquetamiento de los lípidos, provocando la destrucción de las membranas y formando complejos toxina lípidos (Butko, 2003).

Se ha analizado las secuencias aminoácidos de las proteínas Cry, mediante aplicaciones disponibles de software y se han identificado aproximadamente 154 toxinas Cry (Figura 2) (Crickmore *et al.*, 2006). Al hacer la comparación de secuencias

entre las proteínas Cry y Cyt, para tratar de identificar su identidad, se ha observado que aunque las proteínas Cyt se consideran dentro del grupo de las proteínas cristalinas no hay homología con las proteínas Cry, además de que tampoco parecen actuar por unión específica a receptores (Butko, 2003).

Figura 2: Clasificación de las proteínas Cry hasta hoy reportadas. Las barras grises demarcan los niveles de rangos de la nomenclatura; basados en el bajo porcentaje de residuos idénticos y la ausencia de algunos bloques de secuencia conservada en múltiples alineamientos de secuencia ([http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html).2006)

Recientemente se han identificado otras toxinas que al igual que las  $\delta$ -endotoxinas poseen actividad insecticida, tal es el caso de las toxinas Vips (vegetative insecticidal proteins), las cuales se expresan en la fase de crecimiento vegetativo. Estas poseen un amplio espectro de actividad hacia lepidópteros y también contra algunos coleópteros. Su estructura y su modo de acción se asemejan al de las proteínas Cry, sin embargo, tanto el receptor como el sitio de unión difieren por lo que son consideradas nuevos factores de virulencia de los agentes de control biológico (Lee *et al.*, 2003).

Otro grupo de toxinas son las  $\beta$ -exotoxinas I conocidas como Thuringiensis o “Factor Mosca”, la cual se produce en la fase de crecimiento exponencial y es termoestable. Esta sustancia es un análogo del nucleótido adenina y se piensa que inhibe la síntesis de RNA por competencia con el ATP por los sitios de unión, por lo que afecta a muchos insectos. La producción de la  $\beta$ -exotoxina I esta relacionada con la presencia de plásmidos que contiene los genes *cry*, específicamente el gen *cryIB*. Aunado a esto se ha observado que la producción de la  $\beta$ -exotoxina I se encuentra incrementada con la presencia de los genes *vips2*, por lo que se sugiere que estos genes se encuentran localizados en el mismo plásmido (Espinasse *et al.*, 2002; [Espinasse \*et al.\*, 2004](#))

### **ESTRUCTURA DE LA TOXINA Cry.**

Mediante cristalografía de las proteínas Cry y análisis de difracción de Rayos X se ha establecido la estructura tridimensional de las proteínas Cry 1Aa y Cry 3A, observando la presencia de 3 dominios estructuralmente distintos que se mantienen conservados en las proteínas Cry (Figura 3). El dominio I posee 8  $\alpha$  hélices y es la porción de la toxina que se inserta en la Membrana plasmática del epitelio intestinal del insecto; Esto permite la formación del poro a través del cual los iones se liberan generando un desequilibrio osmótico (Carrol *et al.*, 1997; Tigue *et al.*, 2001). El Dominio II tiene 6 hojas antiparalelas o 3 hojas  $\beta$ ; los 3 bucles más externos están involucrados en la unión al receptor epitelial del tubo digestivo y la especificidad del insecto mediante residuos con carga positiva que orientan a la toxina al receptor (Rajamohant *et al.*, 1996). El dominio III consiste en 2 hojas  $\beta$  enrolladas formando una estructura semejante a la de un sándwich (Schnepf *et al.*, 1998), este dominio esta implicado en determinar la especificidad, a través del reconocimiento y unión al receptor (Burton *et al.*, 1999; De Maagd *et al.*, 2001).

Una característica importante de las estructuras de las proteínas Cry es la posibilidad que tienen de intercambiar diversos dominios y junto con ello la especificidad de acción, generando nuevas toxinas quiméricas contra insectos (Rong *et al.*, 1999).

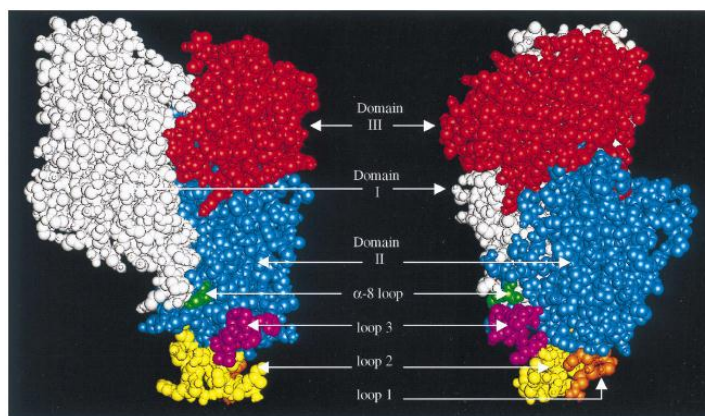


Figura 3: Estructura tridimensional de la proteína Cry 1Ab, donde se observan el dominio I (blanco), el dominio II (azul) y el dominio III (rojo) así como algunas porciones de lazos (naranja, amarillo, verde y violeta). En la parte izquierda se observa una presentación estándar, y a la derecha la misma proteína con un giro de 90°C (Schnepf *et al.*, 1998)

### MECANISMO DE ACCION DE LA $\delta$ -ENDOTOXINA.

Inicialmente el complejo espora-cristal tiene que ser ingerido por el insecto. La proteína es insoluble en condiciones neutras por lo que una vez en la luz del intestino del insecto los cristales son disueltos por su pH alcalino (9.5) y por las condiciones reductoras, liberando monómeros de protoxinas. Las protoxinas solubilizadas con un peso aproximado de 130 a 140 KDa quedan expuestas a sufrir proteólisis por las serín-proteasas del insecto, que tienen actividad tipo tripsina y quimiotripsina, con lo que se generan toxinas activas o  $\delta$ -Endotoxinas con un peso que va de los 55 a 65 KDa. La proteólisis ocurre mayormente en el extremo C-terminal y en menor parte en el extremo N-terminal (Lightwood *et al.*, 2000). De esta forma la toxina activa adquiere una conformación tridimensional que le permite realizar el acoplamiento al receptor de la membrana (aminopeptidasas o caderinas) de las células epiteliales de manera irreversible. Existen evidencias de que en este momento se da una agregación progresiva de toxinas activas que actúan como multímeros para formar poros en la membrana plasmática (Gómez *et al.*, 2001; Daniel *et al.*, 2002; Zhuang *et al.*, 2002). Los poros permiten el paso del agua y un exceso de esta en el citoplasma de las células epiteliales provoca la lisis celular. Algunas células dañadas podrían ser reemplazadas rápidamente por otras nuevas, aunque si existen altas cantidades de la toxina se destruyen áreas muy amplias del epitelio (Gill *et al.*, 1992; Schnepf *et al.*, 1998) La destrucción de la barrera física provoca un aumento en el pH de la hemolinfa por ingreso de los fluidos intestinales, la conducción nerviosa cesa y la larva se paraliza, esto implica que las larvas dejen de comer y finalmente se provoca la muerte por inanición en 4 o 5 días. Asimismo, se puede dar la germinación de la espora y el crecimiento de la bacteria, la cual invade el hemocele del insecto y provoca la muerte por septicemia después de 2-3 de días de la ingesta (Knowles *et al.*, 1987; Aronson *et al.* 1991) (Figura 4).

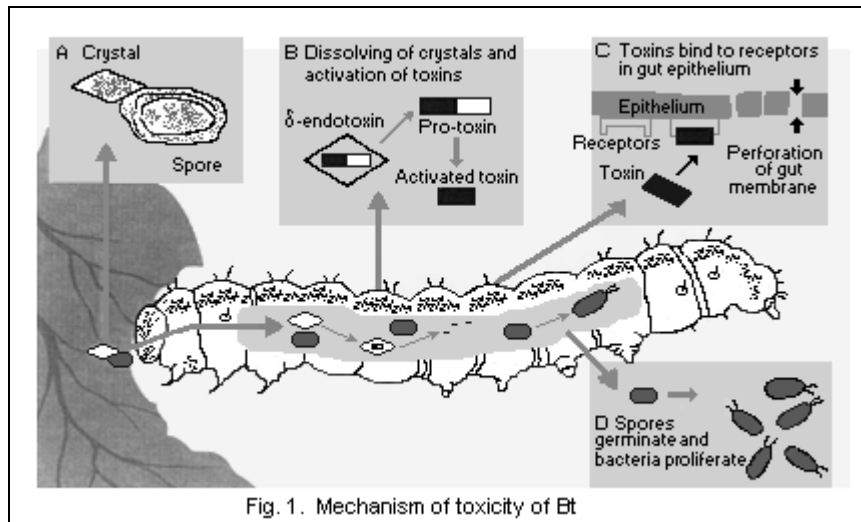


Fig. 1. Mechanism of toxicity of Bt

Figura 4: Mecanismo de acción de la  $\delta$ -endotoxina de Bt en el intestino del insecto (<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc271.htm>).

### GENETICA DE *Bacillus thuringiensis*.

Las cepas de *Bt* poseen un genoma de aproximadamente 5.8 millones de pares de bases (Carlson, *et al.*, 1994). Entre el 10 y el 20 % de su información genética se encuentra en plásmidos, con una masa molecular de 1.5 a 130 MDa (Agaïsse y Lereclus, 1995). Además de estas unidades extracromosomales, también posee elementos translocables, incluyendo secuencias de inserción, transposones y algunos virus integrados, que les permite desplazarse dentro del genoma bacteriano, incluso se han asociado estos elementos a la estructura de los genes *cry* (Mahillon *et al.*, 1994; Agaïsse, y Lereclus, 1995).

Los genes *cry* se encuentran en megaplásmidos mayores de 30 MDa; la mayoría de este tipo de genes se encuentra como unidades monocistrónicas y solo en algunos casos forman parte de un operón. Los primeros estudios sobre la organización estructural de los genes *cry* 1A, mostraron que estos genes están flanqueados por secuencias inversas y repetidas (Kronstad y Whiteley, 1984) las cuales han sido llamadas IS231 e IS232 (Lereclus *et al.*, 1992). Aunque no se ha probado experimentalmente, se piensa que dichas secuencias pueden ser transposones, ya que le darían movilidad a los genes *cry*. No se sabe el papel de los elementos translocables en *Bt*, pero existen dos hipótesis al respecto, una propone que están relacionados con la amplificación de los genes *cry*, y otra sugiere que son mediadores de la transferencia de plásmidos, por un proceso que involucra la formación de estructuras cointegradas entre plásmidos y DNA cromosomal (Green, 1989); la función mas importante de estos elementos translocables puede ser la diseminación horizontal de material genético, incluyendo genes *cry* entre especies de *Bacillus* (*cereus-thuringiensis*).

Se propone que los genes *cry* son expresados específicamente durante la esporulación. En el caso de los genes *cry*3 se ha observado su expresión durante la fase estacionaria. A nivel transcripcional la esporulación es controlada por la activación de factores sigma que se anclan a una RNA polimerasa específica para dirigir la transcripción de promotores específicos de esporulación, los mismos factores sigma regulan la expresión de los genes *cry* (Moran, 1993). El gen *cry* 1Aa es un ejemplo de expresión de genes *cry* dependientes de factores sigma que controlan la esporulación, su expresión ocurre únicamente en la célula madre de *Bt*. En este gen se han encontrado dos sitios de inicio de la transcripción BtI (temprano) y BtII (tardío), los cuales son

activados en un tiempo determinado ( $T_n$ ) después de finalizar la fase exponencial; su transcripción es dirigida por dos factores sigma distintos ( $\sigma^E$  y  $\sigma^K$ ) (Wong, *et al.* 1983)

Entre los genes *cry* cuya transcripción no depende de la esporulación se encuentran los genes *cry 3Aa*. El promotor del gen utiliza el factor de transcripción  $\sigma_A$ , por lo que su expresión se lleva a cabo aún en mutantes asporogénicas (Agaisse y Lereclus, 1994).

### **ECOLOGIA DE *Bacillus thuringiensis*.**

Se ha observado que *Bt* es nativo de varios ambientes, ya que se han aislado cepas de distintos ambientes, como suelo, insectos muertos, agua, polvo de productos almacenados, hojas de coníferas, aunque se considera que el suelo es su principal hábitat. A pesar de los diferentes lugares en los que se puede hallar, se desconoce el papel exacto de *Bacillus thuringiensis* en el medio ambiente, en base a estudios, se proponen tres posibles papeles de este microorganismo en el ambiente (Meadows, 1993):

Como entomopatógeno: ya que ha sido aislado de insectos muertos, dicha actividad se atribuye a la presencia del cristal junto con las esporas (De Maagd, 2001).

Como habitante del filoplano: debido a que se han recuperado cepas de este organismo a partir de hojas de coníferas, y se ha propuesto que estas hojas tienen una función protectora contra los rayos ultravioleta.

Como microorganismo del suelo: se le considera como parte de la gran diversidad de microorganismos presentes en el suelo, donde permanece como espora en estado latente, hasta que las condiciones son apropiadas para su germinación. Aunque todavía existen varias interrogantes de la interacción de *Bt* con otros organismos del suelo y de su papel activo en este sistema (Schnepp *et al.*, 1998; Rojas, 2003).

### **USO DE PRODUCTOS DE *Bacillus thuringiensis*.**

Se ha considerado que la biotecnología engloba principios de ingeniería e investigación científica para el desarrollo de productos biológicos mejorados, elaborados con procesos que involucran el uso de organismos vivos o sus productos metabólicos, estos procesos conducen a la fabricación de productos con alto valor agregado y aseguran una buena comercialización (Pueppke, 1999). En el sector de la producción agrícola, la biotecnología basada en técnicas de ingeniería genética, química e industrial; se ha enfocado a dar solución al problema de la baja producción y pérdidas económicas de cultivos, provocadas por factores bióticos y abióticos del campo, para lograr una agricultura sustentable (Menn, 1999).

En este sentido la biotecnología coadyuva al control biológico de plagas mediante la producción y comercialización de bioinsecticidas. Este tipo de práctica se define como la actividad en la que se manejan o introducen una serie de enemigos naturales que pueden ser clasificados como depredadores, parasitoides ó entomopatógenos, con el objetivo de limitar las poblaciones de organismos que afecten a una plantación determinada.

Dentro de la industria de los bioinsecticidas se incluyen a organismos:

- ❖ Entomopatógenos: que infectan al insecto provocándole, en la mayoría de los casos, la muerte.

- ❖ Entomófagos: Incluye insectos predadores o parásitos de insectos plaga.
- ❖ Compuestos con actividad insecticida derivados de plantas: como *Chrysentemus sp.* que produce el aceite neem capaz de inhibir el crecimiento de larvas.
- ❖ Plantas y organismos modificados genéticamente (transgénicos) con actividad insecticida (Baum *et al.*, 1999).

Los bioinsecticidas más efectivos elaborados con organismos entomopatógenos son aquellos que infectan al insecto y se reproducen en él hasta causarle la muerte (hongos, virus, bacteria y protozoarios). En cuanto a la comercialización de entomopatógenos, el mayor mercado mundial lo ocupan los productos elaborados a partir de hongos y bacterias como *Beauveria bassiana*, *Metharhizium anisopliae*, *Sterinemema sp.*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Bacillus thuringiensis*. De estos se sabe que más del 90% de los productos utilizados en la agricultura son diseñados en base a la bacteria *Bt*. La venta de estos productos en el año 2000 fue de casi US\$200 millones; aunque en algunos países el acceso a estos productos es aún limitado para los pequeños agricultores principalmente por la falta de información sobre su potencial y sus ventajas (Fernández-Cavazo y Nicholson, 2002).

En 1931 Husz utilizó medios sólidos y métodos estándares de laboratorio mezclando esporas de *Bacillus thuringiensis* de 224 cajas petri con 6kg. de talco para la producción de polvos. Steinhaus y Hall en 1951 y 1954 produjeron *B. thuringiensis* en cajas con agar. Actualmente se desarrollan los métodos de producción por cultivo sumergido, los cuales son más eficientes y económicos y permiten la producción a mayor escala, con menos contaminación y mejor control de calidad. La producción a escala comercial se realiza en biorreactores cuyo medio de cultivo es a base de materia orgánica barata, una vez obtenido el fermentado, este se formula de acuerdo a su presentación comercial (Bernhard, & Utz, 1993). Las ventajas del bioinsecticida son:

- Actúa específicamente.
- Los organismos blanco no desarrollan resistencia fácilmente (como es el caso de los productos químicos)
- Es inocuo para el hombre y para el medio ambiente.

### **RESISTENCIA DE ESPORAS DE *Bacillus* A AMBIENTES EXTREMOS.**

A mediados del siglo XIX Tyndall, Cohn y Koch de manera independiente descubrieron que ciertas especies de bacterias podían pasar gran parte de su vida en una estructura celular latente, llamada Espora. La cual es una forma de vida muy resistente, capaz de sobrevivir a una gran variedad de ambientes extremos (Slepecky y Leadbetter 1994). Un ambiente extremo se define como aquél en el que uno o varios de los parámetros de mayor relevancia para el desarrollo de la vida, como la temperatura, la acidez, la salinidad, la presión o el nivel de radiación se consideran hostiles desde el punto de vista del hombre. Los organismos que viven en estos ambientes se denominan extremófilos, los cuales están adaptados al medio, ya que todos sus componentes funcionan de manera óptima en esas condiciones extremas (Casal *et al.*, 2004).

A pesar de la diversidad mostrada por especies bacterianas formadoras de esporas, sobre las que más se tiene información molecular son las de forma bacilar del género *Bacillus* y *Clostridium*. Las condiciones que obligan a una bacteria a formar esporas son básicamente la escasez en su medioambiente de fuentes de carbono, nitrógeno o fosfato; representando este proceso de diferenciación, una estrategia con la cual la bacteria asegura su supervivencia (Cano y Borucki 1995; Rojas, 2003). Durante

la esporulación se presenta una inactividad metabólica, pero es capaz de continuar monitoreando los nutrientes de su alrededor y responder rápidamente a las condiciones apropiadas para su germinación, la espora también es capaz de resistir condiciones dañinas físicas o químicas (Nicholson *et al.*, 2000). Como las que se describen a continuación.

Se han realizado numerosos estudios de resistencia en *Bacillus subtilis*, debido a su fácil manipulación genética y a la disponibilidad de secuencias genómicas completas. Los estudios se ha enfocado a probar la resistencia de la espora a:

- Calor seco/húmedo
- Desecación
- Químicos
- Radiación con rayos gamma
- Alta presión hidrostática
- Radiación con luz UV

Existen numerosos parámetros y condiciones que contribuyen a la resistencia de las esporas, entre los cuales se tiene:

- Contenido plasmidico
- Condiciones que obligan a la bacteria a formar esporas
- Cubierta de la espora
- Permeabilidad del centro de la espora (Stewart *et al.*, 1980)
- Contenido de agua y minerales en el centro de la espora
- Saturación del DNA con proteínas SASP tipo  $\alpha/\beta$ .

La importancia de todos estos factores es multifactorial y varía de acuerdo a la especie y a las propiedades de resistencia de cada espora (Nicholson *et al.*, 2000).

Además de los parámetros antes mencionados la espora cuenta con mecanismos bioquímicos y genéticos durante todo el ciclo de vida (crecimiento, esporulación y germinación) para mantener su viabilidad, como son:

1.-Prevenir el daño que inactive de manera crítica los componentes celulares necesarios para la germinación y la reanudación del crecimiento.

2.-Durante la germinación, reparar o reemplazar los componentes dañados, antes de que sean inactivos y esto conlleve a una muerte celular (Nicholson y Fajardo-Cavazo, 1997).

Para prevenir el daño que inactive de manera crítica los componentes celulares de la espora; el DNA es saturado con un grupo de proteínas llamadas SASP tipo  $\alpha/\beta$ , las cuales son sintetizadas durante la esporulación y degradadas durante las primeras etapas de germinación de la espora. La función de estas proteínas es anclarse a lo largo de la cadena de DNA y cambiar su conformación de hélice B a hélice A, evitando que el DNA interactúe con los agentes causantes de daño. Cuando las SASP son deficientes en su actividad puede ocurrir la muerte de la espora con agentes como la radiación debido a que esta actúa directamente sobre la cadena de DNA (Setlow, 1988; Nicholson, *et al.*, 2000).

Cuando se ha rebasado la protección del DNA al daño, se utilizan mecanismos que dirigen, o participan en los procesos de reparación de las alteraciones inter o intracatenarias de la doble hélice del DNA. En la tabla 2 se enlistan algunos genes que codifican sistemas de reparación de DNA dañado, por radiación UV en *Bacillus subtilis*.

**Genes relacionados con mecanismos de reparación de daños generados por luz Uv en *Bacillus subtilis***

| <b>Nombre del gen</b> | <b>Descripción</b>   |
|-----------------------|--|
| <i>pcr A</i>          | DNA helicasa dependiente de ATP.   |
| <i>rad A</i>          | También conocida como Sms; participa en procesos de reparación homologa como coadyuvante de Rec G. |
| <i>splb</i>           | Codifica para las Sp-liasas.   |
| <i>spo VFA</i>        | Subunidad A de la sintasa dipicolínica.  |
| <i>spo VFB</i>        | Subunidad B de la sintasa dipicolínica.  |
| <i>uvr A</i>          | Subunidad A de la endonucleasa ABC.  |
| <i>uvr B</i>          | Subunidad B de la endonucleasa ABC.  |
| <i>uvr C</i>          | Subunidad C de la endonucleasa ABC.  |
| <i>uvr X</i>          | Proteína que repara daños por UV.  |
| <i>yac K</i>          | Se desconoce, pero se propone que es similar a la proteína piruvato oxidasa.                       |
| <i>yob H</i>          | Se desconoce pero se propone que es similar a las proteínas de reparación Uvr                      |
| <i>yvk C</i>          | Se desconoce pero se cree que es similar a la piruvato agua dicinasa.                              |
| <i>ywj D</i>          | Se desconoce pero se propone que es similar a una Uv-endonucleasa.                                 |

Tabla 2. (Tomada y modificada de <http://genolist.pasteur.fr>).

***Bacillus thuringiensis* Y SU RESISTENCIA A LUZ UV.**

Se sabe que *Bt* posee una limitada persistencia en hojas de maíz y fríjol, que va de 48 a 72 h. después de la aspersión de esporas y cristales, debido a su sensibilidad a la radiación solar y a la desecación (Sánchez-Yañes y Peña-Cabriales, 2000). Para resolver este problema, algunos productores han formulado bioinsecticidas basándose en la clonación del gen de la  $\delta$ -endotoxina, para incorporarlo a un plásmido, el cual se inserta a un aislado de *Pseudomonas fluorescens* (Gaertner *et al.* 1993). A las células bacterianas recombinantes se les permite crecer en un medio de cultivo adecuado para que expresen la  $\delta$ -endotoxina y posteriormente se les aplica un tratamiento de alta temperatura. Las células bacterianas muertas sirven de microcápsulas que protegen a la frágil toxina de *Bacillus thuringiensis* (Ibarra, 2000).

Históricamente la investigación del daño que causa la luz Uv al DNA marco el comienzo de los estudios de reparación de daño a DNA. La radiación solar consiste principalmente en luz UV-C (100-280 nm), UV-B (280-320 nm) y UV-A (320-400 nm). A una longitud de onda de aproximadamente 260 nm se considera que la luz tiene una actividad germicida, ya que corresponde al pico de absorción del DNA, afectando incluso a células bacterianas esporuladas, provocando mutaciones en el DNA por la formación de fotoproductos de la espora, que son químicamente diferentes a los de la célula vegetativa (Fridberg, 1995).

Se sabe que las esporas pueden ser de 10 a 50 veces más resistentes que las células vegetativas a una radiación de 254 nm (Setlow, 1988). Sin embargo Myasnik *et al.* en el 2001 realizaron un estudio comparativo de resistencia entre varias especies de *Bacillus*, proponiendo que eran varios los factores que contribuían a la resistencia de las esporas expuestas a luz UV entre los cuales se tenía el contenido plasmídico, el contenido de proteínas SASP, el bajo contenido de agua en las esporas así como las capas que cubren la espora, particularmente la capa mas interna (Myasnik *et al.*, 2001),

encontrando que los niveles de resistencia de las diferentes especies parece estar mas relacionado con la presencia de las proteínas SASP y con la eficiencia de sus sistemas de reparación relativamente libre de errores (Risenman y Nicholson, 2000).

Por estudios de irradiación con UV realizados en *Bacillus subtilis* se sabe que la bacteria puede acumular en su DNA diversos daños; en estado esporulante con radiación de 360-390 nm ocurre la formación de 5 timina 5-6 dihidrotimina o fotoproducto de la espora, por la formación de 2 radicales de timina (Varghese, 1970), por lo menos el 30% de la timina del DNA puede ser convertido en este fotoproducto (Figura 5). Este daño parece estar relacionado con el estado de hidratación del DNA en hélice A, ya que la cadena se encuentra deshidratada, esto se favorece por la interacción con las proteínas SASP (Setlow 1992).

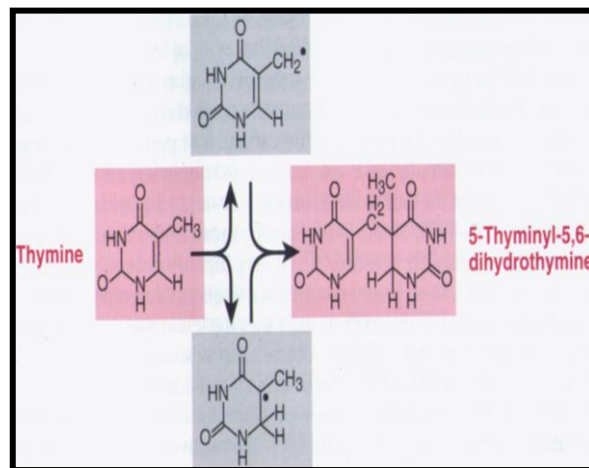


Figura 5. Formación de 5 timina 5-6 dihidrotimina por luz Uv (Friedberg *et al.*, 1995)

En las esporas expuestas a altas dosis de luz Uv (mayores a 5 KJ/m<sup>2</sup>) se da la formación de los Fotoproductos pirimidina-pirimidina 6-4 o simplemente lesión 6-4 (Figura 6), las cuales se forman por la unión covalente entre el C-6 de una pirimidina con el C-4 de otra pirimidina adyacente. Las uniones pueden ser entre CC, TC y TT, donde estas últimas son las menos comunes. Dichas lesiones causan la mayor distorsión a la doble hélice y ocurren con mucha menor frecuencia que los típicos Dímeros de Pirimidina (Taylor y O'Day, 1990). Estos fotoproductos son reparados por las SP-liasas, codificadas por el gen *spl B* en *Bacillus subtilis* o también conocidas por Fotoliasas codificadas por el gen *phr* en *E. coli*, siendo para ambos casos la misma proteína, este daño también puede ser reparado por el sistema de reparación por Escisión de Nucleótidos codificado por los genes *uvr*, durante las primeras etapas de germinación (Fajardo-Cavazo *et al.*, 1993; Lewin, 2001).

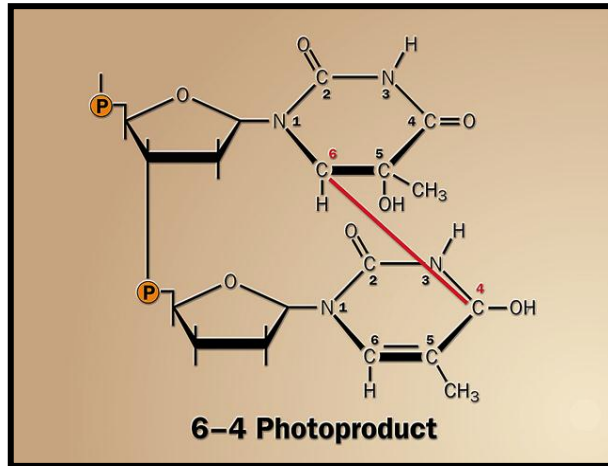


Figura 6. Fotoproductos pirimidina-pirimidina 6-4 o lesión 6-4 (Nelson y Cox, 2000).

Otro daño que se presenta en el DNA de microorganismos irradiados con una longitud de onda de 260nm, es la formación de los Dímeros de Ciclobutano de Pirimidina (Figura 7), debido a que los fotones de energía son absorbidos por las bases, se generan radicales libres contiguos que inician la formación de enlaces covalentes entre los C-5 y C-6 de 2 pirimidinas adyacentes, formando una estructura de anillo (Setlow, 1999). Se propone que existen alrededor de 12 isoformas de estos anillos, que son altamente estables a diferentes condiciones de pH y a temperaturas extremas, estas estructuras provocan gran distorsión en la  $\alpha$ -hélice e inducen un arresto obligatorio de la orquilla de replicación (Chang *et al.*, 1985). Este daño es reparado mediante un proceso llamado Fotoreactivación enzimática, donde los dímeros son monomerizados en presencia de las fotoliasas (Friedberg, 1995).

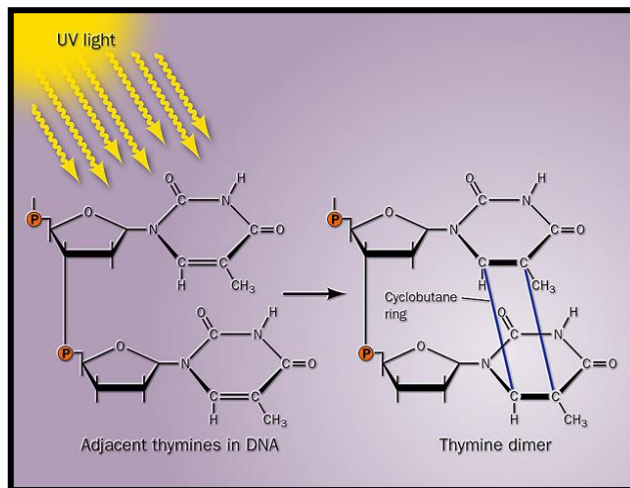


Figura 7. Enlaces covalentes entre dos timinas adyacentes para la formación de los Dímeros de Ciclobutano (Nelson y Cox 2000).

## MECANISMOS DE REPARACION A DNA DAÑADO POR LUZ UV.

Todas las células poseen varias vías para reparar el DNA que ha sido dañado; la o las vías que van a usarse depende del tipo de daño sufrido y del estado en que se encuentra la célula. La presencia de dímeros de pirimidina en el DNA provocan un distorsión estructural; cuando el DNA es replicado, la distorsión obliga a que la horquilla se detenga hasta que el daño sea reparado, pero también se propone que la horquilla puede “brincar” sobre el dímero y reestablecer la replicación mas adelante quedando un hueco en la cadena. En *Bacillus subtilis* se ha identificado una vía que repara los fotoproductos de la espora, esta vía es llevada a cabo por la enzima SPliasa, codificada por el gen *spl B* (Fajardo-Cavazo *et al.*, 1993). Dicha enzima juega un papel muy importante en la resistencia de las esporas irradiadas con luz UV-C (Xue y Nicholson, 1996). Se ha calculado que existen alrededor de 20 moléculas de SPliasa por célula (Foster, 1992), las cuales se anclan específicamente a cadenas de DNA que contengan dímeros, su anclaje es igualmente eficiente en DNA de doble cadena, súper enrollado o relajado, así como de cadena sencilla (Sancar, *et al.*, 1985). La modificación de los Dímeros se hace dentro de una cavidad en la enzima, esta cavidad al ser cerrada por la presencia del fotón de luz se vuelve activa; el fotón de luz es captado por los cromóforos FADH y MTFH y de esta forma se realiza el corte del enlace covalente entre las timinas, regresando a su conformación nativa (Fajardo-Cavazo *et al.*, 1993; Lewin, 2001) (Figura 8).

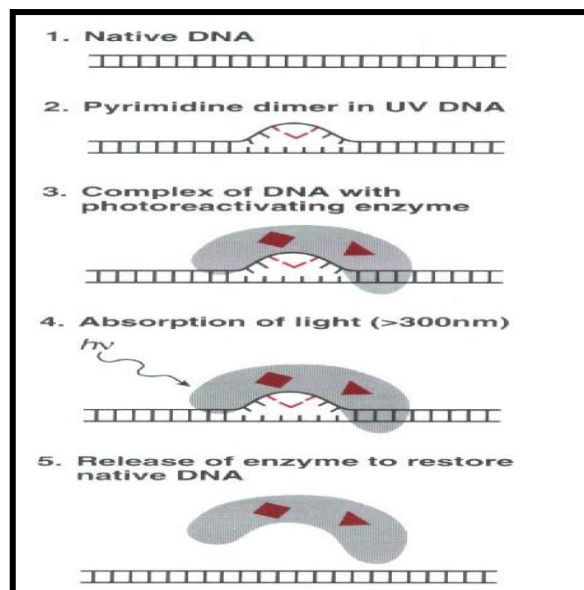


Figura 8. Mecanismo de reparación de la SPliasa para reparar la formación de Dímeros de Pirimidina en DNA irradiado con luz Uv; en el esquema de la enzima se representan en rojo los cromatoforos (Friedberg *et al.*, 1995).

En cuanto al mecanismo de Reparación por Escisión de Nucleótidos o Sistema uvr, se le considera un sistema muy importante para la sobrevivencia de organismos con daños en su DNA, ya que se sabe que este es un sistema muy eficiente y es capaz de reparar diferentes tipos de daño en el DNA irradiado, incluyendo Dímeros de Ciclo butano y la Lesión 6-4, además de que colabora en la Reparación por Recombinación para remover los entrecruzamientos causados en la cadena por otros agentes de daño. Mutantes en este Sistema de Reparación son eliminadas a dosis muy bajas de luz Uv.

Este sistema depende de los productos codificados por los genes *uvr*, para formar la endonucleasa *uvrABC* (Figura 9), donde dos moléculas de *UvrA* y una molécula de *UvrB* forman un complejo que se ancla de forma no específica al DNA, migrando sobre la cadena hasta encontrar el sitio donde la hélice posee distorsión, en este momento el complejo se detiene, la molécula *UvrB* se ancla al sitio dañado y las moléculas *UvrA* son disociadas usando ATP, esto permite que la tercera molécula, la endonucleasa *UvrC*, corta 7 nucleótidos del DNA en su extremo 5' y de 3-4 nucleótidos hacia el extremo 3' respecto del sitio dañado, para lo cual también se requiere ATP, una vez removido el fragmento por parte de la helicasa *UvrD*, la DNA Polimerasa I sintetiza la cadena que fue removida, tomando como molde la cadena complementaria; finalmente la DNA-ligasa une covalentemente el extremo 3' del nuevo material con la cadena ya existente (Lang y Champress. 1997).

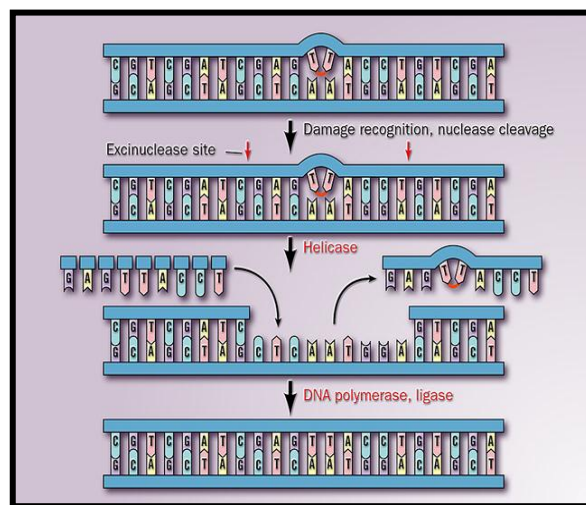


Figura 9. Sistema de Reparación por Escisión de nucleótidos (Nelson y Cox 2000).

La reparación por escisión de nucleótidos es activada por la presencia de dímeros, pero la reparación por recombinación es usada únicamente cuando se presenta un duplex en donde una de las cadenas lleva una copia de la secuencia dañada o un hueco formado durante la replicación de DNA dañado. Este sistema utiliza mecanismos que se sobrelapan con aquellos que están involucrados en recombinación genética. La reparación por recombinación también es conocido como reparación post-replicación, ya que funciona después de la replicación. En *E. coli* es dirigido por los genes *rec*, los cuales codifican dos vías; una vía involucra los genes *rec BC*, que esta encargada de reestablecer la horquilla de replicación después de que el daño fue reparado. La otra vía esta dirigida por los genes *rec FOR*, para reparar los huecos en la cadena hija; ambas vías están controladas por la acción de la proteína *RecA* (Lewin, 2001).

Mediante mutaciones en los genes *uvr*, se ha comprobado que ambas vías, *uvr* y *rec*, no son independientes, de tal forma que previo a la reparación por recombinación, se da la participación del complejo *uvrABC*, el cual es el encargado de localizar y cortar el daño provocado por los dímeros en una de las cadenas; la formación de un extremo 3' provoca que el complejo *Rec BCD* se una a la cadena de DNA y migre sobre ella con una actividad doble, la de helicasa, para ir desenrollando el duplex y, como nucleasa, degradando solo una porción de la cadena única, con el extremo 3' libre. *Rec A* reconoce la cadena única de extremo 3' que no ha sido degradada y con ayuda de ATP promueve el intercambio de cadenas, para invadir una región homóloga del duplex donante,

generándose el asa D; el tetrámero ruv A que reconoce las uniones de Holliday, rodea las cadenas de DNA junto con el hexamero ruv B, la helicasa rec G y ATP proporcionan el motor para la migración de las ramas; las brechas formadas serán llenadas por síntesis de DNA y finalmente las uniones serán resueltas por la endonucleasa ruv C (Figura 10) (Beam *et al.*, 2002; Lewin, 2001).

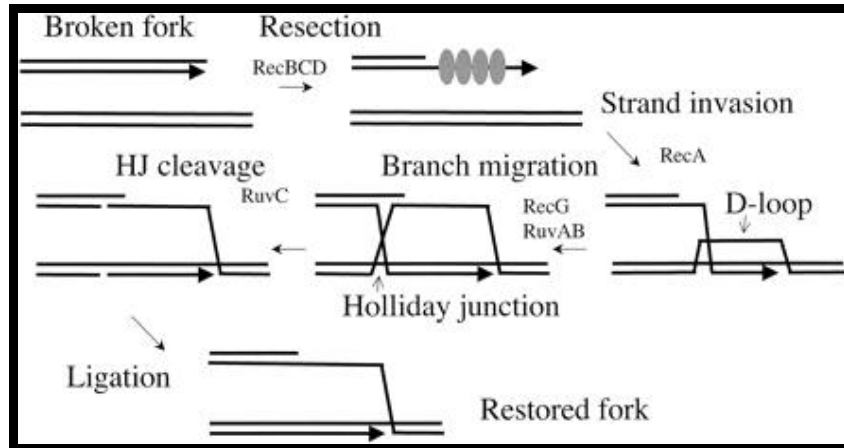


Figura 10. La ruptura de doble cadena inicia la Reparación por Recombinación (Beam *et al.*, 2002.)

La regulación y operación de los mecanismos de reparación antes mencionados se encuentran íntimamente relacionados, debido a que su expresión está bajo el control de la Respuesta SOS (Figura 11). Esta respuesta es la encargada de la expresión de más de 20 genes que son los responsables de la sobrevivencia de la bacteria (Friedberg *et al.*, 1995). La respuesta es inducida por daño a la cadena de DNA, su regulación está dirigida por las proteínas Rec A y su represor Lex A que también se reprime a sí mismo y a los 20 genes SOS. Aun cuando la cadena no ha sufrido daño alguno, ambos genes *recA* y *lexA* se transcriben a muy bajos niveles ya que la proteína Rec A además de participar en procesos de reparación también participa en procesos de recombinación (Salles y Paolletti, 1983).

Cuando el DNA sufre daño, la horquilla de replicación queda arrestada y se da un incremento en la formación de cadenas únicas, lo cual es una señal intracelular para que se genere una inducción de la respuesta SOS. Así la actividad coproteasa de la proteína Rec A se activa y degrada al represor Lex A, que se encuentra anclado en el promotor de los genes a los que les impide su transcripción. Una vez cortado el represor Lex A, se da la síntesis de los productos codificados por los genes SOS. En estas condiciones se puede incrementar la expresión entre 50 a 100 veces (Howard-Flanders, 1981; Nelson y Cox, 2000).

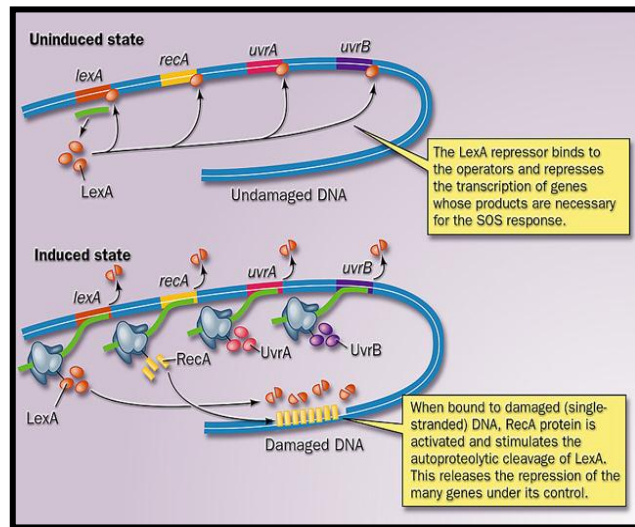


Figura 11. Respuesta SOS inactiva y activa después de sufrir daño la cadena de DNA (Nelson y Cox, 2000).

## JUSTIFICACION

*Bacillus thuringiensis* posee características que actualmente le permiten ser usado como agente biológico para el control de plagas e insectos vectores de enfermedades debido a la gran variedad de toxinas producidas por sus diferentes subespecies, que, solas o con actividad sinérgica son capaces de controlar un número importante de plagas. Los productos formados con esta bacteria se conocen como bioinsecticidas y tienen un bajo precio. Dichos productos poseen una alta especificidad contra insectos como lepidópteros, dípteros y coleópteros sin producir daño alguno a organismos no blanco, entre ellos el hombre.

La formación de esporas es una de las principales propiedades de *Bacillus thuringiensis* que le permite permanecer en el ambiente, protegiéndolo de una gran variedad de condiciones adversas tales como la escasez de nutrientes, la destrucción por competencia y la radiación solar.

Sin embargo la radiación solar rica en longitudes de onda en el espectro Uv, es la causa principal de la inactivación de su toxina y del daño al material genético de la espora, lo que reduce su eficiencia y provoca la desaparición *B. thuringiensis* del ambiente.

Un enfoque interesante de investigar en la biología de *B thuringiensis*, es la posibilidad de contrarrestar el daño provocado por la radiación con luz Uv, en las células vegetativas o en las esporas, si se sobreexpresan algunos de los genes de reparación del daño en DNA. Con lo cual se pudiera conseguir la mejora ambiental de este importante bioinsecticida.

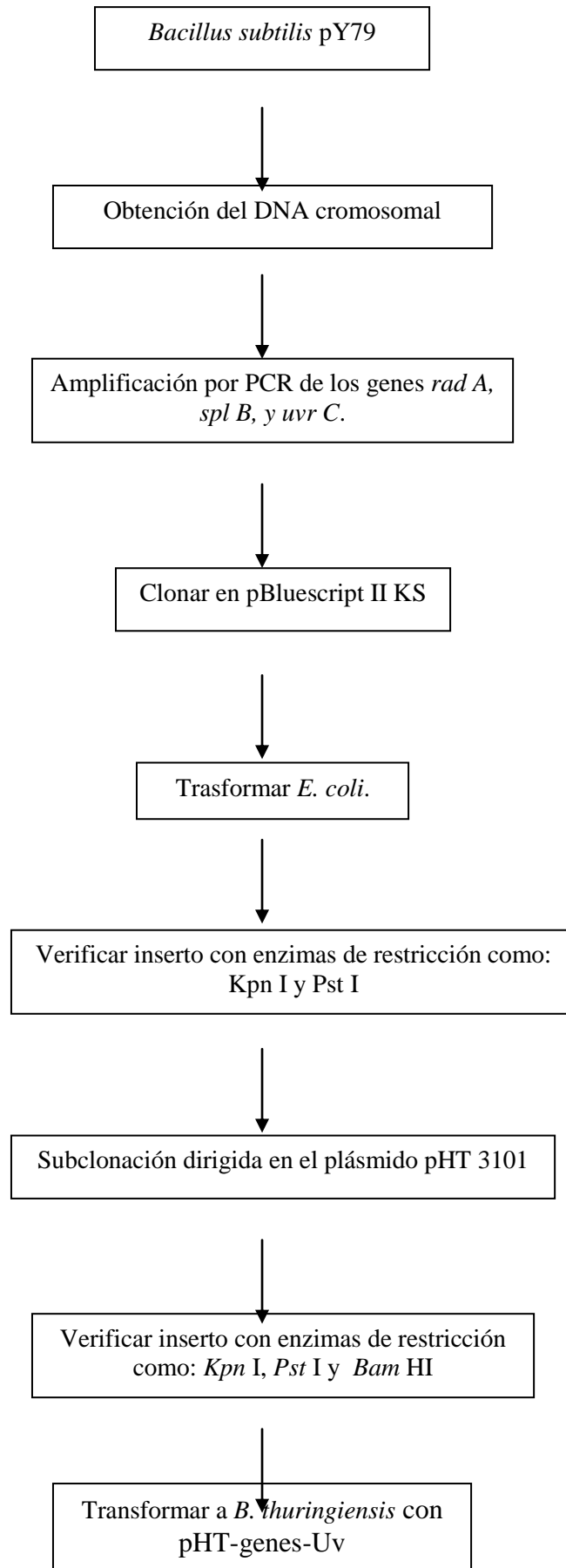
## OBJETIVO

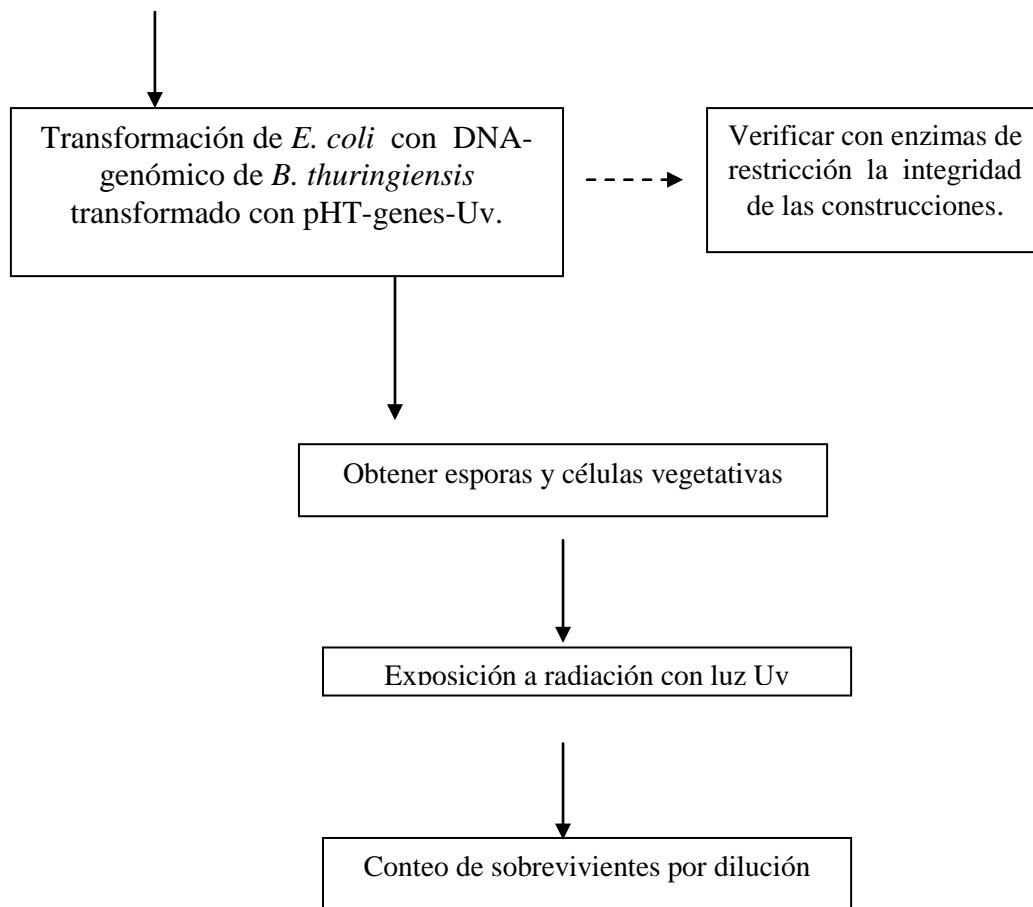
Evaluar la sobrevivencia de *Bacillus thuringiensis* expuesto a luz ultravioleta, en función de la sobre expresión de genes relacionados con la reparación del DNA.

## METAS

- Proponer juegos de oligonucleótidos para la amplificación y clonación de genes relacionados con la fotoreparación del DNA en *Bacillus subtilis*.
- Obtener por medio de PCR algunos genes relacionados con la reparación del DNA de *Bacillus subtilis*.
- Clonación de los productos de PCR en el plásmido pBluescript II KS y subclonar en el plásmido bifuncional pHT 3101.
- Transformación de *Bacillus thuringiensis* con genes de reparación clonados en pHT 3101.
- Valoración de la sobrevivencia de las transformantes de *Bacillus thuringiensis* en condiciones controladas de laboratorio con irradiación.

## ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO.







### Uvr C

Delantero :

GGTACCAAATGATTGCACCTGTTG

Reverso : GAGCTCTTCTTGACAGCCTTACA

En este trabajo

2.4 Kpb

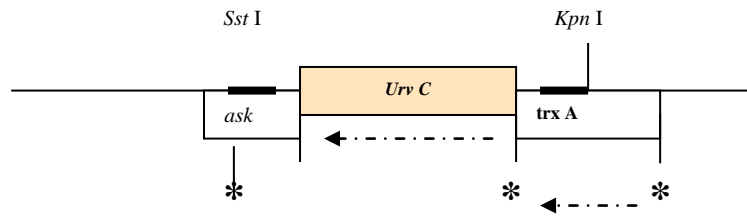


Figura 13.-Los oligonucleotidos se diseñaron ~300 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción, para asegurar que se tomara la secuencia correspondiente al promotor (\*) y ~300 pb río abajo.

### Spl B

Delantero :

GGGCCCCGGGTATAGAAGGACACAA

Reverso :

GGTACCTGAAGATGTGATGGAAGG

En este trabajo

1.4 Kpb

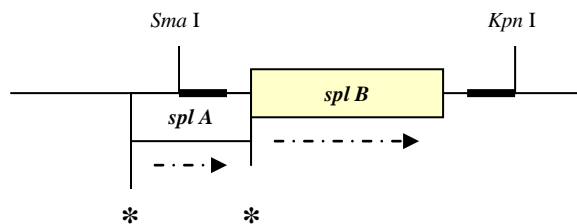


Figura 14.-Los oligonucleotidos se diseñaron ~300 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción, para asegurar que se tomara la secuencia correspondiente al promotor (\*) y ~300 pb río abajo.

### Rad A

Delantero :

GGTACCACGCCTGAAAGAACAAGA

Reverso :

GAGCTCATAGGATCTTTTGACCAG

En este trabajo

1.9 Kpb

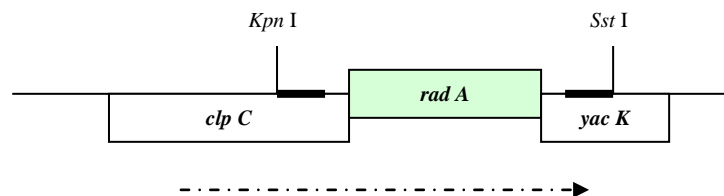


Figura 15.-Los oligonucleotidos se diseñaron ~300 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción, para asegurar que se tomara la secuencia correspondiente al promotor (\*) y ~300 pb río abajo.

## Soluciones y Medios de cultivo.

### Medio LB

|          |    |      |
|----------|----|------|
| Peptona  |    | 10 g |
| NaCl     |    | 5 g  |
| Extracto | de | 5 g  |
| Levadura |    |      |
| pH       |    | 7    |

### Medio Sock

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Extracto de Levadura | 0.5%  |
| Triptona             | 2 %   |
| KCl                  | 2.5%  |
| MgCl                 | 10 mM |
| Mg SO <sub>4</sub>   | 10 mM |
| Glucosa              | 20 mM |
| NaCl                 | 10 mM |

### Medio Tris G

|  |          |
|--|----------|
| CaCl <sub>2</sub> . H <sub>2</sub> O   | 0.008%   |
| FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O | 0.00025% |
| CuSO . 5 H <sub>2</sub> O              | 0.0005%  |
| ZnSO . 7 H <sub>2</sub> O              | 0.0005%  |
| MnSO . H <sub>2</sub> O                | 0.005%   |
| MgSO <sub>4</sub>                      | 0.02%    |
| Glucosa                                | 0.2%     |
| Tris pH 7.5                            | 50 mM    |
| Extracto de Levadura                   | 0.15%    |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>        | 0.05%    |
| Agar                                   | 1.5%     |

### Medio LB Light

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Peptona              | 2 g   |
| NaCl                 | 5 g   |
| Extracto de Levadura | 1 g   |
| pH                   | 7.0   |
| Agar                 | 1.6 % |

### Solución A

|          |       |
|----------|-------|
| Glucosa  | 50 mM |
| Tris HCl | 25 mM |
| EDTA     | 10 mM |
| pH       | 8.0   |

**Solución B**

|                  |      |
|------------------|------|
| NaOH             | 10 N |
| SDS              | 20 % |
| H <sub>2</sub> O |      |

**Solución C**

|                     |     |
|---------------------|-----|
| CH <sub>3</sub> OOK | 5 M |
| Ac. Acético         | 3M  |
| H <sub>2</sub> O    |     |

**Buffer de Lisis para Bacillus.**

|      |       |
|------|-------|
| Tris | 50 mM |
| EDTA | 10 mM |
| NaCl | 10 mM |
| pH   | 8     |

**Buffer de Fosfatos**

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 4.3 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 3.4 g  |
| H <sub>2</sub> O                | 250 ml |
| pH                              | 7.0    |

**TE**

|      |       |
|------|-------|
| Tris | 0.1 M |
| EDTA | 0.01M |
| pH   | 8     |

**TBE 10X**

|                     |       |
|---------------------|-------|
| Tris Base           | 108 g |
| Ac. Bórico          | 55 g  |
| EDTA (pH 8.0) 0.5 M | 40 ml |

**Solución Reguladora I**

|                   |        |
|-------------------|--------|
| RbCl              | 100 mM |
| MnCl <sub>2</sub> | 45 mM  |
| KAc               | 88 mM  |
| CaCl <sub>2</sub> | 10 mM  |
| Li Cl             | 0.5 mM |
| Glicerol          | 15 %   |
| pH                | 5.8    |

**Solución Reguladora II**

|          |       |
|----------|-------|
| MOPS     | 10 mM |
| CaCl 2   | 15 mM |
| RbCl     | 10 mM |
| Glicerol | 15 %  |
| pH       | 7.0   |

|                          |                                 |
|--------------------------|---------------------------------|
| <b>Sarcosil</b>          | 20 %                            |
| <b>Acetato de Sodio</b>  | 3 M                             |
| <b>Acetato de Amonio</b> | 7.5 M                           |
| <b>X- gal</b>            | 0.02 gr/1ml de Dimetilformamida |
| <b>Ampicilina</b>        | 100 µg / ml                     |
| <b>Eritromicina</b>      | 2 µg / ml                       |
| <b>Agarosa</b>           | 0.8 %                           |
| <b>Hidróxido de Na</b>   | 40%                             |
| <b>Bromuro de Etidio</b> | 0.1 mg / ml                     |

## **OBTENCION DE DNA CROMOSOMAL DE *Bacillus subtilis* y *B. thuringiensis*.**

Se preparó un cultivo de *Bs* en 3 ml de LB por 8h A 37° C. Se centrifugó el cultivo a 10 Krpm. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 150µl de Buffer de lisis, se le agregó lisozima 1mg/ml Se incubó por 30 min a 37°C y se le añadió sarcosinato de sodio al 1.0% y se agito. Se le agregó Fenol TE, se agitó y se centrifugó a 10 Krpm. La fase acuosa se transfirió a otro tubo y se le agregó nuevamente Fenol TE más un volumen de cloroformo, se agitó y se centrifugó. La fase acuosa se colocó en hielo, se le agregó NaAc 3 M y se precipitó en 1 volumen de etanol absoluto frío. Se centrifugó y se secó el DNA para ser resuspendido en agua destilada estéril. Se realizó una separación electroforetica DNA en agarosa al 0.8%; el gel se tiñó con Bromuro de etidio (0.1 mg/ml) (Adaptado de Guzmán *et al.*, 1988).

## **CONDICIONES PARA LA REACCIÓN DE PCR.**

Para la amplificación de los genes por PCR, se utilizó el Kit Platinum PCR Super Mix. El cual contiene:

22 U/ml complejo recombinante Taq DNA Polimerasa con anticuerpo Taq platinum.

22 mM Tris- HCL (pH 8.4)

55 mM KCl

1.65 nM Mg Cl<sub>2</sub>

220 µM dGTP, dATP, dTTP, dCTP

Para la reacción se agregó: 22.5 µl de Super Mix, la solución de DNA genómico de *Bacillus subtilis* pY79 y los oligonucleotidos a una concentración final de 200 nM aproximadamente, de cada uno. Las condiciones de amplificación fueron 94 °C por 15 segundos para la etapa de desnaturalización, 50 °C por 30 segundos para la etapa de alineamiento y 65°C por 1 minuto para la etapa de extensión por 29 ciclos. El control positivo para el programa de PCR fue la amplificación de genes *cry X*, ya antes probados. Después de amplificadas las secuencias se analizaron mediante electroforesis en agarosa al 0.8% a 90V por 70 min.

## **LIGACION**

50 ng de vector

150 ng de producto de PCR

1 µl de Enzima

5 µl de buffer de ligación

10 µl de H<sub>2</sub>O

## **DIGESTION**

60 ng de DNA plasmídico

3µl de regulador

10 U. de Enzima / 1µl (1 U. por 1µl de DNA)

22 µl de H<sub>2</sub>O

La digestión fue incubada de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

## **PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES DE *E.coli* POR RbCl.**

Se cultivó a *E. coli* por estría cruzada en una placa durante toda la noche a 37°C, para luego resembrar una colonia en 3 ml de LB caldo y ser incubada por toda la noche en agitación constante a 37°C, se tomaron 2 ml como preinoculo y se resembró en 200 ml de LB y la incubación fue a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.5. Se centrifugó el cultivo a 12 Krpm y se desechó el sobrenadante. A la pastilla se le agregaron 10ml de la solución reguladora I(Soluciones y medios de cultivos) y se dejó en hielo por 15 min para luego ser centrifugada a 12 Krpm y se desechó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 2 ml de la solución reguladora II (Soluciones y medios de cultivo), para elaborar alícuotas de 100µl en tubos independientes.

## **TRANSFORMACION DE CELULAS COMPETENTES DE *E.coli*.**

Se tomó una alícuota de células competentes y se le agregó no mas de 1/10 Vol. de la ligación, se homogenizó suavemente y se dejó en hielo por 30 min, para luego ser incubada por 10 minutos a 37°C sin agitación. Se le agregó 500 µl de LB y se dejó incubar por una hora. Se espatuló en cajas de LB-Ampicilina con X-gal e IPTG y se incubó a 37°C por toda la noche, para finalmente hacer la selección de colonias.

## **EXTRACCION Y PURIFICACION DE DNA PLASMIDICO.**

Se cultivó a *E. coli* transformada en LB liquido suplementado con Ampicilina (100 µg/ml) y se incubó por toda la noche a 37 °C. Se centrifugó a 4000 Krpm por 10 min. y se descartó el sobrenadante, el paquete celular se resuspendió en la solución A y se agitó suavemente para luego agregarle la Solución B, se agitó en vortex y se le agregó la Solución C, se dejó en hielo por 10 min. para luego centrifugarse por 5 min. Se extrajo la fase acuosa a la cual se le agrego 0.6 del volumen de Isopropanol, se dejó en hielo y se centrifugó por 10 min. a 4000 Krpm. La pastilla se dejó secar para ser resuspendida en 200 µl de agua.

Para la purificación se le agregaron 10 µl de RNAsa al 0.1% y se incubó por 30 min a 37° C. Se le agregó la mitad del volumen total de Acetato de Amonio, 1 volumen de Fenol-Cloroformo y 10 µl de Bromuro de Etidio (0.1 mg / ml), para centrifugarse por 10 min. Se extrajo la fase acuosa, se le agregó 1 volumen de Cloroformo y se centrifugó por 5 min. Se extrajo nuevamente la fase acuosa y se la agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto, se refrigeró por 10 min y se centrifugó por 5 min la pastilla se lavó con etanol al 70% y se dejó secar para ser resuspendida en agua.

## **EXTRACCION Y PURIFICACION DE BANDAS DE LOS GENES *spl B* y *rad A* LIBERADOS DE p-Bluescrip-KS.**

Se separó electroforéticamente la muestra en agarosa al 0.8%, se cortó la banda de interés y se picó, se le agregaron 500 µl de Fenol-Tris y se agitó en vortex, se congeló por 10 min a -70°C y se centrifugó, a la fase acuosa se le agregó nuevamente Fenol-Tris para luego ser centrifugada, a la fase acuosa se le agregó 1 volumen de cloroformo y se centrifugó; nuevamente se extrajo la fase acuosa y se le agregaron 200 µl de Acetato de amonio 1.5M, 1Vol. de etanol absoluto. Para precipitar, finalmente la pastilla se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en un volumen final de 30µl. de agua.

## **PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES DE *Bacillus thuringiensis*.**

De una placa de cultivo nuevo, se tomó una colonia para ser resembrada en LB líquido, se incubó a 28°C por toda la noche. Se tomó 1 ml de preinoculo y se sembró e incuboen 100 ml de LB hasta una DO<sub>600</sub> de 0.5. las células fueron lavadas dos veces con agua estéril fría y una vez mas con glicerol frío al 10%, se distribuyeron en alícuotas de 200 µl, en tubos independientes.

## **TRANSFORMACION DE CELULAS COMPETENTES DE *Bacillus thuringiensis*.**

De las células competentes se tomó una alícuota a la cual se le agregó 200 ng de DNA y se colocaron en celdas de electroporación, para darles un pulso de resistencia de 400 ohms con un pulso de energía de 1.1-1.3 KV. Posteriormente se resuspendieron en 1 ml de BHI y se incubaron por 1 hr. a 28°C para ser resembradas en LB con 2 µg / ml de Eritromicina (Bone y Ellar, 1989).

## **EVALUACION DE LA SOBREVIVENCIA DE *Bacillus* EXPUESTO A LUZ UV.**

### **Irradiación de células vegetativas de *Bacillus*.**

Se prepararon cultivos de *B. thuringiensis* en medio LB-liquido y se dejaron crecer por toda la noche con agitación constante a 28°C hasta una DO<sub>600</sub> de 1.2. Se centrifugó a 4 Krpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante y se hizo un lavado de células con Buffer de fosfatos, se resuspendió la pastilla en 4 ml de Buffer de fosfatos. Después de la resuspensión se virtieron en placas Petri estériles para ser irradiadas en el Translinkers UVP®, se expusieron a las células vegetativas a una energía de 0.05, 0.2, 0.3, 0.5 y 0.6 KJ/m<sup>2</sup> con un tiempo de exposición de 2, 4, 6, 8 y 10 s. Después, en total oscuridad se diluyeron en forma decimal y se resembraron por goteo en LB Light-Agar para su recuperación durante 17 h sin ser expuestas a la luz hasta el momento de hacer el conteo de UFC.

### **Irradiación de Esporas de *Bacillus*.**

Se prepararon cultivos de *B. thuringiensis* en medio Tris G-liquido para esporular durante 148 hrs. con agitación constante a 28°C. Se centrifugaron a 4 Krpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante y se hizo un lavado de esporas con Buffer de fosfatos, y se resuspendió la pastilla en 4 ml de Buffer de fosfatos. Se virtió la resuspensión en placas Petri estériles para ser irradiadas en el Translinker UVP®, utilizando una energía de 0.2, 0.5, 0.9, 2.3 y 4.8 KJ/m<sup>2</sup> y un tiempo de exposición de 4, 8, 16, 34 y 68 s. Después, en total oscuridad las esporas fueron diluidas en forma decimal y resembradas por goteo en LB Light-Agar para su recuperación sin ser expuestas a la luz, al igual que las células vegetativas, durante 17 h hasta el momento de hacer el conteo de UFC.

## RESULTADOS.

### DISEÑO DE OLIGONUCLEOTIDOS.

Para el diseño de oligonucleotidos empleados en este trabajo se usó a la secuencia reportada de *Bacillus subtilis subespecie subtilis* 168, No. de acceso NC 000964. El diseño se realizó para los genes *splB*, *radA*, *uvrBA* y *uvrC* tomado aproximadamente 300 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción y 300 pares de bases río abajo para cada gen; sobre cada juego de oligonucleotidos se diseñó el sitio de corte para la liberación del fragmento con las enzimas Kpn I, Pst I, Sma I. El tamaño teórico de los productos de PCR es, para *rad A* de 1.9 Kpb, para *spl B* de 1.4 Kpb, para *uvr C* de 2.4 Kpb, y para en gen biscistrónico *uvrBA* de 5.8 Kpb.

### AMPLIFICACION POR PCR Y CLONACION.

Los oligonucleótidos diseñados se usaron para amplificar los genes *splB*, *radA* y *uvrC* de *Bacillus subtilis*. El amplificado que contenía el gen *splB* se esperaba con un peso de 1.4 Kb y debería codificar la proteína SPliasa. El amplificado del gen *radA* con un peso aproximado de 1.9 Kb, codifica para la proteína Rad A, también llamada Sms (Figura 16). El amplificado que contenía el gen *uvrC* con un peso aproximado de 2.3 Kb codifica para la Subunidad C de la Endonucleasa ABC (Figura 17).

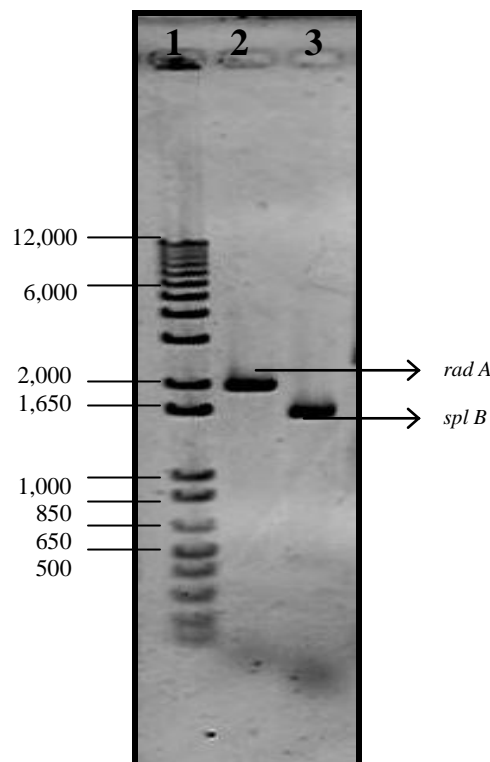


Figura 16. Amplificación de las secuencias del gen *radA* y *splB* analizados en este estudio. Carril 1 MP; carril 2 *radA* de 1.9 Kb y carril 3 *splB* de 1.4 Kb.

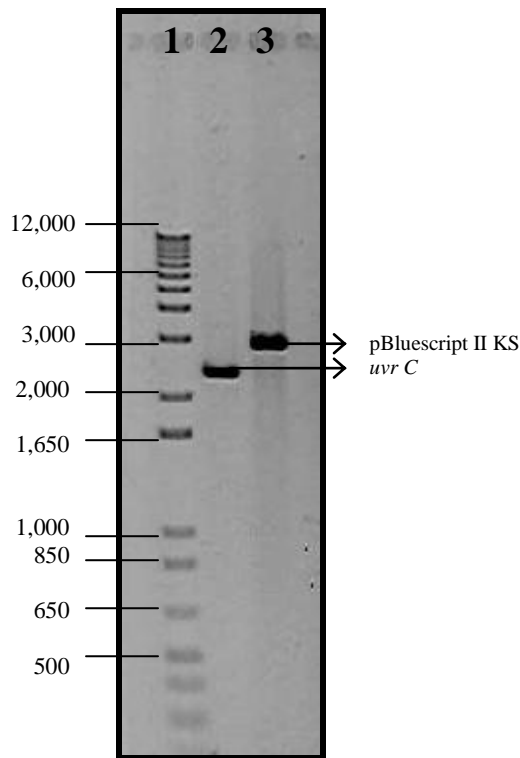


Figura 17. Amplificación de la secuencia del gen *uvrC*. Carril 1 MP; carril 2 *uvrC* con un peso de 2.3 Kb; carril 3 plásmido pBluescript KS con un peso de 2.9 Kb.

Los fragmentos de DNA obtenidos por PCR, se clonaron en el plásmido pBluescript II KS(+) de 2.9 Kb en el sitio Eco RV (Figura18). La ligación de los genes con el plásmido se realizó a 4°C por toda la noche y a 37°C por dos hrs. para después ser transformados en la cepa *E. coli* TOP 10 y seleccionarlas en placas de LB-Amp (100 µg / ml) de acuerdo al fenotipo de coloración azul por la expresión del gen β-galactosidasa. A las posibles clonaciones se les hizo el escrutinio con enzimas de restricción.

#### Plasmido pbluescript II KS (+)

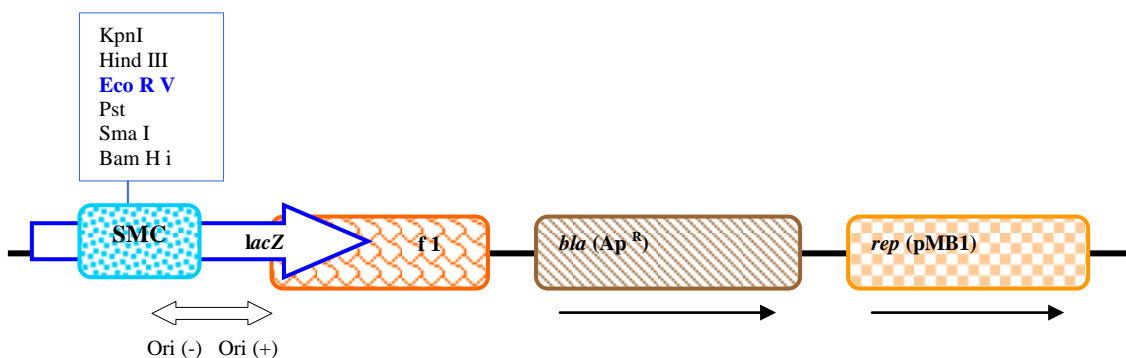


Figura 18. Mapa físico del plásmido pBluescript que se usó como vector general de clonación. Posee un tamaño de 2961 pb. Derivado de pUC 19. El vector representa dos orientaciones del sitio múltiple de clonación (SMC) + y -. El gen *lacZ* codifica para el fragmento N-terminal de la β-galactosidasa, que permite la selección de las clonaciones mediante la coloración blanco/azul de las colonias. F1 región del fago f1, que lleva la secuencia requerida en *cis* para el inicio y terminación de la síntesis del fago f1. El gen *rep* (*pMB1*) es el responsable de la replicación del fagemido. El gen *bla* (*Ap<sup>R</sup>*) codifica para la β-lactamasa que le confiere resistencia a la Ampicilina (Alting-Mees, *et al* 1989).

Para realizar el escrutinio de las posibles clonaciones, se hizo extracción de plásmido a las colonias de fenotipo blanco y se realizó un corrimiento electroforético para identificar los plásmidos con el inserto, a los cuales se les realizó una digestión para la liberación del fragmento con Kpn I y Pst I para *spl B* y Kpn I para *rad A*; los sitios de corte se encontraban sobre cada oligonucleotido y dentro del polilinker del plásmido (Figura 19a y 19b). En base a esto se comprobó la clonación de los fragmentos (Figura 20), así como la dirección en la que se encontraban; teniendo que tanto *spl B* y *rad A* se encuentra en dirección 3' a 5', respecto a la orientación del SMC en KS.

### Plásmido pKSC 1

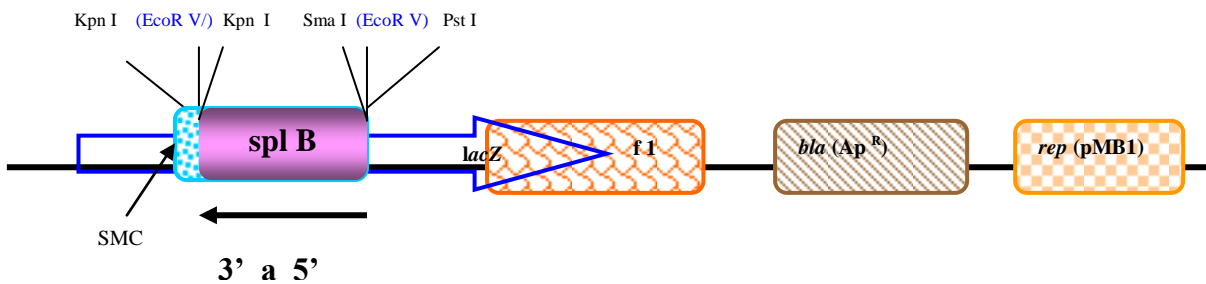


Figura 19a. Mapa físico del plásmido pKSC1, que contiene al gen *spl B* de 1.4Kpb clonado en el sitio EcoR V (el sitio cortado es representado en paréntesis) en dirección 3' - 5' con respecto a la orientación del SMC. Se esquematizan los sitios de corte diseñados sobre el oligo delantero (SmaI) y reverso (KpnI) del gen.

### Plásmido pKSC 2

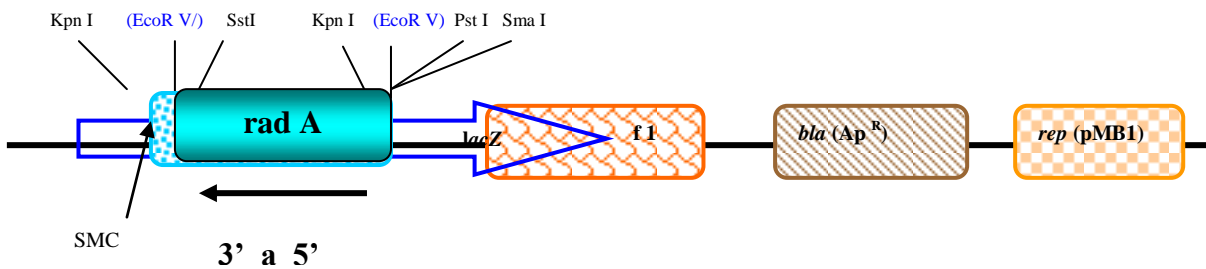


Figura 19 b. Mapa físico del plásmido pKSC2, que contiene al gen *rad A* de 1.9 Kpb clonado en el sitio EcoR V (el sitio cortado es representado en paréntesis) en dirección 3' - 5' con respecto a la orientación del SMC. Se esquematizan los sitios de corte diseñados sobre el oligo delantero (*Kpn I*) y reverso (*Sst I*) del gen.

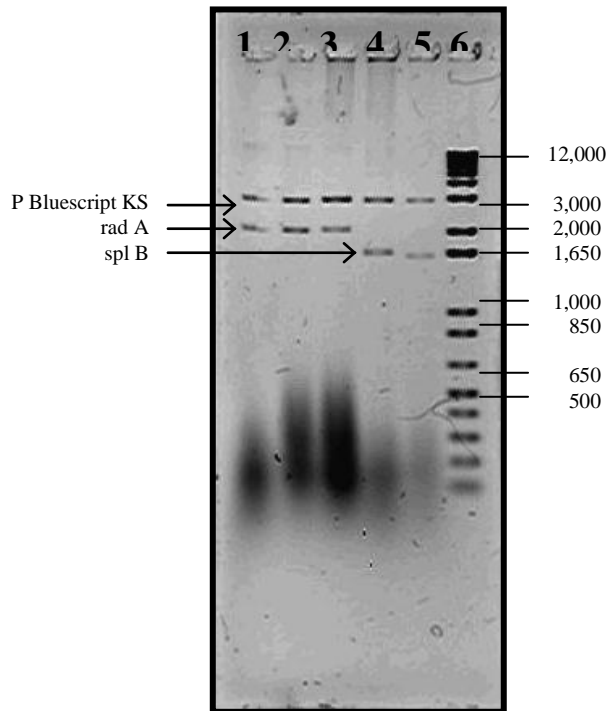


Figura 20. Escrutinio de la clonación de los genes *splB* y *radA* en el plásmido pBluescript KS (+). Carril 1,2 y 3, *radA* (1.9 Kb) liberado de KS (2.9 Kb) ; carril 4 y 5 *splB* (1.4 Kb) liberado de KS ; carril 6 MP.

### SUBCLONACION DE LOS GENES EN pHT 3101.

Los fragmentos de DNA clonados en pBluescript KS, se subclonaron en el plásmido pHT 3101 con un tamaño de 6.7 Kb (Figura 21). Para el caso de *splB* la subclonación se hizo dirigida con Kpn I y Pst I (Figura 19). El gen *radA* se clono en el sitio Kpn I; ambos genes en dirección 3' - 5' con respecto al sitio de clonación múltiple y al promotor *lacZ* en el plásmido pHT3101. Para realizar el escrutinio de las posibles clonaciones, se hizo extracción de plásmido a las colonias de fenotipo blanco y se hizo un corrimiento electroforético, las bandas de interés eran de 8 Kpb para la construcción de pHT: *spl B* y de 8.5 Kpb para la construcción de pHT: *rad A*. Se hicieron digestiones con Kpn I y Pst I para pHT: *spl B* (Figura 22 y con Bam HI para pHT: *rad A* (Figura 23).

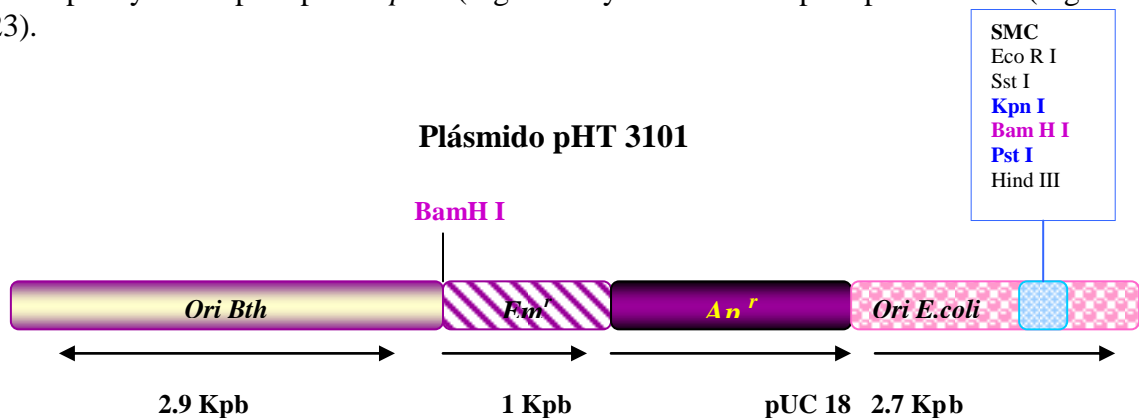


Figura 21. Mapa físico del plásmido pHT 3101, el cual se uso como plásmido bifuncional. Con un peso de 6.6 Kpb, el vector posee genes de resistencia a Eritromicina (*Em r*) y Ampicilina (*Ap r*). Posee un fragmento de 2.7 Kpb provenientes de pUC 18, donde se encuentra el sitio de múltiple clonación (SMC) así como el origen de replicación en *E. coli*. Los dos sitios de corte para Bam HI permiten cortar al plásmido en dos bandas. La flecha en ambas direcciones indica la orientación de la replicación funcional en *B. thuringiensis* (Lereclus, D., et al 1989).

## Plásmido pHSP 1

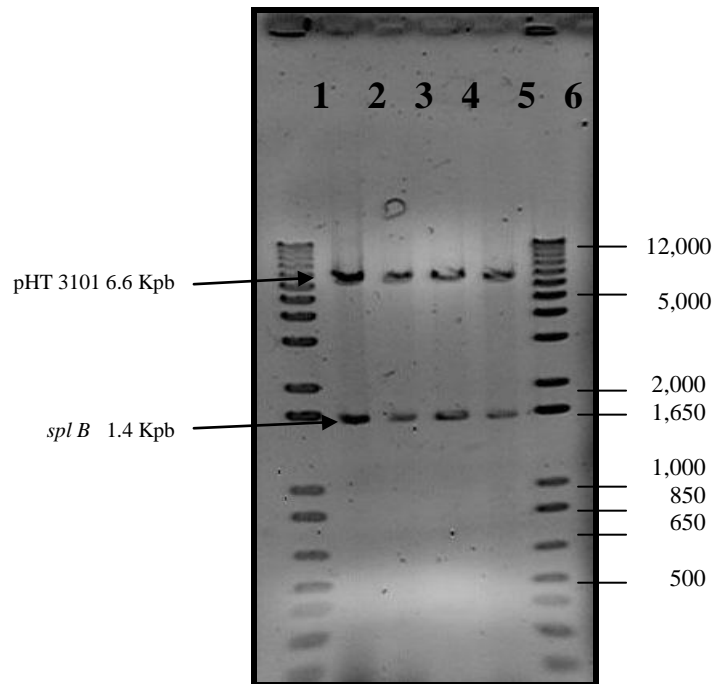
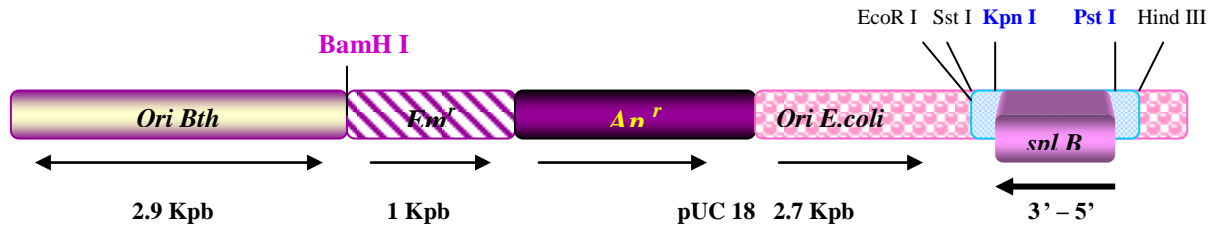


Figura 22. Mapa físico y análisis molecular del plásmido pHSP1 (arriba). La clonación se hizo dirigida en los sitios *Kpn I* y *Pst I* en dirección 3' – 5' con respecto a la orientación de SMC. El tamaño del vector mas el inserto es de 8 Kpb. Abajo, escrutinio del gen *spl B* subclonado en pHT 3101 (6.6 Kpb). Carril 1 y 6 MP; Carril 2, 3, 4 y 5 *spl B* (1.4Kb) liberado del plasmido con *Kpn I* y *Pst I*.

## Plásmido pHSP 2

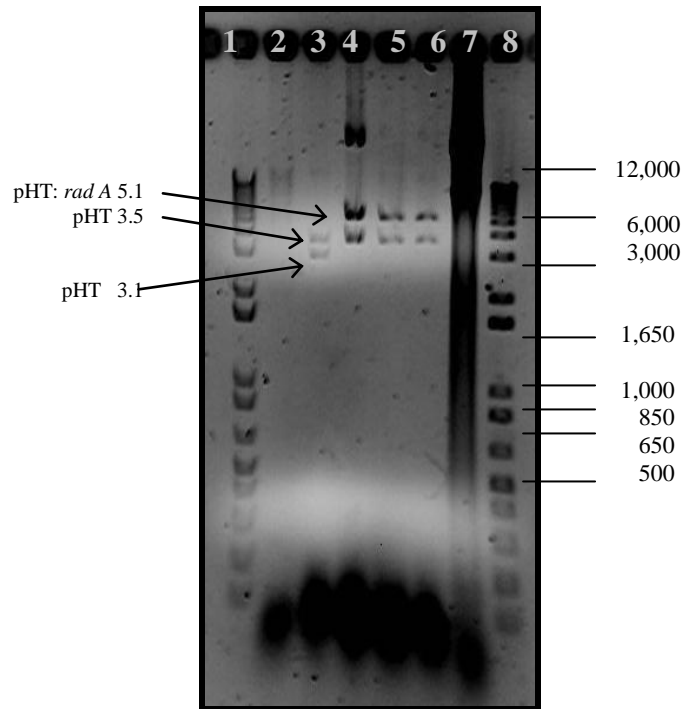
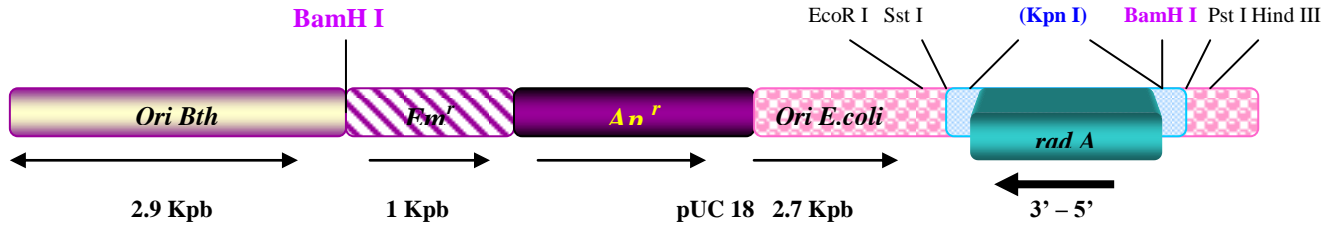


Figura 23. Mapa físico y análisis molecular del plásmido pHSP2 (arriba), la clonación se hizo en el sitio Kpn I (el sitio cortado es representado en paréntesis) en dirección 3' - 5' con respecto a la orientación del SMC. El tamaño del vector mas el inserto es de 8.5 Kpb. Abajo, escrutinio del gen *rad A* subclonado en pHT 3101. Carril 1 y 8 MP; Carril 3, pHT 3101 cortado con BamH I (3.5 y 3.1); Carril 4,5,6, pHT : *rad A* cortados con BamH I (3.5 y 5.1); carril 7 pHT.

## DETERMINACION DE LA INTEGRIDAD DE LOS PLASMIDOS QUE CONTENIAN LOS FRAGMENTOS SUBCLONADOS EN pHT 3101.

Para comprobar que *Bacillus thuringiensis* estuviera transformado con las construcciones de pHT3101: genes de reparación y que no hubieran sufrido rearrreglos moleculares, se realizó la extracción de DNA genómico contaminado con DNA plasmidico de los *Bacillus* transformados, y la extracción se utilizó para transformar a *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante electroporación. Las colonias de *E. coli* con fenotipo blanco y Ap<sup>r</sup> se les hizo la extracción de DNA plasmidico y se hizo un análisis mediante digestiones con BamH I (Figura 24). La construcción pHT:*spl B* solo mostró una banda de 8 Kb, ya que el sitio Bam HI del polilinker de pHT fue eliminado durante la subclonación. Para la construcción pHT: *rad A* la digestión con Bam HI mostró dos bandas, una de 3.5 del plásmido y otra banda de 5.1 que corresponde a un fragmento del plásmido más el gen incorporado.

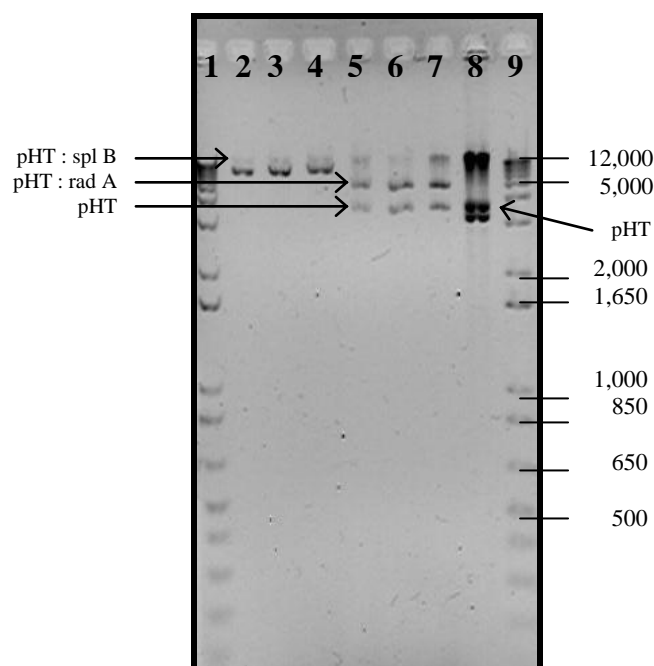


Figura 24. Escrutinio de plásmidos obtenidos por la retransformación de *E. coli* con DNA de *B. thuringiensis*. Carril 1 y 9 MP; Carril 2, 3 y 4, pHSP 1 linealizado con BamH I (8.1Kb); Carril 5,6 y 7 pHSP 2 cortados con BamH I (3.5 y 5.1); carril 8 pHT solo, digerido con BamH I.

## EVALUACION DE LA SOBREVIVENCIA POR EXPOSICIÓN A LUZ UV (260nm).

La evaluación de la sobrevivencia de *Bacillus* por exposición a luz Uv se estandarizo en *Bacillus subtilis* y posteriormente se extrapolo a *Bacillus thuringiensis*, en ambos estadios, esporas y células vegetativas. Para los ensayos se controlaron varios factores como DO<sub>600</sub> de las células vegetativas, tiempo y porcentaje de esporulación, tiempo de recuperación después de la irradiación, tiempo y cantidad de energía durante la exposición a luz Uv, así como la eliminación de factores que intervengan con el contacto directo de la luz Uv con las bacterias.

Los ensayos de irradiación se realizaron inicialmente en un transiluminador con una longitud de onda de 260 nm, los tiempos de exposición a luz Uv probados en este aparato iban de 0-15min. La eficiencia del aparato, no resulto óptima para este experimento, debido a los largos periodos de exposición y a que el aparato no permitía controlar la cantidad de energía aplicada a las bacterias. En base a esto la evaluación también se probó en el Translinkers UVP® con 260 nm de longitud, que permitió controlar la dosis y el tiempo de exposición a la radiación Uv.

La DO<sub>600</sub> requerida para la irradiación de las células vegetativas fue de 1.2, una vez alcanzada la densidad, las células fueron lavadas con buffer para la eliminación del medio de crecimiento, ya que en base a experimentos anteriores, se sabía que la presencia del medio ejercía un efecto protector en las células. Para el caso de la irradiación de esporas se requirió de al menos un 80% de esporulación, para lo cual se realizó una cinética de cultivo hasta obtener un alto contenido de esporas. Los bacillos fueron sembrados en Tris G-liquido para la esporulación; cada 24 hrs, se tomaba una muestra para ser calentada, diluida en forma decimal y sembrada en Tris G-agar para determinar la cuenta viable. El experimento se realizo de las 0 hrs. de esporulación hasta las 148 hrs para obtener así un alto porcentaje de esporulación. Determinando que con un crecimiento de 8 hrs. se obtendría la DO<sub>600</sub> adecuada para las células vegetativas y con 148hrs de esporulación para conseguir un 80% de esporas.

Para el caso de que algunas células vegetativas no esporularan completamente y pudieran alterar la cuenta viable de las esporas irradiadas, se realizaron experimentos donde previamente a la irradiación se calentaban dos cultivos de esporas para eliminar por completo las células vegetativas, un cultivo fue calentado por 40 min a 65°C y otro cultivo por 80 min a 65°C. El porcentaje de sobrevivencia se determino mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ de sobrevivencia} = \frac{\text{UFC (I) [di]}}{\text{UFC (C) [di]}} \times 100$$

La irradiación para estos dos cultivos resulto ser demasiado agresiva para las esporas de los *Bacillos*, de tal forma que después de 17 hrs de recuperación, no había sobrevivientes (Tabla 5).

Tabla 5. Eliminación de esporas de *Bacillus subtilis*, irradiadas con luz Uv.

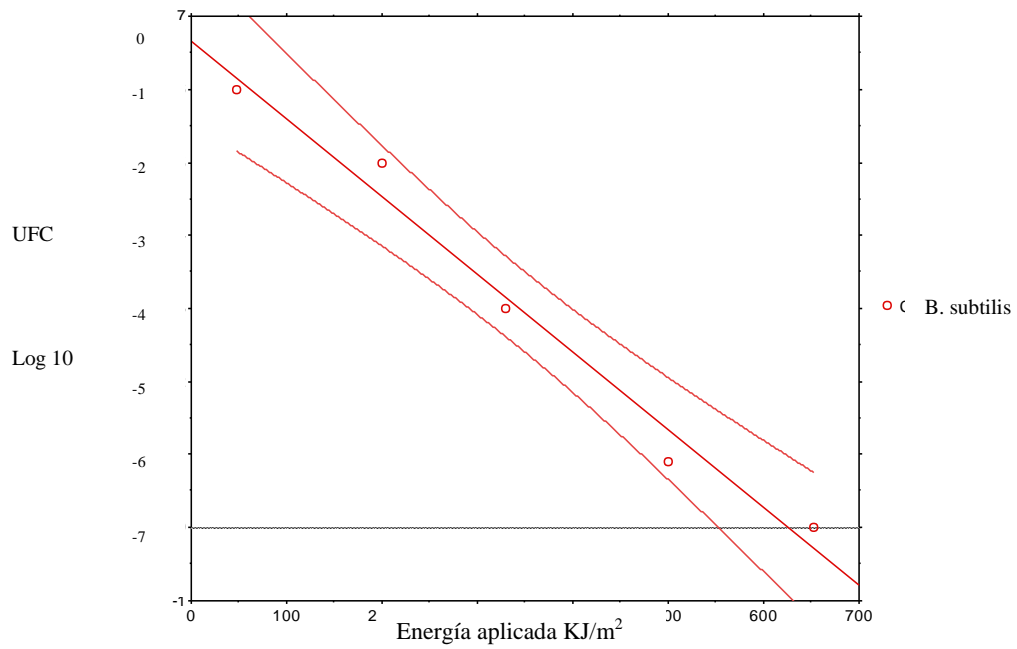
| <b>Esporas sin ser calentadas</b>     |                       |                    |
|---------------------------------------|-----------------------|--------------------|
| Células                               | Dilución              | % de Supervivencia |
| Esporas C <sup>-</sup>                | 50 x 10 <sup>-3</sup> | 1.2                |
| Esporas I.                            | 60 x 10 <sup>-1</sup> |                    |
| <b>Esporas calentadas por 40 min.</b> |                       |                    |
| Esporas C <sup>-</sup>                | 60 x 10 <sup>-2</sup> | -                  |
| Esporas I.                            | X                     |                    |
| <b>Esporas calentadas por 80 min.</b> |                       |                    |
| Esporas C <sup>-</sup>                | 60 x 10 <sup>-2</sup> | -                  |
| Esporas I.                            | X                     |                    |

La irradiación de las esporas se realizó exponiéndolas durante 3 min. a luz Uv (260 nm). En la tabla se muestran las esporas irradiadas (I) con su respectivo control sin irradiar (C<sup>-</sup>); las esporas que se habían calentado previamente a la irradiación, mostraron muerte total (X). El porcentaje de supervivencia solo se pudo calcular para el cultivo en el que no se calentaron las esporas.

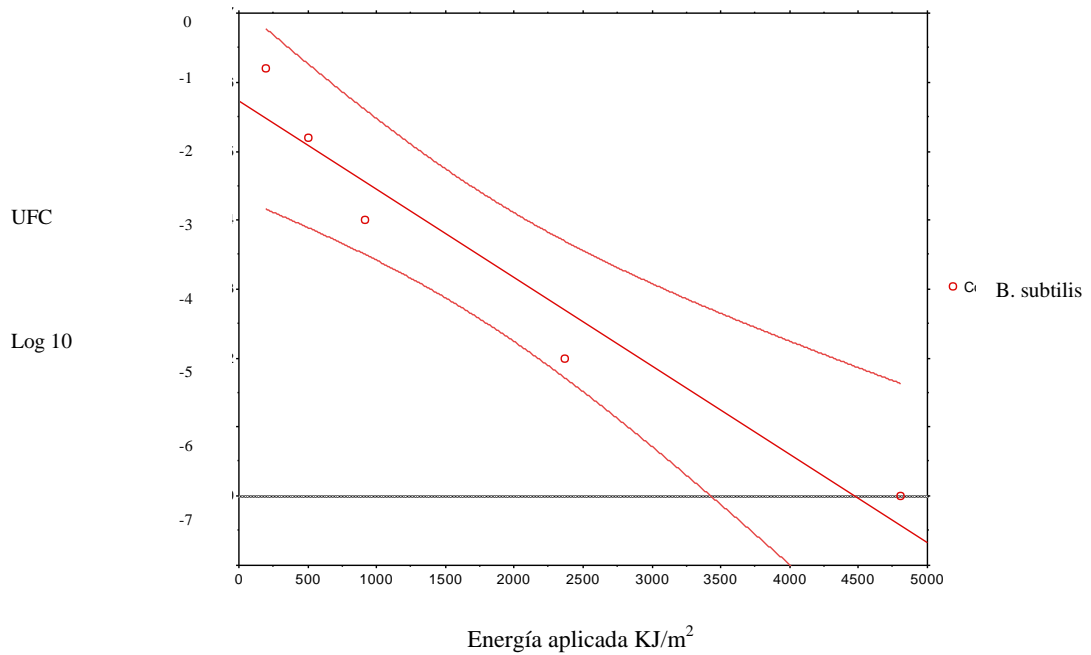
El experimento de irradiación se llevó a cabo en dos etapas, una etapa de luz, para el crecimiento y el lavado de las bacterias y una segunda etapa, donde las células después de ser irradiadas fueron diluidas, sembradas y recuperadas en placa por 17 hrs en total oscuridad hasta el momento del conteo de las UFC.

Los tiempos de exposición a luz Uv para las células vegetativas fueron de 2, 4, 6, 8 y 10 segundos, aplicando una energía de 0.04, 0.2, 0.3, 0.5 y 0.6 KJ/m<sup>2</sup>. Para las esporas el tiempo de exposición fue de 4, 8, 16, 34 y 68 segundos y la energía aplicada fue de 0.2, 0.5, 0.9, 2.3, 4.8 KJ/m<sup>2</sup>. Las diluciones para la cuenta viable de ambos casos fue de 10<sup>0</sup> a 10<sup>6</sup>.

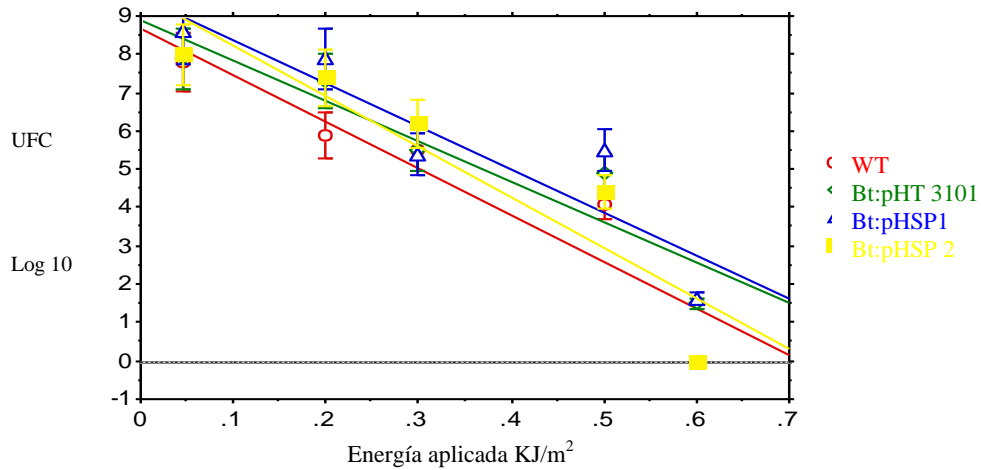
La técnica de irradiación ya estandarizada en *B. subtilis*, en células vegetativas (Graficas 1) y en esporas (Grafica 2) se aplicó a *B. thuringiensis* Wt, *B. thuringiensis*:pHT 3101, *B. thuringiensis*:pHSP 1(*spl B*) y *B. thuringiensis*:pHSP 2 (*rad A*) cada una con su control negativo (sin irradiar) y en ambos estadios, vegetativo (Grafica 3) y espora (Grafica 4). Todos los ensayos se realizaron por triplicado a los cuales se les aplicó un Análisis de Regresión Lineal Simple por serie de tratamientos.



Gráfica 1.-Análisis de Regresión Lineal Simple de las células vegetativas de *B. subtilis* tratadas con radiación UV.



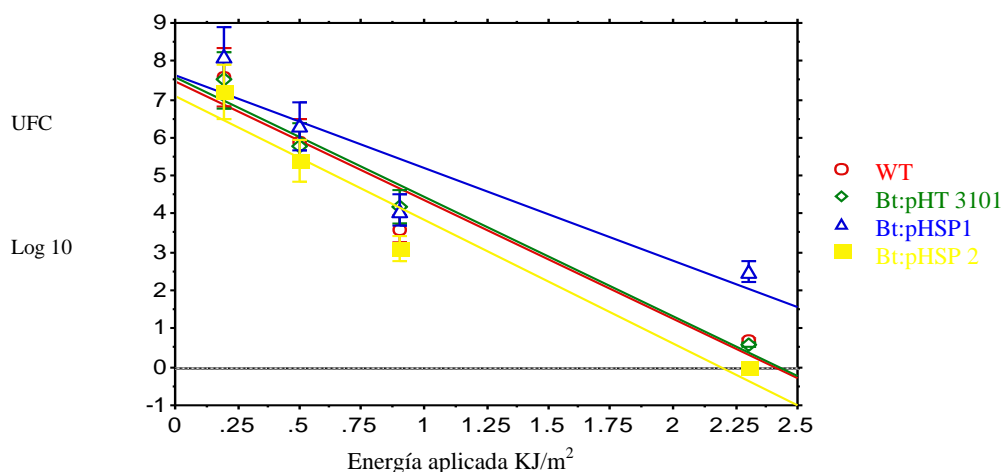
Gráfica 2.-Análisis de Regresión Lineal Simple de las Esporas de *B. subtilis* tratadas con radiación UV.



| Cepa     | Pendiente | Coefficiente de correlación |
|----------|-----------|-----------------------------|
| WT       | 12.16     | 0.865                       |
| pHT 3101 | 10.5      | 0.868                       |
| pHSP 1   | 11.21     | 0.832                       |
| pHSP 2   | 13.3      | 0.849                       |

Grafica 3. Se muestra el Análisis de Regresión Lineal Simple de las células vegetativas de *B. thuringiensis* después de ser irradiadas con luz UV a diferentes tiempos y diferente energía. Los Factores de Correlación observados son mayores a 0.80, y en la gráfica se indican las variaciones del 10% del valor promedio de los datos.

Las curvas de sobrevivencia de las cepas de *B. thuringiensis* silvestre y las tres transformantes, en estado vegetativo indican un decaimiento de la población similar entre ellas. Observando sensibilidad, manifestada como muerte celular desde bajas dosis de radiación con luz UV; como por ejemplo a 0.2 KJ/m<sup>2</sup> con un tiempo de exposición de 2 segundos. Observándose un daño severo en la población con una dosis de 0.6 KJ/m<sup>2</sup> con un tiempo de 10 segundos. También se observó que hay una correlación del efecto de radiación en la mortalidad muy cercano a un tipo lineal (ver tabla grafica 3).



| Cepa     | Pendiente | Coefficiente de correlación |
|----------|-----------|-----------------------------|
| WT       | 3.105     | 0.931                       |
| pHT 3101 | 3.126     | 0.973                       |
| pHSP 1   | 2.421     | 0.936                       |
| pHSP 2   | 3.231     | 0.838                       |

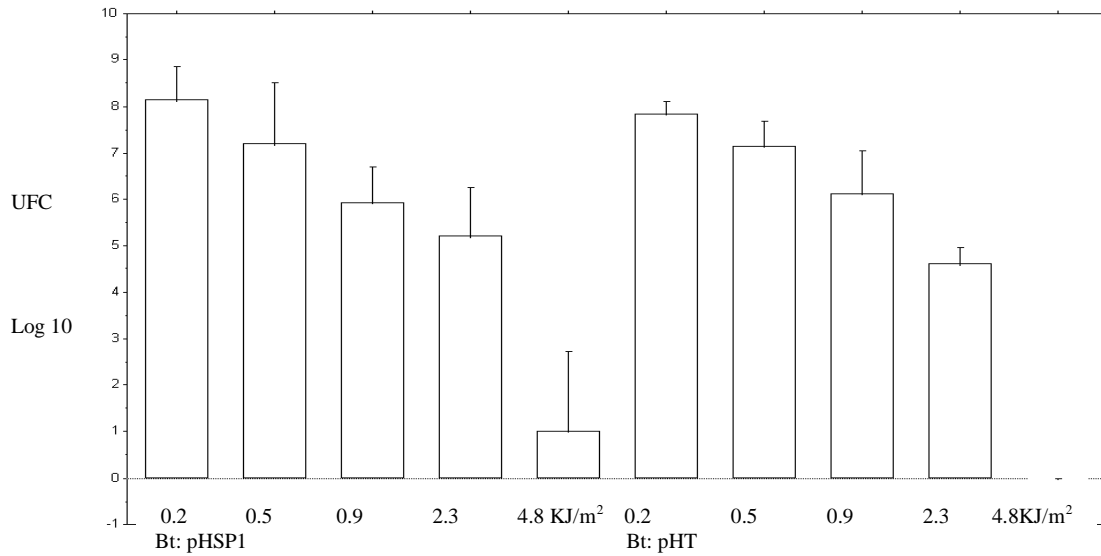
Grafica 4. Se muestra el Análisis de Regresión Lineal Simple de las células esporuladas de *B. thuringiensis* después de ser irradiadas con luz UVa diferentes tiempos y diferente energía. Los Factores de Correlación observados son mayores a 0.80, y en la gráfica se indican las variaciones del 10% del valor promedio de los datos.

Para los experimentos de irradiación de las esporas, se preparó un cultivo de 148 hrs. de incubación hasta obtener la máxima esporulación. La energía aplicada y el tiempo de exposición se incrementaron para determinar el efecto de la luz UV, dado que se sabe que la resistencia en las esporas es 10 veces mayor comparado con las células vegetativas. Se observó que la muerte de las células vegetativas ocurrió a los 10 segundos de exposición a la luz UV con una energía de 0.6 KJ/m<sup>2</sup>. La muerte en las esporas se encontró en periodos de exposición mas prolongados, de 34 seg., con una energía de 2.3 KJ/m<sup>2</sup>.

La cepa silvestre y la transformada con pHT 3101 que fueron usadas como control sin genes clonados, mostraron una mortalidad semejante. En el caso de la transformante pHSP 2 (*rad A*) se observó una mayor mortalidad; esta transformante posee un gen que no se expresa en la esporulación por lo que fue usado como un segundo control, mostrando adicionalmente un incremento en la sensibilidad a la luz UV, lo cual es inesperado. Para los tres casos citados existió mortalidad del 100% con una dosis de energía de 4.8 KJ/m<sup>2</sup>. En el caso de la transformada con pHSP 1 (*spl B*) la mortalidad fue un poco menor que los tres controles utilizados, donde 10<sup>3</sup> UFC/ml vs 10 UFC/ml, equivalen a dos ordenes de magnitud y la pendiente de la curva obtenida también es menor, observando mayor sobrevivencia a 2.3 KJ/m<sup>2</sup> (34 seg.) y muy baja sobrevivencia todavía a 4.8 KJ/m<sup>2</sup> (68 seg.) para el caso de la transformante pHSP 1 (*spl B*) (Grafica 4).

El análisis practicado en los experimentos de irradiación corresponde con los métodos convencionales de evaluación dosis-respuesta en forma cinética. Pero las diferencias observadas son relativamente pequeñas, por esta razón se hizo un análisis de tipo ANOVA (Grafica 5-Tabla 6). Con el análisis de los datos para *Bt*:pHT 3101 con *Bt*: pHSP 1 (*spl B*) tampoco se pudieron contrastar las diferencias en cada punto de

prueba (dosis) para las transformantes en los que hay incremento de la dosis génica. Sin embargo en este análisis pudimos observar que estadísticamente solo se pueden encontrar diferencias significativas cuando se aplican dosis equivalentes a incrementos de cuatro veces (Tabla 7). Esta condición no es la que se puede aplicar en un estadio cinético como el que se realizó en este trabajo, dándole valor discriminativo al análisis convencional usado para ver respuestas al tratamiento con luz UV, haciendo la comparación de pendientes de la curva dosis-respuesta.



Grafica 5.- Histograma donde se representa el daño que causa la radiación a las esporas de *Bt:pHT* 3101 y de *Bt:pHSP1* el cual es mas notorio al aplicar cuatro veces la dosis de energía.

**Tabla 6.- Análisis de Varianza para las transformantes *Bt:pHT* y *Bt:pHSP1***

| One Factor ANOVA-Repeated Measures for X <sub>1</sub> ... X <sub>10</sub> |     |                 |              |         |          |
|---|-----|-----------------|--------------|---------|----------|
| Source:   | df: | Sum of Squares: | Mean Square: | F-test: | P value: |
| Between subjects  | 2   | .243            | .121         | .015    | .9856    |
| Within subjects   | 27  | 225.019         | 8.334        |         |          |
| treatments  | 9   | 208.768         | 23.196       | 25.694  | .0001    |
| residual  | 18  | 16.251          | .903         |         |          |
| Total   | 29  | 225.262         |              |         |          |

Reliability Estimates for- All treatments: -67.69      Single Treatment: -.109

Note: 3 cases deleted with missing values.

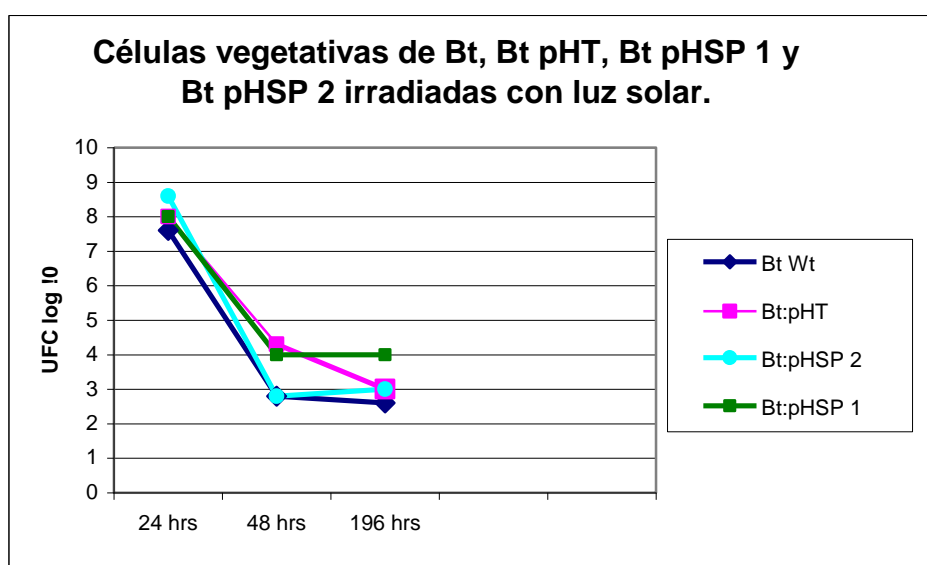
**Tabla 7.- Comparación de la sensibilidad de las cepas Bt:pHT y Bt:pHSP 1 a diferentes energías de luz Uv.**

| Comparación en base a tiempo (seg.) de irradiación. | Mean Diff | Fisher PLSD | Scheffe F-test | Dunnnett |
|---|-----------|-------------|----------------|----------|
| pHT 4 - pHT 16                                      | 2.2       | 1.345 *     | 0.894          | 2.836    |
| pHT 4 - pHT 34                                      | 2.93      | 1.345 *     | 1.588          | 3.781    |
| pHT 4 - pHT 68                                      | 7.133     | 1.345 *     | 9.394 *        | 9.195    |
| pHT 4 - pHSP1 16                                    | 2         | 1.345 *     | 0.738          | 2.578    |
| pHT 4 - pHSP1 34                                    | 3.533     | 1.345 *     | 2.305 *        | 4.554    |
| pHT 4 - pHSP1 68                                    | 8.133     | 1.345 *     | 12.212*        | 10.484   |
| pHT 68 - pHSP1 4                                    | -6.833    | 1.345 *     | 8.62 *         | 8.808    |
| pHT 68 - pHSP1 8                                    | -6.133    | 1.345 *     | 6.945 *        | 7.906    |
| pHT 68 - pHSP1 16                                   | -5.133    | 1.345 *     | 4.865 *        | 6.617    |
| pHT 68 - pHSP1 34                                   | -3.6      | 1.345 *     | 2.393 *        | 4.64     |

Se muestra el Análisis de Varianza que se aplico para la comparación de las cepas de *Bt*:pHT 31 01 vs *Bt*:pHSP 1 irradiadas con luz UV. Los valores mostrados \* tienen una significancia del 90%.

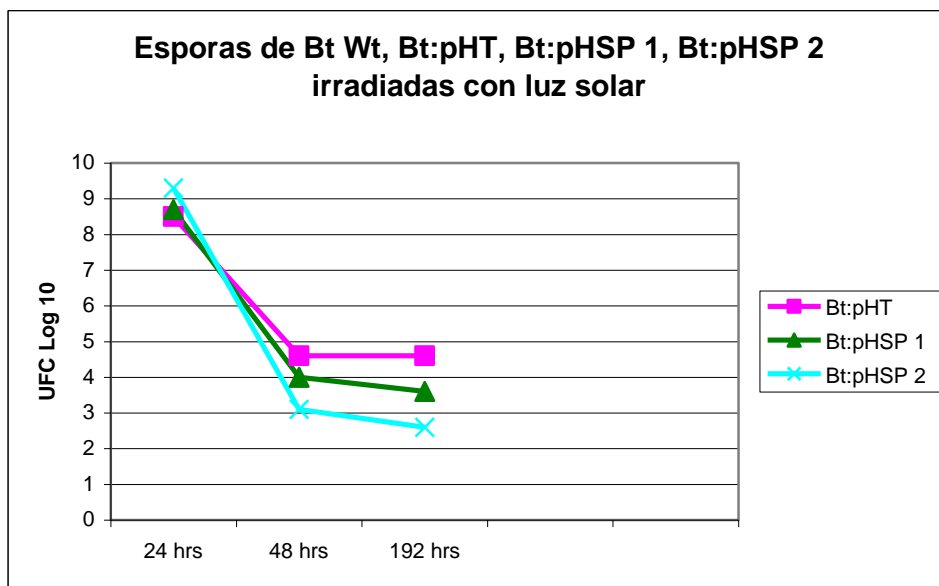
## EVALUACION DE LA SOBREVIVENCIA POR EXPOSICION A LUZ SOLAR.

Una vez realizados los experimentos de radiación en condiciones controladas de laboratorio, se pretendió hacer un ensayo piloto preliminar de radiación con luz solar, en ambos estadios celulares, vegetativo y espora, para todas las transformantes. Para las células vegetativas y esporas se prepararon los cultivos y resuspendidas en 100 ml de agua para su irradiación. Los datos de este ensayo de irradiación con luz solar directa se muestran en la Grafica 6 para las células vegetativas y en la Grafica 7 para las esporas. Se realizaron muestreos de las células para hacerles diluciones en forma decimal y sembradas por el método de gota, después de ser incubadas por 17 hrs. se realizó el conteo de UFC.



Grafica 6. Curva de mortalidad de las células vegetativas después de ser irradiadas con luz solar.

La sobrevivencia observada en las células vegetativas después de ser irradiadas con luz solar, fue disminuyendo sin llegar totalmente a cero, las transformantes pHSP 2 (*rad A*), presentaron una disminución marcada en la resistencia a la luz después de 24 hrs. de exposición, mostrando una disminución en su viabilidad de 4 órdenes de magnitud; igual que para la cepa silvestre. Las células transformadas con pHT 3101, parecían presentar una mayor resistencia a los efectos de la luz comparada con las dos transformantes anteriores. Pero en las células que se observaba un efecto de resistencia son las transformantes pHSP 1 (*spl B*), las cuales mostraron una resistencia de dos ordenes de magnitud a una energía de 2.3 KJ/m2 en el laboratorio. Después de 192 hrs. se encontraron células resistentes que además de enfrentarse a los daños causados por la luz solar resistieron a la desecación y a los organismos contaminantes, los cuales se observaron al hacer el conteo de UFC. A los experimentos de irradiación solar no se les aplicó el análisis de Regresión Lineal debido a que solo se trato de un ensayo preliminar.



Grafica 7. Curva de mortalidad de las células esporuladas después de ser irradiadas con luz solar.

## DISCUSION.

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria usada comúnmente en la elaboración de bioinsecticidas, para controlar plagas de insectos como mariposas o palomillas, escarabajos y dípteros transmisores de enfermedades. La aplicación de los bioinsecticidas que comúnmente se hace durante el día es una desventaja para la actividad de los productos de *Bt*, ya que la radiación solar produce una disminución de la actividad del preparado. Así mismo se ha observado una reducida actividad residual del producto, logrando con ello una baja permanencia en el ambiente, en promedio durante tres días (Sánchez-Yañes, J. M. *et al.*2000). Esta situación hace a los bioinsecticidas bastante amigables con el ambiente, dado su bajo poder residual.

Las aplicaciones del bioinsecticida deben realizarse por lo menos con una frecuencia alta para mantener bajo el número de los insectos plaga, lo cual ha producido en algunos casos aparición de la resistencia al insecticida en los insectos blanco. Consecuentemente se sabe que al incrementar la presión selectiva para reducir las plagas también se aplica una presión selectiva para mantener viables a los genotipos de insectos más resistentes. Por lo mismo debe pensarse en medios que reduzcan la presión selectiva para reducir el riesgo de pérdida del poder controlador de los bioinsecticidas. Una posibilidad es reducir el número de aplicaciones del preparado de *Bt*, y así mantener un equilibrio ecológico. Una forma, es hacer más prolongado el tiempo de permanencia de la actividad del bioinsecticida o procurar un reciclaje apropiado del microorganismo controlador de la plaga.

Nosotros hemos pensado que podríamos alargar el tiempo de permanencia de *Bt* en el ambiente, si logramos reducir el efecto nocivo que tienen los rayos ultravioleta del sol. Actualmente existen patentes de grandes firmas biotecnológicas, de productos conocidos como abrillantadores, que reducen el daño al cristal de *Bt*, esta tecnología es bastante eficiente y solo consiste en aplicar el producto formulado apropiadamente para prolongar la actividad bioinsecticida. Otra de las posibilidades es alargar el tiempo de viabilidad de la bacteria en el ambiente, dado que se aplican productos formulados con esporas y cristales de *Bt*, la razón es que algunos componentes de la spora potencian la actividad de las protoxinas del cristal; haciendo mas efectivo al preparado cuando la mezcla se hace con las formas vivas de la bacteria. En el caso de los productos “vivos” sería deseable que hubiera un apropiado reciclaje por nuevas infecciones a partir del organismo asperjado, esto sería posible si existiera un incremento en la viabilidad en el medio ambiente.

Es sabido que la radiación solar por medio de la luz de alta energía o ionizante, perjudica a la spora de los *bacilli* formando diversos aductos, que afectan la capacidad de sobrevivir en el ambiente. Una de las afectaciones más serías es la que se ejerce directamente a la información genética. Los daños masivos finalmente imposibilitan a la bacteria a salir de su estado de latencia, por hacer disfuncional al DNA. Sin embargo en la célula se reconocen varios mecanismos de reparación del DNA dañado por luz UV, estos se han descrito en la introducción de esta tesis, y los podemos enunciar ahora como son, el sistemas SOS (Friedberg, C. E. 1995), el sistema REC-FOR (Lewin, B. 2001), para el estado vegetativo y para la protección de las esporas, por medio de las proteínas SASP (Nicholson, W. L., Fajardo, C. 1997) y por medio del sistema dependiente de la nucleasa Sps B (Fajardo C. *et al.* 1993;Lewin, B. 2001).

Nosotros hemos propuesto que quizás mediante la manipulación de los sistemas de reparación del DNA se pudiera contribuir a prolongar la viabilidad de la bacteria al ser capaz de remediar efectivamente los aductos formados en las bases nitrogenadas del DNA por acción de la radiación ultravioleta proveniente del sol. Por medio de los datos

de otros trabajos sabemos que hay diferente nivel de resistencia a la luz ultravioleta en las células vegetativas y en las esporas, siendo mas sensibles las células vegetativas con respecto a las esporas (Setlow, P. 1988). Dado que los sistemas de reparación están habilitados para los dos estadios celulares y que el propósito de reciclaje de la bacteria no excluye a alguno de los estadios tampoco, podrían elegirse prácticamente todos los sistemas de reparación para tratar de hacer mas efectivo el reciclaje dependiente de la manipulación de los medios de reparación del DNA.

Nosotros sabemos también que la manipulación directa de *Bacillus thuringiensis* es difícil por varias circunstancias, una de ellas es la dificultad para transformar a *Bt*, de no ser en algunas cepas en las cuales funciona la electroporación con sólo algunos plásmidos. Tampoco se conoce la secuencia ni la estructura de los sistemas de reparación de *Bt*, aunque la mayoría de inferencias se realizan por extrapolación con el conocimiento que se ha recabado del funcionamiento de los genes de *Bacillus subtilis*. No descartamos que quizás dentro de poco se pueda hacer una mejor extrapolación cuando se haga accesible el genoma de un verdadero *Bt*, pues en la actualidad se han liberado genomas de los parientes cercanos de *Bt*, como *B. cereus*, *B. anthracis* y un atípico *B. thuringiensis* de la variedad *konkukian*, cuyos genomas fueron liberados en el transcurso de esta tesis y cuyas anotaciones mas apropiadas se han hecho hasta el inicio del 2006.

Con este panorama y basados en experiencias exitosas de otras investigaciones, nosotros propusimos la clonación de algunos genes de *B. subtilis* relacionados con la reparación del DNA dañado por radiación ultravioleta, se propuso clonar los genes en plásmidos de ida y vuelta o bifuncionales (shuttle) para realizar la inserción extracromosomal de los citados genes y evaluar su posible participación en la reparación del DNA de *Bt* después de irradiar a las células con rayos UV. Los genes inicialmente seleccionados fueron *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *radA* y *splB*. Para la obtención de las secuencias de los genes se propusieron oligonucleótidos que permitieran hacer su recuperación por medio de la reacción de PCR, considerando que las secuencias portaran la potencial secuencia reguladora del promotor, así se localizaron los oligonucleótidos del tipo delantero (forward) a una distancia de 300 bases río arriba y se considero una secuencia semejante para la región río abajo, por si tuvieran alguna importancia postranscripcional. Los productos de PCR se clonaron en el plásmido pBluescriptKS en el sitio EcoRV dado que se recuperaron productos con extremos romos. Los productos clonados se pasaron al vector bifuncional pHT3101 por medio de enzimas de restricción con lo cual lograría llevarlos hasta *B. thuringiensis*. La amplificación del DNA no represento ningún problema para el caso de las secuencias de los genes *radA*, *splB* y *uvrC*. Sin embargo, analizando el caso de los genes *uvr*, se llego a la conclusión de que la evaluación del sistema *uvr* sería más complicado porque *uvrA* y *uvrB* forman parte de un bicistrón en el que el orden es B-A, lo que supone que el gen *uvrB* controla la expresión de *uvrA* y esto hace complicado disgregar la expresión de ambos genes y por otro lado también resulta complejo hacer la fusión de los tres genes *uvrA*, *uvrB* y *uvrC*, para ver cual de las posibles combinaciones es la mas apropiada para su evaluación en experimentos de desafío con irradiación Uv. Por lo tanto se decidió no proseguir con la investigación del sistema *uvr* aunque se tienen plenamente probados los oligonucleótidos para la amplificación de los genes *uvrC* y *uvrA*.

Se pensó que sería más apropiado contar con un sistema sencillo que permitiera montar adecuadamente la evaluación del efecto de la radiación Uv y la transformación de *Bt* con al menos un gen relacionado con la reparación del DNA dañado por Uv. Considerando estas circunstancias nos enfocamos a la clonación de un gen que tuviera efecto claro en el estado de esporulación como *spl B* y otro que perteneciera al otro

estadio vegetativo como *rad A*. En ambos casos la amplificación del DNA fue adecuada y la subclonación también fue exitosa hasta pHT3101. La orientación de ambos genes respecto a la dirección de transcripción del promotor del gen de la  $\beta$ -galactosidasa fue opuesta, con lo cual nosotros estamos descartando un posible efecto indirecto del promotor existente en el vector de clonación.

Cómo una observación inicial nosotros no detectamos alguna diferencia en la capacidad de transformación en *Bt* de los plásmidos bifuncionales que contenían los insertos de los genes *rad A* y *spl B*, que nos pudiera indicar algún efecto nocivo de los productos al encontrarse en un número superior de copias respecto a su posible ortólogo nativo de *Bt*. Las células vegetativas fueron sincronizadas por medio de la inoculación de esporas en medio nuevo con lo cual el cultivo partió de células recientemente germinadas hasta la tercera generación (24 hr aprox.) asegurando la existencia de células vegetativas. En tanto, la evaluación de esporas se realizó cuando se hicieron cultivos en los que los nutrientes se agotaron y se obtuvo un 80% de esporas y las pocas células vegetativas existentes se eliminaron por medio de calor.

La evaluación del tratamiento por irradiación se realizó estandarizando los experimentos por medio del comportamiento de *B. subtilis* en estado vegetativo y en forma de esporas. La prueba se realizó manejado una ventana de prueba en la que se observa el decaimiento de la viabilidad celular por irradiación Uv en un margen de caída de 6 órdenes de magnitud, correspondiente a 0.6 KJ/m<sup>2</sup> de energía para las células vegetativas y a 4.8 KJ/m<sup>2</sup> de energía para las células esporuladas. Nosotros aplicamos el mismo tratamiento a las diferentes formas de *Bt* y se pudo correlacionar la diferencia de comportamiento de esporas y células vegetativas, pero se observó una marcada diferencia en la susceptibilidad de las esporas después del tratamiento térmico para eliminar totalmente a las células vegetativas de las esporas. Como conclusión podemos decir que el comportamiento de las células de *Bt* corresponde a lo observado en las de *B. subtilis*, mostrando una sensibilidad a 0.6 KJ/m<sup>2</sup> energía para células vegetativas y 4.8 KJ/m<sup>2</sup> de energía para esporas con una ventana de estudio para determinar la caída de la viabilidad en 6 órdenes de magnitud.

La evaluación de la supervivencia de *Bt* silvestre y las transformantes no indicó una marcada diferencia al apreciar las pendientes de las curvas de decaimiento de la viabilidad. En las células vegetativas no se observa una mejor recuperación en ninguno de los casos de las células transformantes respecto a la cepa silvestre, lo que nos sugiere una nula participación de los genes estudiados en el estado vegetativo, bajo las condiciones de prueba. Cuando se hizo la evaluación de la supervivencia en las esporas, prácticamente no se observa efecto de ninguno de los genes introducidos, excepto en el caso de la irradiación con 2.3 KJ/m<sup>2</sup> donde se observa un retraso en la disminución de la supervivencia de la transformante con *spl B*. Se sabe que *spl B*, pertenece a un gen biscistronico *splAB*, donde la transcripción es dirigida por un promotor "fuerte" en *spl A* y en ausencia de este, la transcripción es dirigida por un segundo promotor que se encuentra en *spl B* (Fajardo, C. P. and Nicholson W. 1999). Este gen constituye por sí solo un sistema de Fotoreparación, el cual corrige específicamente los fotoproductos de la espora (SP), en las primeras etapas de la germinación de la espora, la expresión de la proteína es insensible a antibióticos que inhiban la síntesis de la proteína o la transcripción; lo que indica que la proteína es sintetizada en las primeras etapas de esporulación y empaquetada dentro de la espora (Munakata, N. 1974). Parece que bajo una dosis de irradiación de 2.3 KJ/m<sup>2</sup>, se puede apreciar una diferencia celular en la supervivencia de 2 ordenes de magnitud en las transformantes con *spl B*. Lo cual nos permite inferir que aunque la muerte ocurre de forma muy marcada, esa pequeña diferencia puede hacer un mejor desempeño de las transformantes para permanecer en el

ambiente a diferencia de la silvestre e incluso de la transformante con el gen *rad A* en la que se marco más la sensibilidad a la radiación UV.

En base a los métodos convencionales de análisis usados para evaluar la respuesta de tratamientos en modelos dosis-respuesta se observan variaciones en la pendiente de las gráficas pero parecen ser poco marcadas porque estamos analizando la sobreexpresión mediada por el incremento de la dosis génica, Esto supone un nivel basal de respuesta en el que se podrá valorar la diferencia de la cantidad de la proteína introducida. Para nuestro caso no hay una diferencia grande; por lo que se aplicó un segundo método de análisis estadístico, el de ANOVA. En el que por cada punto de la gráfica se hizo la comparación de valores medios, sin que se pudiera mejorar el análisis para discriminar las diferencias. Solo pudimos concluir que en un mismo tipo celular las diferencias significativas se aprecian cuando la dosis de radiación se incrementa hasta cuatro veces. Sin embargo en ese sentido el análisis de regresión parece ser más sensible, porque pone de manifiesto las tendencias de los datos. Dándole menor poder discriminatorio al ANOVA en nuestros experimentos.

Puesto que nuestra investigación debería ser llevada al terreno práctico se intento tener un primer acercamiento a un ambiente más propio a *Bt* y a su modo de aplicación para apreciar si se repite lo ya determinado en condiciones de laboratorio. Para desafiar a las células obtenidas en este trabajo realizamos un ensayo de exposición de las cepas de *Bt* a la luz solar. Los resultados muestran que las células vegetativas transformadas con *rad A* son bastante más sensibles a la radiación después de 24 hrs. dando una reducción de 4 órdenes de magnitud. En las células vegetativas no se pudo apreciar una mejora de sobrevivencia a las 48 hrs. en ninguna de las transformantes, aunque fue característico un menor decremento de las células que portaban pHT3101 y el gen *spl B*. Esto parece estar coincidiendo con algunos autores que reportan un comportamiento diferente en cepas de bacterias que poseen plásmidos, solamente por tener mayor carga de DNA. Otra observación interesante es haber encontrado formas resistentes a la desecación y a la irradiación solar a las 196 hrs. en todos los casos, pues no teníamos reportes de esporulación de *Bt* en el ambiente después de su aplicación, pues en todos los trabajos de ensayo y prueba de bioinsecticidas la forma de vida que se aplica es la de espora.

De forma interesante también se observó un mejor comportamiento de *Bt* transformado con el gen *spl B* a las 196 hrs; ya que se observo una diferencia de sobrevivencia de casi dos órdenes de magnitud, como se había observado en los experimentos de irradiación en el laboratorio con 2.3 KJ/m<sup>2</sup> de energía. Esto nos puede sugerir que las células que han estado en contacto con radiación solar se ha ejercido un efecto de inducción de la expresión de *spl B* proveniente de *B. subtilis*, sugiriendo la posible expresión heteróloga de manera natural y haciendo del gen *spl B* un posible candidato para proseguir en su exploración para el desarrollo tecnológico en los bioinsecticidas comerciales de esta bacteria. Nosotros no pudimos apreciar alguna mejora en la supervivencia en el caso de las esporas porque estas fueron expuestas al sol después de haberse preparado en el laboratorio y suponemos que no hubo ningún sistema de inducción apropiado de los genes introducidos.

Aunque no podemos descartar alteraciones propias del medio ambiente por factores bióticos, pues en los cultivos esporulados se obtuvo un contaminante bastante homogéneo a las 48 horas el cual pudo encubrir alguna diferencia en las transformantes. Este contaminante parece haberse establecido por la exposición ambiental del complejo espora cristal, el cual pudo servir de alimento a la bacteria contaminante ya que la solubilización del cristal crea un medio de cultivo muy peculiar para la flora del medio ambiente. Consideramos que los estudios ambientales de las transformantes obtenidas

es importante para determinar el potencial real de los genes analizados en este trabajo. Si bien pensamos que los genes utilizados en este trabajo, solo nos mejoran en dos órdenes de magnitud la sobrevivencia de *Bt* en el laboratorio evaluando el sistema de reparación en oscuridad y que eso también se refleja en el ensayo con células vegetativas que esporularon y que eso no es el 100% de sobrevivientes, para asegurar una supervivencia en extremo anormal, si nos da la oportunidad de crear un desbalance mínimo en la permanencia de *Bt* en el ambiente, con lo cual se puede asegurar el estatus de bioinsecticida con carácter biodegradable con un posible mayor poder de permanencia en el ambiente para poder reinfectar a la plaga blanco en ambiente acuático. Por lo mismo no podemos opinar igual si se tratara de un bioinsecticida de aplicación foliar, en el cual habría que hacer una evaluación particular para determinar los alcances de la propuesta que hemos probado en el presente trabajo.

## CONCLUSIONES

- No se observa ningún efecto adverso para el desarrollo de *B. thuringiensis* por la transformación con los genes *splB* y *radA* clonados en el plásmido pHT3101.
- La estandarización de la metodología para evaluar la sensibilidad-resistencia hacia la radiación ultravioleta en *B. subtilis* es adecuada para extrapolar la prueba a *B. thuringiensis*.
- El comportamiento de ambos bacilli es muy semejante, mostrando una caída similar en la curva de sobrevivencia celular después de la irradiación con una energía de 0.6 KJ/m<sup>2</sup> para las células vegetativas y con 4.8 KJ/m<sup>2</sup> para las esporas.
- Las transformantes (con *splb* o *radA*) en estado vegetativo, no muestran un incremento en su resistencia a luz Uv, por lo que se sugiere una muy baja expresión de los genes seleccionados.
- Las transformantes con *spl B*, después de haber sido irradiadas con una energía de 2.3 KJ/m<sup>2</sup> mostraron una supervivencia mayor de 2 ordenes de magnitud.
- Las transformantes con *rad A*, mostraron una sensibilidad muy marcada a la radiación UV.
- Las células que portan el plásmido pHT3101 y las otras que además portan el gen *spl B*, muestran una ligera supervivencia a la radiación solar, corroborando observaciones de otros autores que sugieren que la presencia de material extracromosomal, tiene un efecto protector en los bacilli.
- Se confirma la capacidad esporuladora de células vegetativas *B. thuringiensis*, después de haber expuesto a las células dispersadas en agua, por 196 hrs. a la irradiación solar, así como a la desecación.
- Se observó un comportamiento de resistencia muy similar en las transformantes con el gen *spl B* irradiadas en el laboratorio y en los ensayos de irradiación solar, mostrando un índice de resistencia a UV de aproximadamente dos ordenes de magnitud, con una energía de 2.3 KJ/m<sup>2</sup>.

## PERSPECTIVAS

- Verificar la transcripción de los genes mediante Northern blot.
- Una vez probadas las transformantes con luz Uv *in vitro*, se propone realizar la evaluación de irradiación *in vivo* tanto en células vegetativas como en esporas de ambos *bacillus* en un sistema no acuático.
- Debe evaluarse si el gen *spl B* mejora el comportamiento de resistencia en *B. thuringiensis* al hacer la adecuación de la construcción transformante, como el cambio de sentido respecto a las secuencias del vector.

## BIBLIOGRAFIA CITADA.

Adams, L. F., J. E. Visick and H. R. Whiteley. 1988. A 20-kilodalton protein is required for efficient production of the *Bacillus thuringiensis* Subs. israelensis 27 kilodalton crystal protein in *E. Coli*. J. Bacteriology. Pp. 521-530. Vol 171.

Agaisse, H. and D. Lereclus. 1994. Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis cryIIIA* toxin gene is not dependent on a sporulation specific sigma factor and is increased in a spo0A mutant. J. Bacteriology. Pp. 4734-4741. Vol 176.

Agaisse, H. and D. Lereclus. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? J. Bacteriology. Pp. 6027-6032. Vol.177.

Alting-Mees, M.A. & Short, J.M. 1989 pBluescript II: gene mapping vectors. Nucl. Acids Res. Pp. 9494. Vol 17.

Aronson, A. I., E. S. Han, W. Mc Gaughey and D. Johnson. 1991. The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. In Applied and Environmental Microbiology. Pp. 981-986. Vol. 57.

Badii, M. H., A. E. Flores, R. Foreughbakhch, H. Quiroz y Torres R. 1996. Ecología de manejo integrado de plagas (MIP) con observaciones sobre control biológico de insectos. En: Avances recientes en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. Pp 40-47.

Baum, J. A., T. B. Johnson, and Bruce C. C. 1999. *Bacillus thuringiensis*: Natural and recombinant bioinsecticide products. In: Biopesticides: use and Delivery, Ed. F. R. Hall and J. J. Menn. Humana Press. Totowa, N J. Pp. 189-209.

Beam, C. E., C. J. Saveson and S. T.- Lovett. 2002. Role for *radA/sms* in Recombination intermediate Processing in *Escherichia coli*. Department of Biology and Rosenstiel Basic Medical Sciences Research Center, Brandeis University, Waltham Massachusetts.

Beegle, C. C. And T. Yamamoto. 1992. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner Research and Development, Can. Entomol. Pp. 587-616. Vol.124.

Bernhard K & Utz, R. 1993. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental and commercial uses. In: Entwistle, P. F., J.S. Cory, M. J. Bailey and S. Higgs. *Bacillus thuringiensis* and Environmental Biopesticide: Theory and Practice. Wiley & Sons, Pp.255-267.

Bone, E. J. & D. J. Ellar, 1989. Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation In: FEMS Microbiology Letters. Pp. 171-178 Vol. 58.

Burton, S. L., D. J. Ellar & J. Derbyshire 1999. N-acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase is recognized by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. In: J. Mol. Biol. Pp. 1011-1022. Vol. 287.

- Butko, P. 2003 Cytolytic Toxin cyt1A and its Mechanism of membrane damage; data and hypotheses. In: Appl. Environ. Microbiol. Pp.2415-2422. Vol. 69.
- Cano, R. J. and Borucki, M. K. 1995. Revival and identification of bacterial spores in 25-to 40 million-year-old Dominican Amber. Science. Pp. 1060-1064. Vol.268.
- Casal, I., J. L. García, J. M. Guisan, J. M. Martínez-Zapater, F. Rojo. 2004. Biotecnología y Medio Ambiente. Editado por: Sociedad Española de Biotecnología. Pp. 14.
- Carlson, C.R., D.A. Caugant, and A. B. Kolsto. 1994. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. Appl. Environ. Microbiol. Pp. 1719-1725. Vol. 60.
- Carrol, J., M. G. Wolfersberger & E. J. Ellar 1997. The *Bacillus thuringiensis* Cry 1Ac toxin-induced permeability change in *Manduca sexta* midgut brush border membrane vesicles proceeds by more than one mechanism. In: J. Cell Sci. Pp. 3099-3104. Vol. 110.
- Chang, G. L., P. W. Soetsch, and W. A. Haseltine. 1985. Cyclobutane pyrimidine dimers and (6-4) photoproducts block polymerization by DNA polymerase I. In: Biochemistry. Pp. 5723-5728. Vol. 24.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Vn Rie, D. Lereclus, J. Baum, and D.H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. In: Microbiology and Molecular Biology Reviews. Pp. 807-813. Vol. 62.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Vn Rie, D. Lereclus, J. Baum, and D.H. Dean. 2006. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. In: Microbiology and Molecular Biology Reviews. Pp. 807-813. Vol. 62.
- De Maagd, R. A., A. Bravo and N. Crickmore 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. In: Trends in Genetics. Pp. 193-199. Vol. 17.
- Dulmage, H. T., J. A. Correa and G. Gallegos-Morales. 1990. Potential for improved formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis* through standardization and fermentation development. In: Bacterial control of mosquitoes & black flies. Edit. Rutgers University
- Espinasse, S., M. Gohar, J. Chaufaux, C. Buisson, S. Perchat & V. Sanchis. 2002 b. Correspondence of high levels of  $\beta$ -exotoxin I and the presence of *cry 1B* in *Bacillus thuringiensis* Strain 407-1. In: Appl. Environ. Microbiol. Pp. 4182-4186. Vol 68.
- Espinasse, S., M. Gohar, D. Lereclus & V. Sanchis. 2004. An extracytoplasmic-function Sigma factor is involved in a pathway controlling  $\beta$ -exotoxin I production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* Strain 407-1. In: J. Bacteriology. Pp.3108-3116. Vol. 186.

- Fajardo-Cavazo, P., C. Salazar and W. I. Nicholson. 1993. Molecular cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* spore photoproduct lyase (spl) gene, which is involved in repair of UV radiation-induced DNA damage during spore germination. In: J. Bacteriology. Pp. 1735-1744. Vol. 175.
- Fajardo-Cavazo, P., and W. I. Nicholson. 1999. The TRAP-Like SplA protein is a *trans*-acting negative regulator of spore photoproduct lyase síntesis during *Bacillus subtilis* sporulation. In: J. Bacteriology. Pp.555-560. Vol. 182.
- Fernández Orienta-Larrea Vega. 2002. Tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis*. Avances en el fomento de productos fitosanitarios No- Sintéticos, En: Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica). Pp. 110-115. No. 64.
- Foster, P. L. 1992. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, mutagenesis. In: J. Lederberg (ed), Encyclopedia of Microbiology, Academic Press, Inc., New York. Pp. 107-114.
- Friedberg, E. C., G.C. Wa and W. Siede. 1995. DNA repair and mutagenesis, ASM Press. Washington. D. C.
- Gaertner, F. H., T. C. Quick and M. A. Thomson. 1993. Cell Cap: an encapsulation system for insecticidal biotoxin proteins, Kim, L. (Editor) In. Advanced Engineered Pesticides. Marcel Dekker, New York. Pp. 73-83.
- Galán L. J., J. A. Garcías, S. M. Ellis, A. I. Quintero and H. A. Luna. 1996. Production of *Bacillus thuringiensis*. In: Avances en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de Nuevo león, Monterrey, México. Pp 139-152.
- Gibco, BRL. 1992. Catalogue & Referente guide.
- Gill, S. S., E. A. Cowles, and P. V. Pietratoni 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annu. Rev. Entomol. Pp.615-636. Vol 37.
- Grant, S.G.N., Jessee, J., Bloom, F.R., and Hanahan, D. 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Pp. 4645-4649. Vol.87
- Green, B. D., L. Battisti and C. B. Thorne. 1989. Involvement of Tn4430 in transfer of *Bacillus anthracis* plasmids mediated by *Bacillus thuringiensis* plasmid pXO12. In: J. Bacteriology. Pp. 104-113. Vol. 171.
- Gomez, I., D. I. Oltean, S. S. Gill, A. Bravo and M. Soberón 2001. Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry 1A toxin interaction using phage display. In: J. Biol. Chem. Pp. 28906-28912. Vol. 276 (31).
- Guzmán, P., J. Westpheling, P. Youngman. 1988. Characterization of the promoter region of the *Bacillus subtilis* spoII E operon. In: J. Bacteriology. Pp. 1598-1609. Vol. 170.

- Höfte, H. and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. In: Microbio. Rev. Pp. 242-255. Vol. 53.
- Howard-Flanders, P. 1981. Inducible repair of DNA, In: Sci. AM. Pp.56-64. Vol. 245.
- Ibarra J. E. 2000. Bacterias Entomopatogenas En: XI Curso Nacional de Control Biológico. Cap 8 CINVESTAV-IPN Irapuato. Pp.93-105.
- Knowles, B. H. & D. J. Ellar. 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin with different insect specificity. In: biochem, Biophys. Acta. Pp. 509-518. Vol 924.
- Kronstad, J. W. And H. R. Whiteley, 1984. Inverted repeat sequences flank a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. In: J. Bacteriology. Pp. 95-102. Vol.160.
- Lang, S. And W. Champress 1997. Molecular Genetics of Bacteria. SM Press. Pp.237-261.
- Lee, M. K, F. S. Walters, H. Hart, N. Palekar, & J-S Chen 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis*. Vegetative insecticidal Protein Vip 3A differs from that of Cry 1Ab  $\delta$ -endotoxin. In: Appl. Environ. Microbiol. Pp. 593-599 Vol. 69.
- Lereclus, D., M. Vallade, J. Chaufaux, O. Arantes and S. Rambaud. 1992. Expansión of the insecticidal host range of *Bacillus thuringiensis*, by *in vivo* genetic recombination. In: Bio/Technology. Pp. 418-421. Vol. 10.
- Lereclus, D., O. Arantés, J. Chaufaux and M. M. Lecadet. 1989. Transformation and expression of cloned  $\delta$ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. In: FEMS Microbiology Letters. Pp. 211-218 Vol. 60.
- Lewin, B. 2001 Genes VII . Marbán Libros, S. L.
- Lightwood, D. J., D. J. Ellar and P. Jarret. 2000. Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry 1Ac  $\delta$ -endotoxin. In: Appl. Environ. Microbiol. Pp. 5174-5181. Vol.66.
- Macias, L. M. 1995. *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*, una alternativa para el control biológico de mosquitos. Tesis de Licenciatura. Laboratorio de Ecología microbiana del IIQB. Facultad de Biología / UMSNH. Ciudad universitaria Morelia, Mich. Pp.13-16.
- Meadows, M. P. 1993. *Bacillus thuringiensis* in the environment: Ecology and Risk Assessment. In: Entwistle, P. F., J.S. Cory, M. J. Bailey and S. Higgs (ed). *Bacillus thuringiensis* and Environmental Biopesticide: Theory and Practice. H. Wiley and Sons, Ltd. London. Pp. 193-220.
- Menn , J. J. and F. R. Hall. 1999. Biopesticides: Present status and future prospects. In: Biopesticides: Use an Deliver. Ed. F. R. Hall an J.J. Menn. Humana Press.. Totowa, NJ. Pp. 301-320.

- Moran, C. P. 1993. RNAPolymerase and transcription factors. In: A. L. Sonenshein, J. A. Hoch and R. Losick (ed). *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. American Society for Microbiology, Whashington, D. C. Pp. 653-667.
- Munakata, N. And C. S. Rupert 1972. Genetically controlled removal of “spore photoproducts” from deoxyribonucleic acid of ultraviolet-irradiated *Bacillus subtilis* spores. In: J. Bacteriol. Pp.192-198. Vol. 111.
- Myasnik, M., R. Manasherob, E. Ben-Dov, a. Zaritski, Y. Margalith, Z. Barak. 2001. Comparative sensitivity to Uv-B radiation of two *Bacillus thuringiensis* subspecies an other *Bacillus* sp. In: Current Microbiology. Pp. 140-146. Vol. 43.
- Nelson, D. L. and M. M. Cox. 2000. Lehninger Principles of Biochemistry 3a. Edición, Worth publishers.
- Nicholson, W. L., P. Fajardo-Cavazo. 1997. DNA repair and The ultraviolet radiation resistance of bacterial spores: from the laboratory to the environment, Recent Res. Dev. Microbiol. Pp. 125-140. Vol 1.
- Nicholson, W. L., N. Munakata, G. Horneck, H. J. Melosh and P. Setlow. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments, In: Microbiology and Molecular Biology Reviews. Pp. 548-572. Vol. 64.
- Pueppke, S. G. 1999. Biotechnology and the land grant institution: Future roles and responsabilites. Proceedings. In: Illinois Urbana-Champaign, Il. USA. Pp. 1-2.
- Rajamohant, F., J. A. Cotrill, F. Gould & D. H. Dean. 1996. Rolle of Domain II, loop 2 residues of *Bacillus thuringiensis* Cry 1Ab  $\delta$ -endotoxina in reversible an irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. In. J. Biol. Chem. Pp. 2390-2396. Vol. 271.
- Risenman, P. J., M. L. Nicholson. 2000. Role of the coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hidrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B and solar UV radiation. Appl. Environ. Microbio. Pp.620-626. Vol. 66.
- Rojas, R. N. E. 2003. Estudio de la variación poblacional de *Bacillus thuringiensis* bajo condiciones ambientales controladas. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones en C. Microbiológicas ICUAP.
- Rong C., V. Vachon, R. A. Maagd, M. Villalon, J-L. Schwartz, D. Bosch, R. Frutos and R. Laprade. 1999. Interaction between functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. In: appl. Environ. Microbiol. Pp.2918-2925. Vol. 65.
- Salles, B. and C. Paolletti. 1983. Control of UV induction of Rec A protein. In: Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Pp. 60-65. Vol. 80.
- Sancar, G. B., F.W.Smith and A. Sancar. 1985. Binding of *E. Coli* DNA photolyase to UV-irradiated DNA Biochemistry. Pp. 1849-1855. Vol. 24.

- Sánchez-Yañez, J. M. Peña-Cabriales, J. J. 2000. Persistencia de esporas de *Bacillus thuringiensis* en hojas de maíz y fríjol y en el suelo. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Pp. 325-331.
- Setlow, P. 1988. Small acido-soluble, spore proteins of *Bacillus* species: structure, synthesis, genetics, function and degradation. In: Annu, Rev. Microbiol. Pp. 319-338. Vol. 42.
- Setlow, P. 1992. I will survive:protecting and repairing spore DNA. In: J. Bacteriology Pp. 2737-2741. Vol. 174.
- Setlow, P. 1999. Bacterial spore resitance. In: G. Storz and R. Hengge-Aronis (ed), Bacterial stress responses. American Society for Microbiology, Washington, D. C. Pp. 217-233.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson. D. R. Zeigler, and D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. In: Microbiology and Molecular Biology Reviews. Pp. 775-806. Vol. 62. No.3.
- Slepecky, R.A. and E. R. Leadbetter. 1994. Ecology and relationships of endospore-forming bacteria:changing perspectives. In P. J. Piggot, C. P. Moran, Jr. And P. Youngman (ed.) Regulation of bacterial differentiation, ASM, Washington, D. C. Pp. 195-206.
- Stewart, G. S. A. B., M. W. Eaton, K. Johnstone, M. D. Barrat and D. J. Ellar. 1980. An investigation of membrane fluidity changes durin sporulation and germination of *Bacillus megaterium* K. M. Measured by electron spin and nuclear magnetic resonance spectroscopy. In: Biochim, Biophys. pp. 270-290- Vol. 600.
- Taylor, J. S. And C. L. O'Day. 1990. Cis-Syn thymine dimmer are not absolute blocks to replication by DNA polymerase I of *Escherichia coli* in vitro. Biochemistry Pp. 1624-2632. Vol. 29
- Tigue, N. J., J. Jacoby & D. J. Ellar 2001. The  $\alpha$ -helix 4 residue, Asn 135, is envolved in the oligomerization of Cry 1Ac and Cry 1Ab *Bacillus thuringiensis* toxins. In: Appl Environ, Microbiol. Pp. 5715-5720. Vol. 67 (12).
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W:improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. In: Nucleic Acids Res. Pp. 4673-4680. Vol. 22.
- Torres, A. A., Y. Reyes, V. E. López y López y M. de la Torre. 2002 Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. Avance y Perspectiva. Pp. 291-295. Vol. 21. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Cinvestav.
- Varghese, A. J. 1970. 5 Thyminyl 5-6 dihidrothymine from DNA irradiated with ultraviolet light. In: Biochem, Biophys. Res. Commun. Pp. 484-490. Vol. 38.

Wong, H. C., H. E. Schnepf and H. R. Whiteley, 1983. Transcriptional and translational start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. In: J. Biol. Chem. Pp. 1960-1967 Vol. 258.

Youngman, P. J. B. Perkins and R. Losick 1984. A novel method for the rapid cloning in *E. Coli* of *B. Subtilis* chromosomal DNA adjacent to Tn 917 insertions Mol. Gen. Genet. Pp.424-433. Vol.195.

Woodcock, D. M., P. J. Crowther, J. Doherty, S. Efferson, E. DeCruz, M. Noyer-Weidner, S. S. Smith, M. Z. Michael, and M. W. Graham. 1989. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. Nucleic Acids Res. Pp.3469-3478. Vol. 17

Xue, Y. and Nicholson, W. L. 1996 The two major spore DNA repair pathways, Nucleotide Excision Repair and Spore Photoproducts Lyase, are sufficient for the resistance of *Bacillus subtilis* spores to artificial Uv-C and Uv-B but not to solar radiation. In: Applied and Environmental Microbiology. Pp.2221-2227. Vol. 62.

Zhuang M., D. I. Oltean, I. Gómez, A. K. Pullikuth, M. Soberón, A. Bravo and S. S. Gill. 2002 *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry 1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. In: J. Biol. Chem. Pp. 13863-13872. Vol. 277.