

TESIS DE MÁSTER

Microencapsulación de proteínas
insecticidas Vip3 de *Bacillus*
thuringiensis.

Francisco Javier Mañeru Oria

Curso 2013-14

Director: Dr. Iñigo Ruiz de Escudero
Codirector: Dr. Leopoldo Palma

El Dr. IÑIGO RUIZ DE ESCUDERO, Contratado Doctor del Área de Producción Vegetal del Departamento de Producción Agraria, como director de D. Francisco Javier Mañeru Oria,

INFORMA

Que la presente memoria de Trabajo Fin de Master “*Microencapsulación de proteínas insecticidas Vip3 de Bacillus thuringiensis*” elaborada por D. Francisco Javier Mañeru Oria, cumple las condiciones exigidas por la legislación vigente para ser presentada y defendida.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente documento en Pamplona a diecinueve de junio de 2014.



Dr. IÑIGO RUIZ DE ESCUDERO

ÍNDICE

1. ABSTRACT	4
2. RESUMEN	5
3. INTRODUCCIÓN	6
4. OBJETIVOS	11
5. MATERIAL Y MÉTODOS	12
5.1.- Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	12
5.2.- Amplificación y clonación del gen <i>vip3Ag4</i> en los vectores de expresión.....	12
5.3.- Expresión de la proteína Vip3Ag4 en <i>Bacillus megaterium</i>	15
5.4.- Fijación con lugol 1 %, recuento y análisis de viabilidad	16
5.5.- Clonaje y transformación del gen <i>vip3Ag4</i> en <i>Pseudomonas fluorescens</i>	16
5.6.- Cuantificación de proteína encapsulada y purificada	17
5.7.- Evaluación de la toxicidad de la proteína Vip3Ag4	17
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
6.1.- Amplificación y clonaje del gen <i>vip3Ag4</i> en pMEKm12	19
6.2.- Expresión y purificación de la proteína Vip3Ag4 en <i>B. megaterium</i>	21
6.3.- Cuantificación de la proteína Vip3Ag4.....	23
6.4.- Evaluación de la actividad insecticida	23
7. CONCLUSIONES	28
8. BIBLIOGRAFÍA	29

1. ABSTRACT

The entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt) is the leader of the biological insecticides due to it produces proteins with insecticidal properties against different pests. Among these proteins are the Vip proteins, which are secreted into the culture medium, so they can not be part of the current bioproducts. On the other hand, UV light is the most influential factor in the degradation of Bt proteins after application. The objectives of this study were to make a comparison between two heterologous production system and encapsulation of proteins and study the effect of ultraviolet light on the insecticidal activity of these proteins. We managed to produce a secretable protein Vip3Ag4 of *Bacillus megaterium*. Also we carry out the construction for the expression of protein Vip3Ag4 in *Pseudomonas fluorescens*. It has been shown that microencapsulation system of *B. megaterium* protects the protein from abiotic factors such as the UV light, maintaining the activity of part of the protein. Microencapsulation of proteins opens the door to future works based on the development of biopesticides from Vip proteins.

2. RESUMEN

Bacillus thuringiensis es el microorganismo más empleado en el desarrollo de bioinsecticidas, ya que produce proteínas con propiedades insecticidas para distintas plagas. Los objetivos de este trabajo son realizar una comparación entre dos sistemas de producción de proteína heteróloga y estudiar el efecto de la luz ultravioleta sobre la actividad insecticida de estas proteínas. En este trabajo se ha producido con éxito la proteína secretable Vip3Ag4 de *B. thuringiensis* en *Bacillus megaterium*. Además se llevó a cabo la construcción para la expresión de proteína Vip3Ag4 en *Pseudomonas fluorescens*. En este trabajo se ha puesto de manifiesto que el sistema de microencapsulación de *B. megaterium* protege a la proteína de factores abióticos como la luz UV, haciendo que la proteína mantenga su toxicidad en el tiempo tras su aplicación en campo como agente de control de plagas. La microencapsulación de proteínas abre las puertas a trabajos futuros basados en el desarrollo de bioinsecticidas a partir de proteínas Vip.

3. INTRODUCCIÓN

El control biológico de plagas es un método que consiste en la utilización de organismos vivos con el objetivo de controlar las poblaciones de fitófagos que ocasionan daños en los cultivos. Debido al alto impacto medioambiental y a los peligros para la salud humana y animal asociados al uso de plaguicidas químicos, en la actualidad se están utilizando diferentes alternativas de control biológico que los sustituyan. En las últimas décadas ha habido un renovado interés por desarrollar bioinsecticidas basados en el uso de toxinas de *Bacillus thuringiensis* debido a su efectividad e inocuidad para el ser humano, la fauna terrestre y acuícola y el medio ambiente.

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria Gram positiva, anaeróbica facultativa y quimioorganótrofa, perteneciente a la familia *Bacillaceae* (Sneath, 1986). Este microorganismo ha sido detectado en la mayor parte de los países donde se han realizado programas de muestreo y ha sido aislado en diversos ambientes como suelo (Martin & Travers, 1989), polvo de grano almacenado (DeLucca et al., 1984; Meadows et al., 1992); cadáveres de insectos (Heimpel, 1967; Kaelin et al., 1994), medios acuáticos (Goldberg & Margalit, 1977) y filoplano (Smith & Couche, 1991). Sin embargo, la característica más importante de *B. thuringiensis* es su capacidad para producir durante la fase vegetativa y/o su fase de esporulación una serie de proteínas con propiedades insecticidas (Sneath, 1986; Estruch et al., 1996). En la actualidad se conocen unas 900 de estas proteínas que están agrupadas en cuatro grupos (Cry, Cyt, Vip y Sip) y que muestran actividad insecticida para distintas especies de insectos, ácaros, nematodos y protozoos. Las toxinas Cry y Cyt, se producen formando cuerpos cristalinos asociados a la fase de esporulación de la bacteria (Bravo et al., 1998), mientras que las toxinas Vip (Estruch et al., 1996) y Sip (Donovan et al., 2006) se producen en la fase vegetativa del cultivo y son secretadas al medio. Todas estas proteínas se clasifican en función del grado de similitud de su secuencia de aminoácidos según marca el Comité Internacional de Nomenclatura de Toxinas de *B. thuringiensis* (Crickmore et al., 2014). La nomenclatura utilizada se compone por tres letras correspondientes a cada grupo, seguidas de cuatro caracteres que se corresponden con cuatro niveles de homología. El primer y cuarto nivel viene dado por un número arábigo, mientras que el segundo y tercer nivel, por una letra mayúscula y minúscula, respectivamente. El primer rango

agrupa proteínas que conservan hasta un 45% de identidad en su secuencia de aminoácidos y, en general, son tóxicas para especies de insectos incluidas en un mismo orden. El segundo y tercer rango agrupa proteínas que comparten como máximo el 78 y 95% de su secuencia de aminoácidos, respectivamente, y pueden mostrar diferencias en su espectro de huéspedes y en su potencia insecticida frente a las diferentes especies de insectos para las que son tóxicas. Las proteínas que se diferencian en el cuarto rango, comparten más de un 95% de su secuencia y se piensa que son el resultado de mutaciones puntuales (Crickmore et al., 2014) (Figura 1).

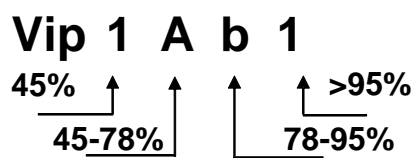


Figura 1. Ejemplo de nombre de una proteína Vip denominada de acuerdo con los criterios de clasificación establecidos por el Comité Internacional de Nomenclatura de Toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Crickmore et al., 2014).

Dentro del grupo de proteínas Vip se encuentran las toxinas binarias Vip1/Vip2, que presentan actividad insecticida contra coleópteros y una especie de áfido (Sattar & Maiti, 2011), y las toxinas Vip3 que son activas contra lepidópteros (Estruch et al., 1996). El modo de acción propuesto para las proteínas binarias consiste en que las proteínas Vip1 podrían unirse a receptores específicos en las células epiteliales del intestino del insecto, formando un poro. La proteína Vip2 podría pasar a través de este poro, modificando la actina de las células epiteliales del intestino e inhibir la polimerización (Warren, 1997). En el caso de las proteínas Vip3, el modelo descrito consiste en que las proteínas tóxicas son procesadas en el intestino del insecto a una forma activa. Una vez activadas se unen a receptores específicos en las células epiteliales del intestino formando poros (Yu et al., 1997).

Sin embargo, hasta la fecha las proteínas Vip no han sido utilizadas como materia activa en formulados bioinsecticidas y mediante pulverizaciones convencionales debido a que contienen un péptido señal en su secuencia, que hace que sean secretadas al medio extracelular cuando son producidas en cepas de *B. thuringiensis* (Estruch et al., 1996). Esta característica ha dificultado la producción y formulación de insecticidas

microbianos basados en este tipo de proteínas, ya que permanecen diluidas en el medio de cultivo durante el proceso de centrifugación que se utiliza para recuperar las esporas y cristales, y por ello, hasta el momento las proteínas Vip únicamente han sido utilizadas en plantas transgénicas. Un ejemplo de ello es el algodón Cot102XCot67b (Syngenta) que expresa conjuntamente las toxinas Cry1Ab y Vip3Aa19 o el maíz MIR162 (SYN-IR162-4) (Syngenta) que expresa la toxina Vip3Aa20.

Los bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis* pueden clasificarse atendiendo a su grado de modificación genética en bioinsecticidas de primera, segunda o tercera generación. Los productos de primera generación se formulan con una mezcla de esporas y cristales obtenida por fermentación de distintas cepas silvestres, constituyendo casi el 80% de los productos actualmente comercializados. Los bioinsecticidas de segunda generación se componen de esporas y cristales de cepas de *B. thuringiensis* que han sido mejoradas genéticamente, bien por conjugación, transformación, mutagénesis o construcción de proteínas híbridas, con la finalidad de aumentar su espectro de huéspedes o aumentar su potencia insecticida. En el caso de los bioinsecticidas de tercera generación, éstos son producidos en plantas transgénicas (Plantas-Bt) o a partir de otras especies bacterianas que son modificadas genéticamente para producir proteínas insecticidas de *B. thuringiensis*.

En los últimos años, los bioinsecticidas de tercera generación han experimentado un importante desarrollo. Este es el caso de la expresión de genes de *B. thuringiensis* en cepas recombinantes de *Pseudomonas fluorescens*, un microorganismo Gram (-) y no patogénico (Gaertner et al., 1993; Bunk et al., 2009). En este sistema de expresión y producción de proteína, una o varias toxinas de *B. thuringiensis* son expresadas en células de *P. fluorescens*, y posteriormente son fijadas en la fase estacionaria mediante métodos físicos o químicos quedando las toxinas encapsuladas por la membrana de *P. fluorescens* (Cell Cap® System, Mycogen). El sistema de producción Cell Cap® ha sido utilizado por la compañía Mycogen Corporation para obtener los productos comerciales MVP™, empleado para el control de lepidópteros, y M-TRAK™ para el control de coleópteros (Grace & Ewart, 1996). Previo a este trabajo, se desarrolló en nuestro laboratorio un sistema de expresión en *Pseudomonas fluorescens* de proteínas

secretables, tanto Cry1I como Vip3A (Hernández-Rodríguez et al., 2013), de Bt basado en un plásmido de expresión en *Pseudomonas syringae*, pMEKm12 (Lu et al., 2002).

Además del sistema de expresión heteróloga de proteína en *P. fluorescens* existen otros microorganismos aptos para expresar proteínas de *B. thuringiensis*. *B. megaterium* es un microorganismo Gram (+), aeróbico, esporulante, no patógeno y que suele encontrarse en el filoplano de las plantas (Bora et al., 1994). Con esta bacteria MoBiTec (Alemania) ha desarrollado el sistema *Bacillus megaterium* Protein Expression System con el que es posible expresar y producir industrialmente una gran variedad de proteínas heterólogas con distinta finalidad (Vary et al., 2007). En la actualidad podemos encontrar varios vectores de expresión útiles para transformar *B. megaterium* (Biedendieck et al., 2007) que permiten la expresión intracelular de proteínas utilizando como inductor de expresión génica un sustrato de bajo coste como la xilosa. Este azúcar se obtiene por hidrólisis de residuos vegetales y se encuentra naturalmente en mostos de uva (Flanzy, 2003), paja residual de sorgo (Herrera et al., 2003) y salvado de trigo (Sanjust et al., 2004).

Por otra parte, se ha visto que las proteínas de *B. thuringiensis* tienen una alta sensibilidad a diversos factores abióticos tales como la luz ultravioleta (UV), el calor, los ciclos de deshidratación-rehidratación, los cambios de pH y a la actividad proteolítica de los microorganismos del filoplano. Estos factores pueden causar que la proteína se desnaturalice o que se rompa en fragmentos dando lugar a péptidos inactivos.

Uno de los principales responsables de la fotodegradación y la consecuente pérdida de toxicidad de las proteínas insecticidas es la radiación solar UV-A (320-400 nm) y UV-B (280-320 nm) recibida en la superficie de la Tierra. La radiación UV-C (200-280 nm), es la de mayor energía, pero ésta no es capaz de llegar a la superficie terrestre debido a que es absorbida por el oxígeno y el ozono presente en la estratosfera. Sin embargo, Griego y Spence (1978) determinaron que el espectro de radiación UV-B y UV-C es conjuntamente responsable de la inactivación de las proteínas de Bt. Desde entonces, un amplio número de estudios de fotodegradación se basan en el empleo del espectro de radiación UV-B y/o UV-C ya que permiten establecer modelos de degradación/protección de proteínas.

Por todo ello, se hace necesaria la búsqueda de soluciones basadas en sistemas de producción de proteínas que permitan la microencapsulación de proteínas secretables, como las Vip. Estos sistemas de microencapsulación permitirán la aplicación convencional de estas proteínas secretables, además de evitar la pérdida de actividad de las toxinas debido a la desnaturalización por factores bióticos y abióticos.

4. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

1) Comparar dos sistemas de producción de proteínas insecticidas secretables.

2) Estudiar el efecto de la luz ultravioleta sobre la actividad insecticida de la proteína producida y protegida por dichos sistemas de expresión.

Para ello, expresaremos la proteína Vip3Ag4 en *B. megaterium* y *P. fluorescens* y evaluaremos su actividad insecticida sobre un lepidóptero plaga. El sistema de expresión heteróloga debe de cumplir una serie de requisitos:

- El microorganismo empleado debe ser seguro y su liberación en los ecosistemas entrañará ningún riesgo para las personas, la fauna terrestre o acuícola, las plantas y el medio ambiente.
- Una vez producida la proteína, la pared bacteriana debe mantenerse intacta y actuar como una microcápsula natural.
- Las proteínas contenidas en las células bacterianas deben tener actividad insecticida por ingestión para las especies diana.
- Las proteínas deben poder ser producidas a escala industrial con un coste bajo que haga viable la comercialización del bioinsecticida.
- La encapsulación bacteriana debe aportar ventajas para la formulación, almacenamiento y/o aplicación del bioinsecticida.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1.- Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

El gen insecticida *vip3Ag4* (Palma et al., 2013) utilizado para este estudio se obtuvo de la cepa Z21.2 de *Bacillus thuringiensis*. Esta cepa proviene de una colección que fue aislada dentro de un programa nacional de búsqueda de nuevas cepas de *B. thuringiensis* (Iriarte et al., 2000). El cultivo de esta cepa para la posterior amplificación del gen *vip3Ag4* se llevó a cabo en medio Luria-Bertani (1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl, 1,5 % Agar; pH 7) a 37 °C en agitación (200 rpm) durante toda la noche. Para la expresión de la proteína Vip3Ag4 en *Bacillus megaterium* se empleó la cepa comercial WH320, que fue crecida en medio de cultivo 2xTY (1,6% de triptona, 1 % de extracto de levadura, 0,5 % de NaCl; pH 7.0) a 37 °C y 200 rpm durante toda la noche. Para la expresión de la proteína Vip3Ag4 en *Pseudomonas fluorescens* se empleó la cepa SW 25. El cultivo de esta cepa se realizó en medio King's medium B (KMB) (2% proteosa peptona, 0,15% K₂HPO₄, 0,15 % MgSO₄•7H₂O, 1% glicerol, 1,5% agar; pH 7) a 28 °C en agitación (200 rpm) durante toda la noche. La clonación de genes se llevó a cabo en células competentes de *Escherichia coli* DH5α producidas en el laboratorio y que fueron cultivadas a 37 °C en medio LB, suplementado con el correspondiente antibiótico.

5.2.- Amplificación y clonación del gen *vip3Ag4* en los vectores de expresión

Para la expresión de la proteína Vip3Ag4 en *B. megaterium*, el gen *vip3Ag4* fue clonado en el vector de expresión pN-His-TEV1622 (Biedendieck et al., 2007) (Figura 2A). El gen fue introducido en marco de lectura abierta con el promotor P_{xyl}, inducible por xilosa, y en fusión con una cola de histidinas (6x His-Tag) codificada en el vector en el extremo amino. Este vector de expresión confiere resistencia a tetraciclina a las células transformadas. La construcción pN1622Ag4 transformada en *B. megaterium* fue proporcionada por el Dr. Leopoldo Palma (datos no publicados).

Para llevar a cabo la expresión de la proteína Vip3Ag4 en *P. fluorescens*, el gen *vip3Ag4* se clonó en el vector de expresión pMEKm12 (Lu et al., 2002) (Figura 2B). En esta construcción, el gen *vip3Ag4* fue introducido en marco de lectura abierta con el promotor tac – lac (inducible por IPTG) y en fusión con una cola de maltosas. Inicialmente, el gen *vip3Ag4* fue amplificado por PCR utilizando cebadores específicos.

Estos cebadores, a los que se les añadió el sitio de restricción de *EcoRI* (subrayado en la secuencia), hibridan con la secuencia del gen desde el codón de inicio ATG (5'-GAATTCATGAACAAGAATAATACTAAATTAAC -3') hasta el codón de stop ACT (5'-CCTTAAAAAGCTAATTCACTGAATTC -3') dando lugar a un fragmento de 2364 pb correspondientes al gen *vip3Ag4*. Además se diseñó un cebador interno reverso (5'-GTGTCCCTTTGAATTTATGTC -3') situado a 200 pb desde el codón de inicio y que permite comprobar la dirección en la que se ha insertado el gen.

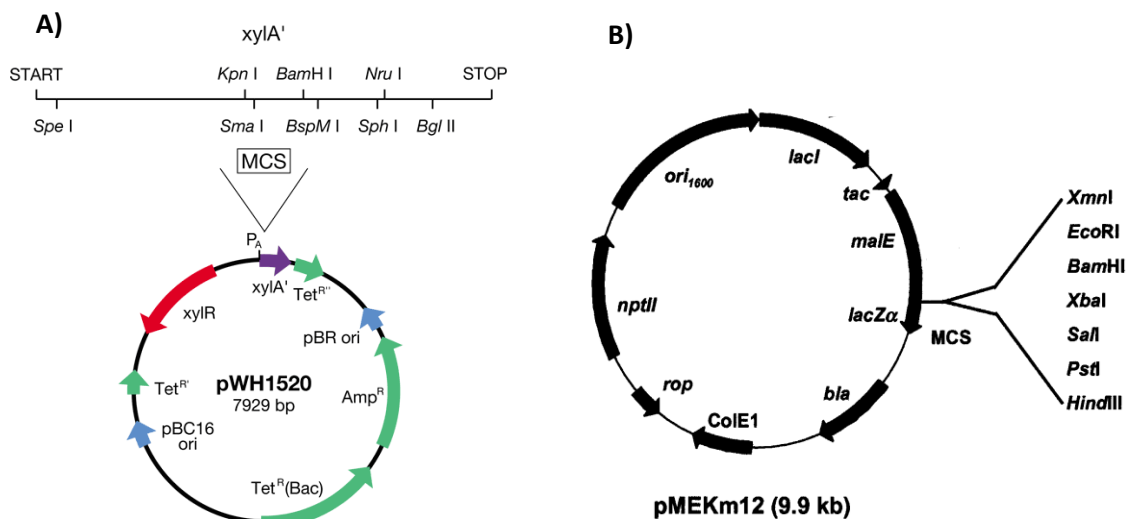


Figura 2. A) Vector de expresión pWH1520: pBC16 ori, origen de replicación en *B. megaterium*; pBR ori, origen de replicación en *E. coli*; P_A, promotor inducible por xilosa; xylR, gen que codifica el represor dependiente de xilosa; Amp^R, gen de resistencia a ampicilina; Tet^R, gen de resistencia a tetraciclina; **B)** Vector de expresión pMEKm12: ori 1600, origen de replicación en *P. fluorescens*; tac-lac, promotor inducible por IPTG; nptII, gen de resistencia a kanamicina; malE, gen que codifica para la proteína de unión a maltosa (MBP).

Para la reacción de PCR se preparó una mezcla en un volumen final de 25 µl, compuesta por 5 µl de buffer 5x *PrimeSTAR*[®], 0,2 mM desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 0,3 µM de cada cebador, 0,2 µl de *PrimeSTAR*[®] HS DNA Polymerase (Takara Bio Inc., Japan) y 1 µl de ADN molde que provenía de una extracción de ADN total de la cepa de *B. thuringiensis* Z21.2 (Ruiz de Escudero et al., 2006). El protocolo de la reacción consistió en una primera desnaturalización a 95 °C durante 3 minutos, seguida de un ciclo de 1 minuto a 95 °C, un minuto de anillamiento a 50 °C y 3 minutos de elongación

a 72 °C. Este ciclo se repitió 34 veces y terminó con 10 minutos a 72 °C. El producto de la PCR fue sometido a electroforesis en gel de agarosa 1 % en tampón TAE (tris-acetato-EDTA), y usando como marcador de peso molecular el 1 kb ADN ladder (NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Alemania). El gel, una vez resuelto, se tiñó con bromuro de etidio (Sambrook & Russell, 2001) y se visualizó mediante captura fotográfica en un transiluminador de luz UV (G:BOX, Syngene). El amplicón se extrajo del gel con ayuda de un bisturí y el ADN se purificó utilizando el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) (GmbH & Co. KG., Alemania). Posteriormente se clonó en el vector de clonación pJET 1.2 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (CloneJET PCR Cloning Kit, Fermentas, Canadá) obteniéndose la construcción pJETAg4. Esta construcción fue transformada por choque térmico en células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α , y para ello se añadieron 7,5 μ l del producto de la ligación a 120 μ l de células competentes. La mezcla se mantuvo en hielo durante 30 minutos, después se introdujo en un baño de agua a 42 °C durante 45 segundos y seguidamente se añadió 1 ml de LB. Posteriormente, las células se incubaron durante una hora a 37 °C a 200 rpm, se sembraron en placas de LB suplementadas con 100 μ g/ml de ampicilina y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Al día siguiente, se realizó un aislamiento de ADN plasmídico (NucleoSpin Plasmid, Macherey-Nagel) de un cierto número de colonias). Seguidamente, se realizó una digestión del plásmido pJETAg4 con la enzima de restricción *EcoRI* y el producto de ésta se resolvió en gel de agarosa al 1%. El fragmento de ADN correspondiente al gen *vip3Ag4* fue recortado y purificado mediante el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, y posteriormente fue clonado en el vector de expresión de *Pseudomonas* pMEKm12. Pevio a la clonación, el vector pMEKm12 fue digerido con la enzima de restricción *EcoRI* y desfosforilado con la enzima *Antartic Phosphatase* (NEB Inc., UK). La concentración de ADN del inserto y del plásmido fue estimada mediante electroforesis en gel de agarosa con ayuda del marcador de peso molecular cuantificable 1 kb ADN ladder. La reacción de ligación se llevó a cabo empleando como mezcla de reacción 2 μ l de tampón de Reacción 2x, 1 μ l de T4 ADN Ligasa, 150 ng ADN purificado, 50 ng vector pMEKm12, en un volumen final de 20 μ l. Esta reacción se incubó durante toda la noche a 16 °C y fue transformada en la cepa de *E.coli* DH5 α . De esta manera, se obtuvo la construcción

pMEKm12-*vip3Ag4*. La construcción fue enviada a secuenciar para comprobar la secuencia, correcta inserción y dirección del gen (STABvida, Portugal).

5.3.- Expresión de la proteína Vip3Ag4 en *Bacillus megaterium*

Para la expresión de la proteína Vip3Ag4 la cepa WH320 de *B. megaterium* fue cultivada en medio de cultivo 2xTY con tetraciclina (10 µg/ml). Una vez alcanzada una densidad óptica de 0,3 a 600 nm se indujo la expresión mediante la adición de xilosa a una concentración final de 0,5% (p/v). La inducción de la expresión continuó durante toda la noche. La mitad del volumen de fermentación fue utilizado para la extracción y purificación de la proteína recombinante y la otra mitad se fijó con lugol (Sigma-Aldrich, EEUU) para ser utilizada como fuente de proteína encapsulada en los bioensayos. La fracción de cultivo destinada a la purificación fue centrifugada a 6.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y el pellet obtenido fue resuspendido en 30 ml de buffer de extracción (20mM NaH₂PO₄; 500 mM NaCl; 1 mg/ml lisozima) junto con 30 µl de Benzonasas® (Novagen, Alemania) y 30 µl de PMSF (100 mM). La mezcla se incubó en agitación suave a 37 °C durante 1 hora. A continuación, se lisaron las células mediante pulsos de ultrasonidos (Branson Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corporation, EEUU). Se aplicaron 2 ciclos de 60 segundos al 60% de potencia y con un periodo de descanso de 60 segundos entre ciclos. Seguidamente, las células, a las que se les añadió 30 µl de PMSF, se incubaron en hielo en agitación magnética suave durante 1 hora para solubilizar los cuerpos e inclusión. Posteriormente, la mezcla se centrifugó durante 30 minutos a 11.000 rpm. El sobrenadante se filtró secuencialmente con filtros de acetato de celulosa 0,45 µm y 0,2 µm de diámetro de poro. A continuación, se purificó la proteína mediante columnas de afinidad Niquel-Histidina Protino Ni-TED 2000 (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Estas columnas se basan en la afinidad que poseen las proteínas recombinantes marcadas con una cola de histidinas por los iones de níquel inmovilizados en la fase sólida de las columnas. Una vez purificada, la proteína fue cambiada del buffer de elución, que contiene imidazol, a agua mili-Q mediante una columna de desalado (Sephadex G-25M, GE Healthcare). Durante el proceso de expresión y purificación, se tomaron muestras que fueron observadas en un gel de acrilamida (SDS-PAGE) al 11% para identificar las bandas

obtenidas en el perfil proteico. Como marcador de peso molecular se utilizó Precision Plus Protein™ Standars – Dual color (BioRad, EEUU).

5.4.- Fijación con lugol 1 %, recuento y análisis de viabilidad

La otra mitad de células de *B. megaterium* inducidas se cosecharon igualmente por centrifugación a 6.000 rpm y 4 °C. Posteriormente, se fijaron mediante un tratamiento con lugol 2 % durante 4 horas a temperatura ambiente y con agitación suave (Barnes & Cummings, 1987). Una vez finalizado este proceso, se lavaron tres veces con agua mili-Q y se resuspendieron en 20 ml de agua mili-Q. Este tratamiento con lugol 2 % se realizó también sobre las células control obtenidas a partir del cultivo sin inducir. El ensayo de viabilidad se llevó a cabo sembrando en placas de LB las células fijadas, tanto con antibiótico (tetraciclina, 10 µg/ml) como sin él.

5.5.- Clonaje y transformación del gen *vip3Ag4* en *Pseudomonas fluorescens*

Para la expresión de proteína Vip3Ag4 en *P. fluorescens*, la construcción pMEKm12-*vip3g4* fue transformada en células electrocompetentes de *P. fluorescens*. Dichas células se prepararon inoculando una colonia de la cepa SW 25 en 20 ml de medio KMB líquido. El cultivo se incubó durante toda la noche a 28 °C en agitación (200 rpm). Las células se recuperaron por centrifugación y posteriormente se lavaron dos veces con 1 ml de sacarosa estéril 300 mM centrifugando durante 2 min a 6000 rpm. Finalmente el pellet se resuspendió en un volumen final de 100 µl de sacarosa 300 mM. La transformación de las células se llevó a cabo transfiriendo la construcción pMEKm12-*vip3Ag4* a una cubeta de electroporación de 0,4 cm de ancho (BioRad, EEUU) junto con 100 µl de bacterias electrocompetentes. Las condiciones de transformación fueron un pulso de 2,5 kV, 25 µF y 400 Ω. Una vez realizada la electroporación se añadió 1 ml de medio KMB y se incubó durante 4 horas a 28 °C. Las células transformadas se sembraron en medio KMB con kanamicina a una concentración final de 50 µg/ml. Se seleccionaron 10 colonias transformadas para comprobar mediante PCR que hubieran incorporado la construcción pMEKm12-*vip3Ag4*.

5.6.- Cuantificación de proteína encapsulada y purificada

La cuantificación de la proteína obtenida del proceso de producción se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de acrilamida en la que se visualizó la proteína purificada a cuantificar junto con un patrón de Albúmina del Suero Bovino (BSA). Posteriormente se calculó la concentración de proteína obtenida en el proceso de purificación mediante densitometría utilizando el software Gene Tools (Syngene). Para llevar a cabo el cálculo de la concentración de proteína encapsulada (ng/cel) se realizó un recuento de células en una cámara de Neubauer. Esto permitió estimar la concentración de proteína por volumen de cultivo y la concentración de proteína por célula.

5.7.- Evaluación de la toxicidad de la proteína Vip3Ag4

La toxicidad de la proteína Vip3Ag4 fue evaluada en larvas del lepidóptero *Spodoptera littoralis* siguiendo el método de contaminación superficial de la dieta. Para ello, se empleó una dieta general de lepidópteros (Greene et al., 1976) que fue distribuida en cajitas con 24 pocillos mientras permanecía líquida. Una vez solidificada la dieta, ésta fue impregnada superficialmente con 35 µl de una determinada dilución de la proteína. Para cada tratamiento se emplearon cinco concentraciones con factor de dilución constante. Con el fin de estudiar la capacidad fotoprotectora de la microencapsulación, la proteína purificada y la proteína encapsulada fueron sometidas a una radiación UV de 40 KJ/cm². Este nivel de radiación representa la energía máxima recibida por unidad de superficie en el paralelo 42° (Pamplona) durante dos días soleados. Para llevar a cabo la fotoexposición se dispuso la toxina o suspensión de células a ensayar en placas de 12 pocillos que se dejaron secar a 28 °C durante toda la noche. La proteína, una vez seca, se expuso a la radiación UV en un Crosslinker (Stratalinker 1800, Agilent Technologies, Inc., EEUU). Se rehidrató la muestra y se se dispuso sobre la dieta solidificada como se describe anteriormente. Como control negativo, en el caso de la proteína purificada se utilizó agua, y en el caso de la proteína encapsulada en *B. megaterium* se empleó la concentración de células de *B. megaterium* sin inducir más alta del bioensayo. Se realizaron controles de deshidratación con el fin de estudiar el efecto de la deshidratación tanto sobre la proteína purificada como sobre

la encapsulada. Una vez dispensada la dilución de proteína sobre la dieta, las cajas se dejaron secar a temperatura ambiente en la campana de flujo laminar hasta eliminar el agua por evaporación. Seguidamente se colocó una larva neonata de *S. littoralis* en cada pocillo y se cerró la placa colocando tres capas de papel absorbente para evitar el exceso de humedad y sellar completamente la placa. El bioensayo se mantuvo en condiciones controladas 16:8 horas (luz:oscuridad), 25 ± 1 °C y 70 ± 5 % de humedad relativa. Se realizaron al menos tres repeticiones de cada tratamiento con 24 larvas por concentración. La mortalidad fue evaluada a los 7 días y los datos dosis-mortalidad se analizaron mediante un análisis Probit (Finney, 1971) con el software POLO-PC (LeOra Software Company, 1987) a través del cual se determinó la Concentración Letal 50 (CL₅₀) de cada tratamiento.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1.- Amplificación y clonaje del gen *vip3Ag4* en pMEKm12

La amplificación mediante PCR del gen *vip3Ag4* se muestra en la figura 3A. El tamaño del fragmento observado en el gel se corresponde con el amplicón esperado de 2364 pb. Posteriormente, *vip3Ag4* fue clonado en pJET y tras la transformación, se comprobó mediante digestión con la enzima de restricción *EcoRI*, si los clones seleccionados contenían la construcción pJETAg4. Los tres clones seleccionados contenían la construcción pJETAg4. Los tres clones seleccionados contenían el gen *vip3Ag4* (Figura 3B).

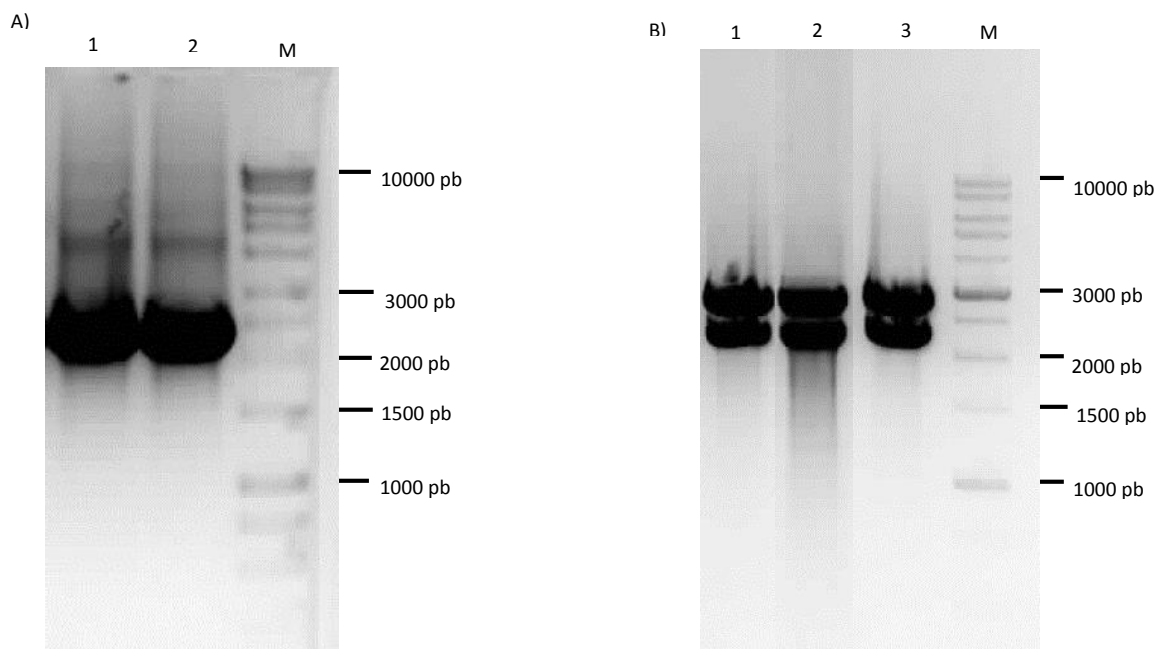


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa (1%): A) Amplificación del gen *vip3Ag4* a partir de la cepa Z21.2 de Bt. Carriles 1 y 2: fragmentos amplificados por PCR; M: marcador de peso molecular B) Carriles 1 a 3: producto de la digestión con la enzima de restricción *EcoRI* de tres clones que muestran el plásmido pJET (2974 kb) y el inserto, el gen *vip3Ag4* (2364 kb). M: marcador de peso molecular.

A partir de este gel, se extrajeron los amplicones correspondientes al gen *vip3Ag4* para su posterior clonaje en el vector de expresión en *Pseudomonas* pMEKm12. Para llevar a cabo esta clonación se determinó la cantidad de ADN tanto del vector pMEKm12 (Figura 4A), como la del inserto correspondiente al gen (Figura 4B).

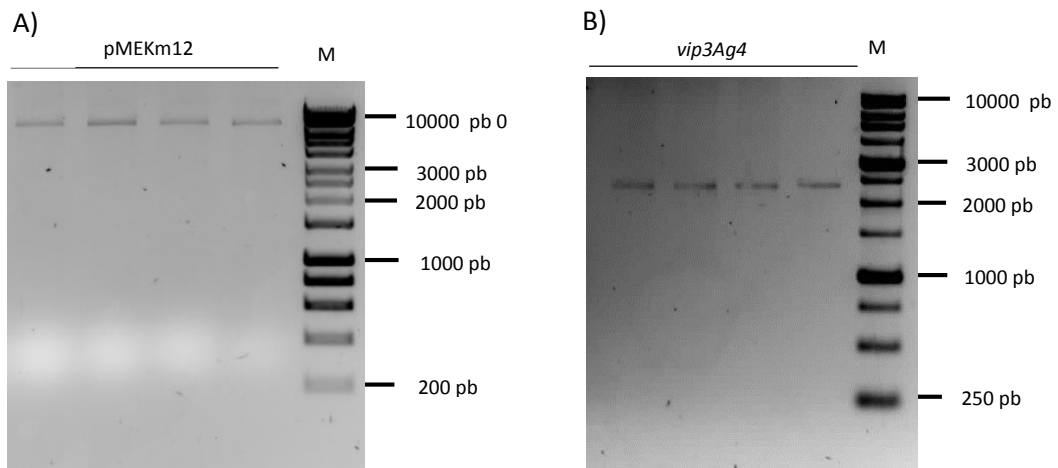


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa (1%): A) Cuantificación de varios clones del vector pMEKm12 digeridos con *EcoRI*. M: marcador de peso molecular B) Cuantificación de la purificación del fragmento de ADN correspondiente a varios clones del gen *vip3Ag4*. M: marcador de peso molecular.

El gen *vip3Ag4* fue clonado en el vector de expresión y tras la transformación, se comprobó mediante digestión con la enzima de restricción *EcoRI* que las células de *E. coli* contenían la construcción pMEKm12-*vip3Ag4* (Figura 5A). Una vez comprobada la correcta incorporación en fase de lectura abierta del inserto mediante secuenciación, la construcción fue empleada para transformar la cepa de *P. fluorescens* SW25. Los transformantes de *Pseudomonas* obtenidos fueron analizados por PCR para determinar si el gen estaba presente en ellos. El gel de agarosa mostró el fragmento de amplificación correspondiente al tamaño del gen *vip3Ag4* (Figura 5B), por lo que cualquiera de los clones obtenidos podría ser empleado para la producción de Vip3Ag4. Sin embargo, la producción de la proteína Vip3Ag4 en *P. fluorescens* no alcanzó a llevarse finalmente a cabo en este trabajo, quedando previsto el realizarlo en futuras investigaciones en el laboratorio.

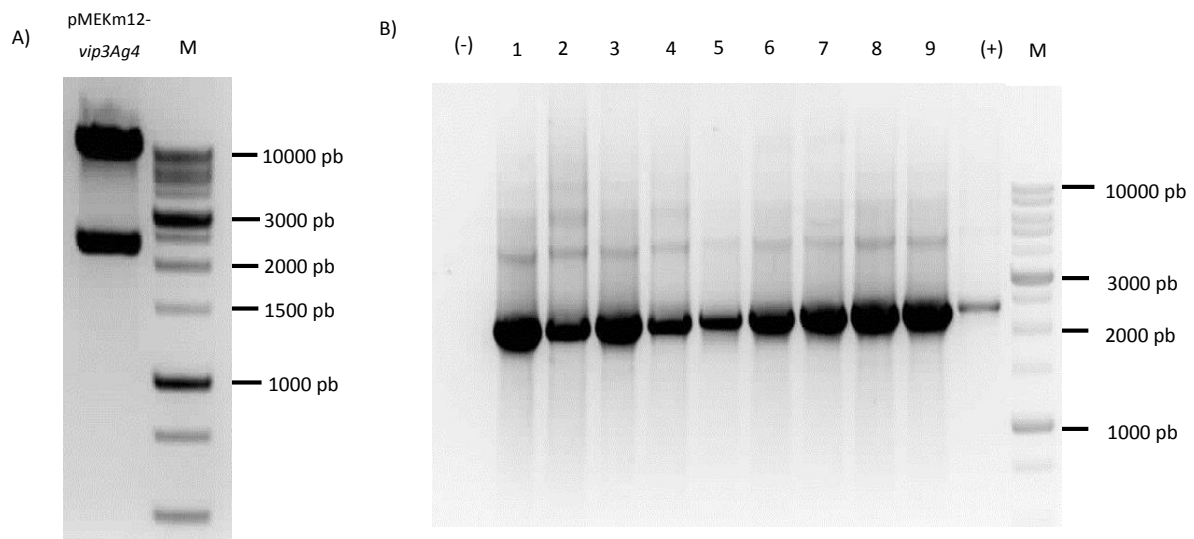


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa (1%). A) Digestión de la construcción pMEKm12-*vip3Ag4*. Se muestra el vector pMEKm12 (9,9 kb) y el inserto correspondiente al gen *vip3Ag4*. M: marcador de peso molecular. B) PCR de comprobación a partir de colonias de *P. fluorescens* SW25 transformadas. Carriles 1 a 9: amplificones correspondientes al gen *vip3Ag4* (-): control negativo; (+): control positivo; M: marcador de peso molecular.

6.2.- Expresión y purificación de la proteína Vip3Ag4 en *B. megaterium*

El producto del gen *vip3Ag4* es una proteína de aproximadamente 88 kDa. Con el fin de monitorizar el proceso de expresión y purificación de la proteína Vip3Ag4, se tomaron muestras a lo largo del proceso de producción. Las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). La banda mayoritaria de entre 75 y 100 kDa que se observó en el gel mostró el tamaño esperado (Figura 6), por lo que la producción en *B. megaterium* de esta proteína se indujo con éxito mediante la adición de xilosa 5 % (p/v). Posteriormente, la proteína fue purificada en una columna de Níquel y fue eluída principalmente en la primera fracción (Figura 6).

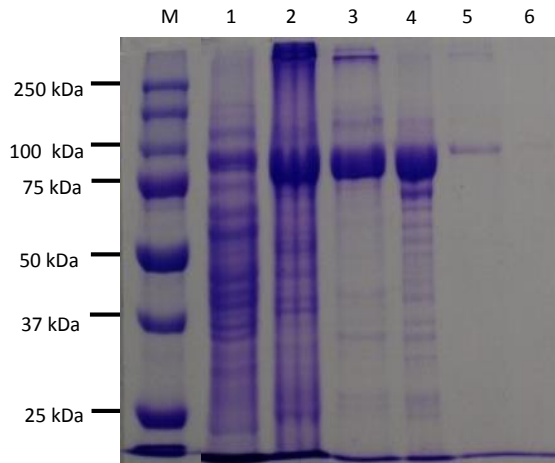


Figura 6. SDS-PAGE donde se muestra el proceso de purificación de la proteína. Cada carril corresponde con una alícuota tomada en el proceso de purificación. M: marcador Precision Plus Protein Standards; 1: Sobrenadante de lisado; 2: Pellet, 3: Primera fracción eluída de la columna de níquel, 4: Primera fracción de la columna de desalado, 5: Segunda fracción eluída de la columna de níquel, 6: Segunda fracción de la columna de desalado.

A lo largo de los experimentos de purificación se observó que gran parte de la proteína final obtenida proviene de los cuerpos de inclusión solubilizados mediante agitación en agitador magnético en frío. Se estimó que este paso de solubilización hace que la cantidad de proteína recuperada sea de aproximadamente el doble (datos no mostrados). Por otra parte, en trabajos anteriores de expresión de proteínas Vip3 en *B. megaterium* realizados en nuestro laboratorio, se estudió la capacidad de encapsulación de este microorganismo y se determinó que contrariamente a los que sucede en *B. thuringiensis*, estas proteínas no se secretaban al medio de cultivo durante el proceso de expresión (Palma et al., datos no publicados).

Una vez que las células de *B. megaterium* fueron fijadas con lugol se llevó a cabo un ensayo de viabilidad (supervivencia celular) mediante siembra en placa de varias alícuotas del cultivo fijado. Dado que no creció ninguna colonia en el medio de cultivo tras 72 horas de incubación podemos decir que el tratamiento con lugol resulta efectivo como método de fijación (Barnes & Cummings, 1987), para poder llevar a cabo con seguridad la liberación en la naturaleza de microorganismos genéticamente modificados (Viebahn et al., 2009).

6.3.- Cuantificación de la proteína Vip3Ag4

La cuantificación de Vip3Ag4 por densitometría en gel dio como resultado una concentración de 6 mg de proteína por litro de cultivo (Figura 7). Teniendo en cuenta la biomasa del cultivo, pudimos calcular que se produjeron unos 0,44 mg de proteína por gramo de pellet. El recuento de células totales (viables y no viables) realizado en cámara de Neubauer fue de $1,27 \times 10^{10}$ células/ml. Con este dato obtuvimos que la concentración de proteína encapsulada es $1,75 \times 10^{-6}$ ng de proteína/célula.

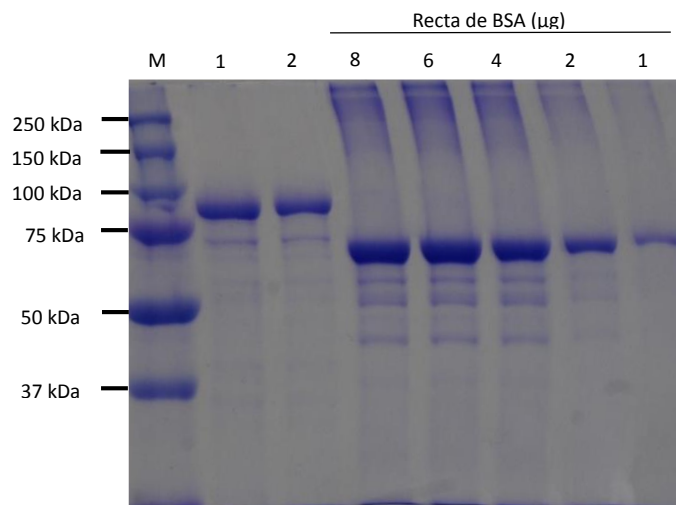


Figura 7. SDS-PAGE en el que se muestra la cuantificación de la proteína Vip3Ag4 producida en *B. megaterium*. M: marcador Precision Plus Protein Standards; Carril 1: 8 µl de proteína purificada; Carril 2: 4 µl de proteína purificada; Recta patrón de BSA: con 8, 6, 4, 2, 1 µg de BSA.

Los rendimientos de proteína producida fueron similares a los obtenidos en otros procesos de producción de este tipo de proteínas en sistemas de producción de proteína, como *E.coli*.

6.4.- Evaluación de la actividad insecticida

Los resultados de actividad insecticida demostraron que la proteína Vip3Ag4 producida en *B. megaterium* es altamente tóxica contra las larvas de *S. littoralis*. Los controles de deshidratación de proteína, tanto libre como encapsulada, realizados al principio de los ensayos mostraron que el proceso de secado previo a los tratamientos

no tiene efecto en la actividad insecticida (datos no mostrados). La proteína Vip3Ag4 purificada por columna a partir del lisado de *B. megaterium* presentó una CL_{50} de 27,5 ng/cm² (Tabla 1). Este dato es similar al obtenido en un trabajo anterior, en el que la proteína fue producida en *E. coli* BL21 (DE3), y tuvo una CL_{50} de 34,89 ng/cm² (Palma et al., 2013). En el caso de la proteína producida y encapsulada en *B. megaterium* (Vip3Ag4_encap), también se observó que fue tóxica contra las larvas de *S. littoralis*, siendo su CL_{50} de 258,5 ng/cm² (Tabla 1). Este dato muestra que la CL_{50} de la proteína encapsulada es unas 10 veces superior a la de la proteína purificada. Esta diferencia puede deberse a que la proteína que está dentro de la célula de *B. megaterium* se encuentre formando cuerpos de inclusión no solubilizables totalmente por los jugos intestinales de la larva. Además el hecho de que la proteína se encuentre envuelta por la pared del microorganismo pudo hacer que la digestión de la proteína fuera más complicada. Esta tendencia también se ve en Hernández-Rodríguez (2013), donde se probaron dos proteínas, Cry1Ia y Vip3Aa, purificadas de *Pseudomonas* y encapsuladas en *Pseudomonas*, contra dos especies de lepidópteros; y en ambos casos se vio como la CL_{50} de las proteínas encapsuladas era ligeramente superior a la de la proteína purificada en columna.

Spodoptera littoralis es una plaga polífaga cuya susceptibilidad a las proteínas Vip3 ha sido evaluada recientemente (Ruiz de Escudero et al., 2014). La susceptibilidad de esta especie a este grupo de proteínas es elevada, y las CL_{50} de Vip3Aa, Vip3Ab, Vip3Ae y Vip3Af oscilan entre 4 y 163 ng/cm². Por otro lado también se conoce la susceptibilidad de esta especie a las proteínas Cry (Van Rie et al., 1990). El uso de combinaciones de proteínas Cry y Vip3, con diferentes modos de acción (Lee et al., 2003; Sena et al., 2009), podría servir para minimizar la aparición de resistencias.

Los bioensayos realizados con la proteína purificada y encapsulada sometida a radiación ultravioleta muestran la disminución de la toxicidad de la proteína Vip3Ag4. En el caso de la proteína pura expuesta (Vip3Ag4+UV), con una CL_{50} de 518 ng/cm², la exposición a la radiación UV hace que su actividad se reduzca unas 20 veces en comparación con la proteína pura no expuesta. Por otra parte, el bioensayo de proteína encapsulada expuesta a radiación UV (Vip3Ag4_encap+UV) reveló que *B. megaterium* confiere resistencia a la proteína Vip3g4 frente a la radiación. La proteína encapsulada

y expuesta mostró una CL_{50} de 479 ng/cm² lo que supone que ésta proteína reduce su actividad 1,66 en comparación con la proteína encapsulada no fotoexpuesta. Esta bajada de actividad es significativamente menor a la que se produce cuando fotoexponemos la proteína purificada.

Entre la literatura podemos encontrar otros trabajos en los que se ha estudiado el efecto de la radiación ultravioleta sobre las esporas y los cristales proteicos de *B. thuringiensis*. Myasnik (2001) realizó una comparativa sobre la sensibilidad a la radiación UV-B por parte de *B. thuringiensis* y otros microorganismo del género *Bacillus* y determinó que las esporas de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* eran tan resistentes como las esporas de *Bacillus subtilis* y más resistentes que las esporas de *Bacillus cereus*, presentando una resistencia máxima a la radiación UV-B de 48 horas.

Otros autores como Zhang (2008) han estudiado la mejora de la resistencia a la radiación UV de *B. thuringiensis* mediante la expresión del gen de la melanina junto con la proteína insecticida obteniendo como resultado una resistencia a la radiación 9 veces mayor.

Tabla 1. Concentración letal media (CL_{50}) de Vip3Ag4 contra larvas neonatas de *S. littoralis*.

Tratamiento	Recta de regresión		CL_{50} ng/cm ²	Bondad del ajuste		Potencia relativa	L.C. (95%) ^o	
	Pendiente±ES	a*±ES		χ^2	g.l.		Inferior	Superior
Vip3Ag4	1,8±0,2	2,5±0,3	27,5	2,1	3	19,8	13,3	29,7
Vip3Ag4+UV	1,4±0,2	1,2±0,5	518,0	2,4	3	1	-	-
Vip3Ag4_encap	1,8±0,2	0,7±0,4	258,5	2,0	3	1,66	1,0	2,5
Vip3Ag4_encap+UV	3,0±0,3	- 3,1±0,8	479,0	2,1	3	1	-	-

a* Ordenada en el origen

^o Límites de confianza al 95 %

Otros autores han encapsulado proteínas de *B. thuringiensis* en sistemas alternativos y abióticos como micro-gotas lipídicas (Cheung & Hammock, 1985), la microencapsulación de esporas y cristales de *B. thuringiensis* en alginato de calcio mediante gelificación interna (García-Gutiérrez et al., 2011). Estos sistemas de microencapsulación consisten en producir la proteína en un microorganismo,

posteriormente se requiere un proceso de purificación de la proteína y finalmente se realiza la microencapsulación. Este tipo de encapsulación presenta como desventaja la duración del proceso de producción y el coste económico del mismo. Por ello, la microencapsulación en microorganismo, siempre y cuando se utilicen sustratos inductores de bajo coste como la xilosa, presenta más ventajas ya que estos sistemas permiten la encapsulación en el mismo organismo en el que se produce evitando así el proceso de purificación y posterior microencapsulación.

El sistema de producción en *P. fluorescens* con el vector de expresión pMEKm12 es un sistema de expresión de proteína inducible por IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) y según los autores Lu et al., (2002) y trabajos realizados en nuestro laboratorio (Hernández-Rodríguez et al., 2013), la cantidad necesaria para llevar a cabo la inducción en *P. fluorescens* es 5 mM de IPTG frente a los 0,5-1,5 mM de IPTG necesarios para llevar a cabo la inducción en *E. coli*. Esto hace que la producción de proteína en el vector de expresión pMEKm12 presente un alto coste de producción ya que el IPTG es un sustrato inductor relativamente caro. En cambio, el vector de expresión de *B. megaterium* pWH1520 (y los derivados de este) se inducen mediante la adición de xilosa, un azúcar que se obtiene por hidrólisis a partir de subproductos vegetales, lo que hace que este inductor tenga un coste significativamente menor.

El hecho de que el sistema de expresión de proteínas en *P. fluorescens* sea *a priori* más costoso debido al precio del inductor, no hace que la producción de proteínas en *P. fluorescens* deje de ser interesante, ya que este microorganismo puede proporcionar una fotoprotección de proteína intracelular superior a la que ofrece *B. megaterium*. Sin embargo, y además de el elevado coste de inducción, el sistema de expresión en *P. fluorescens* posee otras desventajas tales como el disponer de un número de vectores de expresión limitado y que las proteínas expresadas no son fácilmente purificadas (Lu et al., 2002).

Estos sistemas de producción de proteínas secretables de Bt permitirían aprovechar un grupo de proteínas que por sus características hasta la fecha quedaban fuera del uso como agentes de control de plagas. Además, las protegerían de uno de los factores abióticos más importantes en campo como es la radiación UV. En este trabajo,

se ha estudiado por primera vez la actividad tóxica de la proteína insecticida Vip3Ag4 microencapsulada en *B. megaterium* sobre *S. littoralis*, un insecto plaga polífago muy destructivo, demostrando el elevado potencial que posee este sistema para la producción de nuevos formulados bioinsecticidas y aumentando las perspectivas de su uso en el desarrollo de bioinsecticidas basados en proteínas secretables de *B. thuringiensis*.

7. CONCLUSIONES

- Se ha conseguido producir la proteína secretable Vip3Ag4 de *B. thuringiensis* en *Bacillus megaterium*. La proteína es activa tanto pura como encapsulada contra *S. littoralis*, por lo que el sistema puede considerarse adecuado para la producción de este tipo de proteínas.
- La exposición de la proteína pura a la luz UV hace que su actividad disminuya 20 veces. Sin embargo, la actividad insecticida de Vip3Ag4 microencapsulada en *B. megaterium* sólo disminuye 1.66 veces. Por lo que la microencapsulación aporta protección a la toxina frente a factores medioambientales como la radiación UV.
- El sistema de producción de proteínas insecticidas en *B. megaterium* podría tener ventajas respecto a otros, como el sistema en *Pseudomonas* o *E. coli*, debido sobre todo al bajo coste del inductor. Sin embargo, habría que estudiar y mejorar la disponibilidad de la proteína una vez encapsulada, ya que según los resultados de los bioensayos parece ser que no toda la proteína encapsulada es asimilable por el insecto.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Barnes, A.C., & Cummings, S.G. (1987). Cellular encapsulation of biological pesticides (Patent US4695455 A).
- Biedendieck, R., Yang, Y., Deckwer, W.-D., Malten, M., & Jahn, D. 2007. Plasmid system for the intracellular production and purification of affinity-tagged proteins in *Bacillus megaterium*. *Biotechnology and Bioengineering* 96:525-537.
- Bora, R.S., Murty, M.G., Shenbagarathai, R., & Sekar, V. 1994. Introduction of a lepidopteran-specific insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* by conjugal transfer into a *Bacillus megaterium* strain that persists in the cotton phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 60:214-222.
- Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina, L., Villalobos, F.J., & Peña, G. 1998. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology* 64:4965-4972.
- Bunk, B., Biedendieck, R., Jahn, D., & Vary, P.S. 2009. *Bacillus megaterium* and other bacilli: industrial applications. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*.
- Crickmore, N., Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., Schnepf, E., Sun, M., & Zeigler, D.R. 2014. 2014. "*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature" (2014). <http://www.btnomenclature.info/>.
- Cheung, P.Y., & Hammock, B.D. 1985. Micro-lipid-droplet encapsulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* delta-endotoxin for control of mosquito larvae. *Applied and Environmental Microbiology* 50:984-988.
- DeLuca, A.J., Godshall, M.A., & Palmgren, M.S. 1984. Gram-negative bacterial endotoxins in grain elevator dusts. *American Industrial Hygiene Association* 45:336-339.
- Donovan, W.P., Engleman, J.T., Donovan, J.C., Baum, J.A., Bunkers, G.J., Chi, D.J., Clinton, W.P., English, L., Heck, G.R., Ilagan, O.M., Krasomil-Osterfeld, K.C., Pitkin, J.W., Roberts, J.K., & Walters, M.R. 2006. Discovery and characterization of Sip1A: A novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72:713-719.

- Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A., & Koziel, M.G. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:5389-5394.
- Finney, D.J. 1971. *Probit analysis*. 3 edición. Cambridge: Cambridge University Press:20-63.
- Flanzy, C. 2003. *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*. AMV Ediciones.
- Gaertner, F.H., Quick, T.C., Thompson, M.A., & Kim, L. 1993. CellCap: an encapsulation system for insecticidal biotoxin proteins. *Advanced Engineered Pesticides*:73-83.
- García-Gutiérrez, K., Poggi-Varaldo, H.M., Esparza-García, F., Ibarra-Rendón, J., & Barrera-Cortés, J. 2011. Small microcapsules of crystal proteins and spores of *Bacillus thuringiensis* by an emulsification/internal gelation method. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 34:701-708.
- Goldberg, L.J., & Margalit, J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Unanotaenic unguickulara*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquito News* 37:355-358.
- Grace, J.K., & Ewart, D.M. 1996. Recombinant cells of *Pseudomonas fluorescens*: A highly palatable encapsulation for delivery of genetically engineered toxins to subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *Letters in Applied Microbiology* 23:183-186.
- Greene, G.L., Leppla, N.C., & Dickerson, W.A. 1976. Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium. *Journal of Economic Entomology* 69:487-488.
- Griego, V.M., & Spence, K.D. 1978. Inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores by ultraviolet and visible-light. *Applied and Environmental Microbiology* 35:906-910.
- Heimpel, A.M. 1967. A taxonomic key proposed for the species of the "crystalliferous bacteria". *Journal of Invertebrate Pathology* 9:364-373.
- Hernández-Rodríguez, C.S., Ruiz de Escudero, I., Asensio, A.C., Ferré, J., & Caballero, P. 2013. Encapsulation of the *Bacillus thuringiensis* secreted toxins Vip3Aa and Cry1Ia in *Pseudomonas fluorescens*. *Biological Control* 66:159-165.

- Herrera, A., Tellez-Luis, S.J., Ramirez, J.A., & Vazquez, M. 2003. Production of xylose from sorghum straw using hydrochloric acid. *Journal of Cereal Science* 37:267-274.
- Iriarte, J., Porcar, M., Lecadet, M., & Caballero, P. 2000. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from aquatic environments in Spain. *Current Microbiology* 40:402-408.
- Kaelin, P., Morel, P., & Gadani, F. 1994. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from Stored Tobacco and *Lasioderma serricorne* (F.). *Applied and Environmental Microbiology* 60:19-25.
- Lee, M.K., Walters, F.S., Hart, H., Palekar, N., & Chen, J.-S. 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. *Applied and environmental microbiology* 69:4648-4657.
- Lu, S.E., Scholz-Schroeder, B.K., & Gross, D.C. 2002. Construction of pMEKm12, an expression vector for protein production in *Pseudomonas syringae*. *FEMS Microbiology Letters* 210:115-121.
- Martin, P.A., & Travers, R.S. 1989. Worldwide Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 55:2437-2442.
- Meadows, M.P., Ellis, D.J., Butt, J., Jarrett, P., & Burges, H.D. 1992. Distribution, Frequency, and Diversity of *Bacillus thuringiensis* in an Animal Feed Mill. *Applied and Environmental Microbiology* 58:1344-1350.
- Myasnik, M., Manasherob, R., Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Margalith, Y., & Barak, Z. 2001. Comparative sensitivity to UV-B radiation of two *Bacillus thuringiensis* subspecies and other *Bacillus* sp. *Current microbiology* 43:140-143.
- Palma, L., Ruiz de Escudero, I.R., Maeztu, M., Caballero, P., & Muñoz, D. 2013. Screening of *vip* genes from a Spanish *Bacillus thuringiensis* collection and characterization of two Vip3 proteins highly toxic to five lepidopteran crop pests. *Biological Control* 66:141-149.
- Ruiz de Escudero, I., Estela, A., Porcar, M., Martinez, C., Oguiza, J.A., Escriche, B., Ferre, J., & Caballero, P. 2006. Molecular and insecticidal characterization of a Cry1I protein toxic to insects of the families *Noctuidae*, *Tortricidae*, *Plutellidae*, and *Chrysomelidae*. *Applied and Environmental Microbiology* 72:4796-4804.

- Ruiz de Escudero, I., Banyuls, N., Bel, Y., Maeztu, M., Escriche, B., Munoz, D., Caballero, P., & Ferre, J. 2014. A screening of five *Bacillus thuringiensis* Vip3A proteins for their activity against lepidopteran pests. *Journal of Invertebrate Pathology* 117:51-55.
- Sambrook, J., & Russell, D. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York, USA.
- Sanjust, E., Salis, A., Rescigno, A., Curreli, N., & Rinaldi, A. 2004. Note. Xylose production from durum wheat bran: Enzymic versus chemical methods. *Food Science and Technology International* 10:11-14.
- Sattar, S., & Maiti, M.K. 2011. Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* effective against sap-sucking insect pest. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 21:937-946.
- Sena, J.A., Hernández-Rodríguez, C.S., & Ferré, J. 2009. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. *Applied and Environmental Microbiology* 75:2236-2237.
- Smith, R.A., & Couche, G.A. 1991. The Phylloplane as a Source of *Bacillus thuringiensis* Variants. *Applied and Environmental Microbiology* 57:311-315.
- Sneath, P.H.A. 1986. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, William & Wilkins.
- Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., & Van Mellaert, H. 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Applied and Environmental Microbiology* 56:1378-1385.
- Vary, P.S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W.-D., & Jahn, D. 2007. *Bacillus megaterium* from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76:957-967.
- Viebahn, M., Smit, E., Glandorf, D.M., Wernars, K., & Bakker, P.H.M. 2009. Effect of Genetically Modified Bacteria on Ecosystems and Their Potential Benefits for Bioremediation and Biocontrol of Plant Diseases – A Review. Pages 45-69 in: *Climate Change, Intercropping, Pest Control and Beneficial Microorganisms*, E. Lichtfouse, ed. Springer Netherlands.

- Warren, G.W. 1997. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. Taylors & Francis Ltd., London, United Kingdom.
- Yu, C.G., Mullins, M.A., Warren, G.W., Koziel, M.G., & Estruch, J.J. 1997. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Applied and Environmental Microbiology* 63:532-536.
- Zhang, J.T., Yan, J.P., Zheng, D.S., Sun, Y.J., & Yuan, Z.M. 2008. Expression of mel gene improves the UV resistance of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology* 105:151-157.