

UNIVERSIDAD DE GRANADA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



Programa de Doctorado en Biología Fundamental y de Sistemas

TESIS DOCTORAL

Búsqueda de nuevos factores de virulencia en la cepa *Bacillus pumilus* 15.1, una cepa entomopatógena activa frente a la mosca de la fruta del Mediterráneo

> Autor: Alberto Fernández Fernández Directora: Dra. Susana Vílchez Tornero

> > 2022

Búsqueda de nuevos factores de virulencia en la cepa *Bacillus pumilus* 15.1, una cepa entomopatógena activa frente a la mosca de la fruta del Mediterráneo

Memoria presentada por

Alberto Fernández Fernández

Programa de Doctorado en Biología Fundamental y de Sistemas

VºBº de la directora de Tesis

Directora: Dra. Susana Vílchez Tornero

Granada 2022

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales Autor: Alberto Fernández Fernández ISBN: 978-84-1117-679-8 URI: <u>https://hdl.handle.net/10481/80016</u>

El doctorando Alberto Fernández Fernández y la directora de la tesis Susana Vílchez Tornero

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de la directora de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Lugar y fecha

22 de Julio de 2022

Directora de la Tesis

Doctorando

Firma

Firma

i

Contenido

Resumenxi
1. Introducción
1.1. Bacterias entomopatógenas y factores de virulencia
1.1.1. Bacterias entomopatógenas Gram Negativas
1.1.1.1. Género Serratia 4
1.1.1.2. Género Photorhabdus
1.1.1.3. Género Xenorhabdus10
1.1.1.4. Género Yersinia12
1.1.1.5. Género Pseudomonas12
1.1.2. Bacterias entomopatógenas Gram positivas esporulantes
1.1.2.1. Género Clostridium16
1.1.2.2. Género Paenibacillus17
1.1.2.2.1. Paenibacillus larvae19
1.1.2.3. Brevibacillus laterosporus
1.1.2.4. Lysinibacillus sphaericus
1.1.2.5. Bacillus entomopatógenos
1.1.2.5.1. Bacillus cereus
1.1.2.5.2. Bacillus thuringiensis23
1.1.2.5.2.1. Toxinas producidas por <i>B. thuringiensis</i> en la fase vegetativa24
1.1.2.5.2.2. Toxinas producidas por <i>B. thuringiensis</i> como cristales paraesporales
1.2. Ceratitis capitata (Wiedemann) 32
1.2.1. Ciclo de vida
1.2.2. Impacto económico de <i>C. capitata</i>
1.2.3. Control de la plaga
1.2.3.1. Control biológico de C. capitata
1.2.3.1.1. Parasitoides
1.2.3.1.2. Depredadores naturales
1.2.3.1.3. Patógenos40
1.3. Bacillus pumilus
1.4. Bacillus pumilus 15.1

2.	Objetiv	os55
3.	Materiale	s y Métodos 59
	3.1. Me	dios de cultivo y soluciones59
	3.1.1.	Medios de cultivo (por orden alfabético)59
	3.1.2.	Soluciones
	3.1.3.	Dietas para el mantenimiento de insectos 60
	3.2. Cep	bas bacterianas y condiciones de cultivo61
	3.2.1.	Cepas bacterianas
	3.2.2.	Condiciones de cultivo 62
	3.2.3.	Criopreservación de los cultivos bacterianos
	3.2.4.	Aislamiento de cepas bacterianas a partir de muestras de suelo63
	3.2.5.	Preparación de bacterias competentes mediante el método del CaCl2 64
	3.2.6.	Preparación de bacterias susceptibles a la transfección con bacteriófagos
	3.2.7. diluciór	Cuantificación de las unidades formadoras de colonias (CFU) mediante o seriada y siembra en placa
	3.3. Plá:	smidos
	3.3.1.	pUC19
	3.3.2.	pET28a(+)
	3.3.3.	pGEM-T
	3.4. Bac	teriófagos y partículas similares a fagos
	3.4.1. bacteria	Inducción de fagos o partículas similares a fagos a partir de cultivos anos
	3.4.2. Polietile	Precipitación de fagos y partículas similares a fagos mediante englicol (PEG)
	3.4.3. ultrace	Purificación de fagos y partículas similares a fagos mediante ntrifugación
	3.4.4.	Purificación de fagos y partículas similares a fagos mediante gradiente de
	sacaros	a70
	3.4.5. una sot	Estudio de la capacidad de lisis de los fagos mediante ensayo en gota sobre precapa de Top Agarosa
	3.4.6.	Estudio de la capacidad de lisis de los fagos sobre estría
	3.4.7.	Ensayo de adhesión de fagos o PSFs a cepas susceptibles

3.4.8.	Titulación del número de bacteriófagos mediante ensayo en placa 72
3.4.9.	Visualización de fagos o PSFs mediante Microscopía Electrónica de
Transm	isión
3.5. Ais	lamiento, manipulación y análisis de ADN73
3.5.1.	Extracción de ADN total
3.5.2.	Extracción de ADN plasmídico73
3.5.3.	Extracción de ADN plasmídico mediante el método Fenol-cloroformo 74
3.5.4.	Extracción de ADN de bacteriófagos y PSFs
3.5.5.	Determinación de la concentración de ADN75
3.5.6.	Digestión de ADN 75
3.5.7.	Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa
3.5.8.	Desfosforilación del ADN mediante fosfatasa alcalina
3.5.9.	Purificación de fragmentos de ADN76
3.5.10.	Ligación de fragmentos de ADN mediante la enzima T4 ligasa
3.5.11.	Secuenciación del ADN 76
3.5.12.	Transformación de bacterias competentes con ADN plasmídico
median	te choque térmico
3.5.13.	Rastreo de clones positivos después de una transformación bacteriana
3.5.13	8.1. Visualización directa de plásmidos en geles de agarosa o método
"tooth	npick"
3.5.13	8.2. PCR de colonia
3.6. Rea	acción en cadena de la polímerasa (PCR)
3.7. Téo	nicas comunes de obtención, análisis y cuantificación de proteínas 80
3.7.1. poliacri	Preparación de muestras de proteínas para electroforesis en geles de lamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)
3.7.2.	Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE81
3.7.3.	Tinción de geles SDS-PAGE con Azul de Coomassie
3.7.4.	Cuantificación proteica mediante análisis comparativo en gel con una
recta p	atrón
3.7.5.	Cuantificación proteica mediante el método de Bradford 82
3.7.6. TOF MS	Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas (MALDI- 5)

3.7 Am	'.7. (nicon	Concentración de proteínas mediante centrifugación con concentrado	ores . 82
3.7	′.8. I	Diálisis de muestras proteicas en membranas de celulosa	. 83
3.8.	Purif	icación de cristales proteicos paraesporales de <i>B. pumilus</i> 15.1	. 83
3.8 inc	3.1. S ubacić	Solubilización de los cristales paraesporales de B. pumilus 15.1 media ón a bajas temperaturas	nte . 84
3.9.	Obte	nción y purificación de proteínas recombinantes	. 84
3.9 1-t	.1. I iogala	Inducción de la expresión de proteínas recombinantes con Isopropil-	}-D- . 84
3.9).2. I	Lisis bacteriana	. 84
3.9	.3. 9	Solubilización de cuerpos de inclusión	. 85
3.10. <i>pumil</i>	Medi <i>lus</i> 15.	ida de la actividad de la enzima oxalato decarboxilasa producida po 1	r <i>B.</i> . 85
3.1 esp	.0.1. Dectro	Medida de la actividad oxalato descarboxilasa mediante un méto fotométrico	odo . 85
3.1 del (H-	.0.2. l formi ·RMN)	Medida de la actividad oxalato descarboxilasa mediante cuantificac iato por Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógo	ción eno . 86
3.11.	Traba	ajo con insectos	. 87
3.1	.1.1.	Mantenimiento de la colonia de Ceratitis capitata	. 87
3.1	.1.2.	Bioensayos con larvas de <i>C. capitata</i>	. 87
3.12.	Base	s de datos y herramientas bioinformáticas utilizadas	. 88
3.1	.2.1.	PHASTER	. 88
3.1	.2.2.	National Center of Biotechnology Information (NCBI)	. 88
3	.12.2.1	PubMed	. 88
3	.12.2.2	Basic Local Alignment Search Tool (Blast)	. 88
3.1	.2.3.	UniProt	. 89
3.1	.2.4.	Virus Host Database	. 89
3.1	.2.5.	Subtiwiki	. 89
3.1	.2.6.	tRNA-scanSE	. 89
3.1	.2.7.	Gepard 1.41	. 89
3.1	.2.8.	MEGA X	. 90
3.1	.2.9.	EasyFig 2.2.5	. 90
3.1	2.10.	Otros programas/bases de datos utilizados	. 90

4. Resultados
4.1. Capítulo I. Determinación de la actividad enzimática de la proteína OxdD de <i>B. pumilus</i> 15. Clonación del gen <i>oxdD</i> , expresión heteróloga de la proteína OxdD y evaluación de la relación de la proteína Oxalato descarboxilasa con la actividad entomopatógena
Antecedentes
4.1.1. Determinación de la actividad enzimática oxalato descarboxilasa en la proteína OxdD producida por <i>B. pumilus</i> 15.1
4.1.2. Clonación del gen <i>oxdD</i> de <i>B. pumilus</i> 15.1 y expresión de la proteína OxdD en un sistema heterólogo
 4.1.2.1. Localización de la ORF codificante de la oxalato descarboxilasa en el genoma de B. pumilus 15.1 y análisis bioinformático de la región flanqueante a la ORF oxdD
4.1.2.2. Diseño del clonaje101
4.1.2.3. Clonación del gen oxdD en el vector pUC19103
4.1.2.4. Expresión del gen oxdD y producción de la proteína oxalato decarboxilasa de B. pumilus 15.1 en un sistema heterólogo104
4.1.2.5. Solubilización de la enzima oxalato decarboxilasa de B. pumilus 15.1 obtenida en un sistema heterólogo105
4.1.3. Ensayo enzimático de la actividad de la enzima oxalato decarboxilasa recombinante mediante un kit comercial
4.1.4. Evaluación de la relación de oxalato decarboxilasa silvestre y recombinante en la toxicidad de la cepa <i>B. pumilus</i> 15.1 frente a larvas de <i>C. capitata</i>
4.2. Capítulo II. Identificación de potenciales factores de virulencia en el genoma de
B. pumilus 15.1 y evaluación de su toxicidad frente a larvas de C. capitata 112
Antecedentes
4.2.1. Análisis bioinformático de las ORFs <i>eno</i> y <i>groEL</i> de <i>B. pumilus</i> 15.1 y diseño de la estrategia de clonaje para la expresión heteróloga de los mismos
4.2.1.1. Análisis bioinformático de la ORF codificante del gen eno de B. pumilus 15.1 y diseño de la estrategia de clonaje en el vector pET28a de Novagen
4.2.2. Análisis bioinformático de la ORF codificante del gen <i>groEL</i> de <i>B. pumilus</i> 15.1. y diseño de la estrategia de clonaje en el vector pET28a de Novagen 120
4.2.3. Clonaje de las ORFs <i>eno</i> y <i>groEL</i> en pET-28a124
4.2.4. Expresión de los genes <i>eno</i> y <i>groEL</i> y producción de las proteínas Enolasa y GroEL de <i>B. pumilus</i> 15.1 en un sistema heterólogo
4.2.5. Bioensayo de las proteínas Enolasa y GroEL en larvas de <i>C. capitata</i> 128

4.3. Capítulo III. Identificación y análisis bioinformático de una región del genoma
de B. pumilus 15.1 codificante de proteinas de fagos
Antecedentes
4.3.1. Predicción bioinformática e identificación del posible profago en el genoma de <i>B. pumilus</i> 15.1
4.3.2. Estudio de la organización genética de la región de 98.1 Kb identificada por
PHASTER
4.3.2.1. Búsqueda de homología mediante alineamiento de secuencias
4.3.2.2. Predicción de la función de los ORFs en la región de 98.1 Kb identificada por PHASTER
4.3.3. Estudio de la región de 28.7 Kb137
4.3.3.1. Organización de los ORFs de la región de 28.7 Kb
4.3.3.2. Evaluación de la presencia de la región de 28.7 Kb, similar a PBSX, en otros genomas de bacterias del grupo de B. pumilus
4.3.4. Estudio de la región de 60.2 Kb146
4.3.4.1. Organización genómica de la región de 60.2 Kb 149
4.3.4.2. Evaluación de la presencia de la región de 60.2 Kb en las bases de datos/genomas secuenciados153
4.3.4.3. Estudio la posición relativa de la región II de 60.2 Kb con respecto a la región I similar a PBSX en diferentes cepas bacterianas
4.3.4.4. Estudio de los extremos de las regiones homólogas a la región II de 60.2 Kb de B. pumilus 15.1
4.3.4.5. Comparación de las secuencias repetidas directas flanqueantes a las regiones homólogas a la región II de 60.2 Kb
4.3.5. Estudio filogenético de las regiones I y II detectadas en la región de 98.1Kb
4.4. Capítulo IV. Inducción de la producción de partículas relacionadas con fagos a partir de la cepa <i>B. pumilus</i> 15.1 y su caracterización
Antecedentes
4.4.1. Inducción y aislamiento la partícula Bp15.1PLP
4.4.1.1. Obtención de lisados bacterianos a partir de cultivos en condiciones de restricción de oxígeno
4.4.1.2. Escalado del cultivo en condiciones de restricción de oxígeno
4.4.1.3. Inducción de la lisis de un cultivo de B. pumilus 15.1 con Mitomicina C 169
4.4.1.4. Caracterización morfológica de las partículas Bp15.1PLP
4.4.2. Concentración y purificación de las partículas Bp15.1PLP obtenidas a partir de <i>B. pumilus</i> 15.1

4.4.2.1.	Concentración mediante centrifugación y ultracentrifugación174
4.4.2.2.	Concentración mediante precipitación con polietilenglicol (PEG)174
4.4.2.3.	Concentración mediante gradiente de sacarosa174
4.4.2.4.	Comparación de los métodos de concentración utilizados
4.4.3. Co	ntenido de ADN en la cápside de Bp15.1PLP 176
4.4.3.1. clonaje y s	Identificación del ADN empaquetado en la partícula Bp15.1PLP mediante ecuenciación
4.4.3.2. mediante	Estudio del contenido genético en la cápside de la partícula Bp15.1PLP PCR
4.4.4. Ca	racterización proteica de la partícula Bp15.1PLP
4.4.4.1. acrilamida	Comparación de los métodos de concentración mediante geles de
4.4.4.2. partícula d	Reevaluación de los estudios de microscopía electrónica en busca de otra iferente a Bp15.1PLP
4.4.4.3. en la base	Estudio comparativo de la región de 60.2 Kb con las secuencias presentes de datos de virus del NCBI
4.4.5. La	partícula Bp15.1PLP presenta una actividad similar a bacteriocinas.
Caracteriza	ción de dicha actividad189
4.4.5.1. microorga	Estudio de la especificidad de la partícula Bp15.1PLP entre la comunidad de nismos esporulantes
4.4.5.1.3 mediant	 Identificación de los aislados sensibles a las partículas Bp15.1PLP se secuenciación parcial del gen bacteriano ARNr 16S
4.4.5.1.2 activida	 Efecto de la dilución de la suspensión de partículas Bp15.1PLP sobre la d inhibitoria del crecimiento
4.4.5.2.	Estudio de la velocidad de acción de la partícula Bp15.1PLP197
4.4.5.3.	Efecto de la temperatura en la actividad bacteriocina de Bp15.1PLP 198
4.4.6. En	sayos de adhesión 199
4.4.7. Est similares a	udio de la capacidad de otras cepas de <i>B. pumilus</i> de producir partículas BpB15.1PLP
4.4.7.1. cepas de B	Estudio de la Inducción de la lisis mediante con Mitomicina C en otras . pumilus
4.4.7.2. obtenidos	Observación bajo Microscopía Electrónica de Transmisión de PLPs de distintas cepas
4.4.7.3. pumilus m	Estudio de la capacidad de lisis de diferentes PLPs sobre cepas de B. ediante ensayo en gota
4.4.8. Eva primer esta	aluación de la actividad de la partícula Bp15.1PLP frente a larvas de dio de <i>C. capitata</i>
5. Discusión	

5 C	5.1. le <i>B</i> .	Evaluación de la influencia de la enzima oxalato descarboxilasa en la viruler <i>pumilus</i> 15.1	ncia 213
5 1	5.2. 15.1	Evaluación de la influencia de la Enolasa y GroEL en la virulencia de <i>B. pum</i>	<i>ilus</i> 216
5	5.3. evalu	Estudio de la región con alto contenido en genes homólogos a fago ación de su relación con la virulencia de <i>B. pumilus</i> 15.1	os y 220
6.	Cor	nclusiones	233
7.	Bib	liografía	237

Resumen

Resumen

En este trabajo se ha realizado una búsqueda de posibles factores de virulencia que la cepa entomopatógena *Bacillus pumilus* 15.1 puede presentar en su genoma que expliquen su actividad frente la Mosca de la fruta del Mediterráneo *Ceratitis capitata*. Esta cepa, aislada en el año 2010 por nuestro grupo de investigación, presenta un importante valor biotecnológico, y ha sido objeto de estudio desde entonces, por ser activa frente a una de las principales plagas en agricultura a nivel mundial.

Se han clonado varios genes, potenciales factores de virulencia encontrados en el genoma de *B. pumilus* 15.1, con objeto de realizar su expresión heteróloga y permitir la obtención de una alta cantidad de proteína para evaluar su actividad en ensayos de contaminación de dieta con larvas de *C. capitata*.

Así, por ejemplo, se ha clonado el gen de la enzima oxalato descarboxilasa, principal componente de los cristales paraesporales producidos por la cepa *B. pumilus* 15.1 durante la etapa de esporulación. La proteína OxdD recombinante sobreexpresada mostró actividad enzimática, al igual que la enzima nativa, y fue capaz de catalizar la descarboxilación del oxalato hasta formiato. Aunque la enzima no fue tóxica para larvas de *C. capitata*, se demostró que el formiato, producto de la enzima, si provocó un retraso en el desarrollo de las larvas.

El análisis del genoma de *B. pumilus* 15.1 permitió también identificar dos ORFs putativos cuyos productos fueron similares a proteínas con actividad entomopatógena, XnGroEL, de *Xhenorhabdus nematophila* y la proteína Enolasa de *Paenibacillus larvae*. Los genes responsables de la codificación de estas proteínas fueron clonados en vectores de expresión para llevar a cabo la expresión heteróloga de estas proteínas, las cuales fueron bioensayadas para observar su efecto sobre larvas de primer estadio de *C. capitata*.

Además, se llevó a cabo la caracterización de una región del genoma de *B. pumilus* 15.1 con alto contenido de genes homólogos a genes de bacteriófagos. Como consecuencia de esta caracterización se ha podido determinar que *B. pumilus* 15.1 posee en su genoma un fago, Bp15.1Hope, no descrito anteriormente, y una partícula similar a un fago, Bp15.1PLP, que presenta actividad bacteriocina. Ambas partículas se producen en condiciones de estrés para la célula y su morfología y características pueden ser observadas mediante MET. Estas partículas se encontraron codificadas por regiones colindantes en el genoma de *B. pumilus* 15.1, pero son independientes entre sí, y parecen tener un origen distinto. La abundancia de estas partículas en lisados de cultivos de *B. pumilus* 15.1 inducidos con Mitomicina C fue muy diferente. Mientras que la

partícula Bp15.1PLP fue muy abundante en los sobrenadantes de los cultivos lisados, el fago Bp15.1Hope, fue muy escaso.

El material genético presente en las partículas Bp15.1PLP, similar al profago PBSX de *B. subtilis*, fue de un tamaño de 9 Kb, y no correspondió al ADN responsable para la codificación de la partícula, sino que fue ADN bacteriano. Las partículas Bp15.1PLP presentaron además una fuerte actividad bactericida hacia bacterias relacionadas filogenéticamente con *B. pumilus*. Se demostró también que la actividad bactericida fue muy específica y dependiente de la unión de la partícula a la superficie de las bacterias susceptibles.

El efecto de las partículas Bp15.1PLP codificadas por la cepa entomopatógena *B. pumilus* 15.1 sobre las larvas de *C. capitata* fue también analizado en bioensayos de contaminación de dieta. No se encontró relación alguna entre la partícula Bp15.1PLP y la toxicidad frente a este insecto.

Este estudio supone un paso más en la caracterización de la cepa entomopatógena *B. pumilus* 15.1, cuyo principal factor de virulencia responsable de la toxicidad hacia larvas de *C. capitata* continúa siendo desconocido.

Introducción

1. Introducción

1.1. Bacterias entomopatógenas y factores de virulencia

Las bacterias son los organismos vivos más abundantes del planeta. Su distribución, prácticamente ubicua, les ha permitido adaptarse y sobrevivir en ambientes extremos como en el caso de los organismos extremófilos (Rampelotto 2013) y desarrollar una gran variedad de estrategias para su adaptación a una gran variedad de nichos ecológicos (Becking 1961; Sorokin 1973; Dash et al. 2013; Satyaprakash et al. 2017; Lladó et al. 2017).

Existe una gran variedad de bacterias, tanto Gram negativas como Gram positivas cuya forma de vida se encuentra relacionada con los insectos. La mayor parte de estas bacterias se encuentran asociadas al intestino del insecto, donde generalmente presentan una actividad beneficiosa para su huésped (Dillon and Dillon 2004; Feldhaar 2011; Cass et al. 2016). Sin embargo, un pequeño grupo de estas bacterias ha sido capaz de desarrollar estrategias para vivir a expensas de los insectos y se han convertido en entomopatógenas. En general, la patogenicidad de una bacteria está asociada a la capacidad para invadir el hemocele del insecto, hecho que frecuentemente ocurre a través de la membrana peritrófica del intestino, aunque también se puede realizar a través de heridas en la cutícula o con la colaboración de otros organismos, como los nemátodos entomopatógenos (Dunphy and Webster 1988; Charles et al. 2000; García-González and Genersch 2013).

El número de bacterias con actividad entomopatógena descritas hasta el momento no es demasiado elevado, sin embargo, presentan una alta variabilidad taxonómica (Nicolas et al. 1993; Schnepf et al. 1998; Vodovar et al. 2006; Sheets et al. 2011; Grady et al. 2016). Los mecanismos de acción de estas bacterias son muy variados y a menudo son desconocidos, ya que la identificación de los factores de virulencia responsables de la patogenicidad de un organismo es una labor complicada. Pese a la dificultad, es conveniente elucidar esos mecanismos de acción, no solo por aumentar nuestro conocimiento de la naturaleza, sino porque desde un punto de vista práctico puede ayudar al desarrollo de bioinsecticidas para el control de insectos con relevancia en agricultura o salud.

1.1.1. Bacterias entomopatógenas Gram Negativas

Existen en la bibliografía varios ejemplos de bacterias Gram negativas que han desarrollado un estilo de vida entomopatógeno (Glare et al. 1993; Forst and Nealson 1996; Vodovar et al. 2006; Hurst et al. 2011). Muy frecuentemente, la habilidad para

causar patogenicidad a los insectos está relacionada con la producción de proteínas bacterianas con actividad en determinados elementos celulares eucariotas. En muchas ocasiones se necesita realizar un transporte activo de estos factores de virulencia a sitios específicos de la célula diana (McQuade and Stock 2018) bien sea a la superficie de la célula procariota, como algunas toxinas Tc (Silva et al. 2002; Yang et al. 2012b) o hacia el exterior celular, donde ejercen su acción (Brillard et al. 2002; Daborn et al. 2002; Cowles and Goodrich-Blair 2004; Yang et al. 2012a; Schriefer et al. 2013).

En función de las células diana que estos factores de virulencia utilizan, se pueden dividir en tres grupos, neurotoxinas, toxinas digestivas y citotoxinas. Los miembros de la familia *Enterobacteraceae* producen toxinas con toxicidad oral similares a las toxinas de *Bacillus thuringiensis*, aunque están mucho menos caracterizadas por el momento (Castagnola and Stock 2014).

Algunas de estas toxinas o factores de virulencia identificados en bacterias Gramnegativas poseen genes homólogos en los genomas de otras especies de bacterias entomopatógenas. Sin embargo, otras se encuentran localizadas en grandes plásmidos, o cercanas a regiones con actividad de transposición y elementos con similitud a fagos. Estas observaciones dejan abierta la posibilidad de que los genes relacionados con la toxicidad podrían estar expuestos a cierto nivel de transferencia horizontal inter e intraespecífica (Waterfield et al. 2002; Castagnola and Stock 2014).

A continuación, se enumeran algunos de los géneros de bacterias Gram negativas entomopatógenas más importantes, junto a los principales factores de virulencia responsables de la toxicidad.

1.1.1.1. Género Serratia

Serratia entomophila y Serratia proteamaculans son bacterias de vida libre, agentes causales de la enfermedad ámbar de la oruga de la hierba de Nueva Zelanda, *Costelytra zealandica* (Coleoptera: *Scarabaeidae*) (Trought et al. 1982). Esta enfermedad, que afecta a las larvas de este insecto, recibe su nombre debido al cambio de color observado en las larvas, las cuales se tornan de color ámbar y dejan de alimentarse pasadas 48 h desde la infección con la bacteria (Trought et al. 1982; Grimont et al. 1988; Klein and Kaya 1995). La pérdida de actividad alimenticia provoca una pérdida gradual de peso, hasta desembocar en la muerte del insecto, 4-6 semanas después de la infección, cuando se produce la invasión del hemocele (Grimont et al. 1988).

Se ha observado que la actividad entomopatógena de estas especies está relacionada con la presencia de un plásmido de 153 Kb denominado Plásmido Asociado a la Enfermedad Ámbar o pADAP (del inglés <u>Amber Disease Associated Plasmid</u>) (Glare et al. 1993; Hurst et al. 2000). Este plásmido presenta dos regiones relacionadas con el

desarrollo de la enfermedad, i) la región *sep*, asociada a la virulencia, compuesta por tres genes *sepABC* (Hurst et al. 2000; Dodd et al. 2006; Hurst et al. 2007b) y ii) la región AFP, relacionada con el cese de la alimentación de las larvas (Hurst et al. 2004; Hurst et al. 2007a; Heymann et al. 2013).

La elevada identidad de los genes *sepABC* de *Serratia* con los genes *tcYF1* y *tcYF2* de *Yersinia frederiksensii*, así como su localización en un plásmido de gran tamaño, parecen indicar que estos factores de virulencia podrían estar formando parte de una región móvil de transferencia horizontal de genes (Dodd et al. 2006).

Los genes *sep* están relacionados con el aclaramiento producido en el intestino de las larvas y con el cambio en la coloración de estas hasta el tono ámbar característico de la enfermedad (Hurst et al. 2000; Hurst et al. 2007b). Las proteínas codificadas por los genes *sep* son miembros de la familia de toxinas insecticidas Tc, encontradas en los genomas de algunas bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y que actúan de manera conjunta para llevar a cabo la enfermedad inyectando enzimas citotóxicas en el interior de las células diana mediante un mecanismo tipo jeringa (Hurst et al. 2007b; Gatsogiannis et al. 2018; Roderer et al. 2019).

La segunda región, denominada AFP de <u>Antifeeding Prophage</u>, está relacionada con el cese en la alimentación observado en las larvas(Hurst et al. 2004; Hurst et al. 2007a). Esta región del plásmido pADAP, está formada por un clúster de 18 ORFs los cuales codifican proteínas relacionadas con proteínas presentes en la cola de los fagos T4 y P2 (Hurst et al. 2004). La región AFP es la responsable de codificar una estructura similar a una cola de un fago (**Figura 1**), que a su vez recuerda a las piocinas tipo R de *Pseudomonas aeruginosa* (Michel-Briand and Baysse 2002) y al sistema de secreción tipo VI, los cuales también presentan un origen común con los bacteriófagos (Bönemann et al. 2010; Veesler and Cambillau 2011). La función de AFP parece estar asociada con el transporte de toxinas efectoras hasta el interior de las células eucariotas. Este mecanismo está mediado por el reconocimiento de receptores específicos que son reconocidos por la estructura AFP. La unión específica de AFP con el receptor desencadena la contracción de la estructura y la inyección de los efectores hasta el interior de las células de AFP con el receptor desencadena la contracción de la estructura y la inyección de los efectores hasta el interior de la célula diana (Hurst et al. 2004; Heymann et al. 2013).



Figura 1. Imágenes de Microscopía de la partícula AFP codificada por la región *antifeeding* del plásmido pADAP de *Serratia*. A la izquierda (Panel A) se presenta una Criomicroscopia Electrónica, obtenida de Heyman et al 2013, donde se puede observar una estructura similar a una cola de fago, con un ensanchamiento en uno de los extremos, que recuerda a una placa basal de una cola de fago (subpanel D). A la derecha (Panel B) se muestra una imagen de Microscopía Electrónica de Transmisión, tomada de Hurst et al., 2004, en donde se observan dos conformaciones diferentes de la partícula AFP, una conformación extendida (subpaneles d y e) y una conformación contraída (subpaneles a y b). (Hurst et al. 2004; Heymann et al. 2013)

En la región de 18 ORFs, los primeros 16 ORFs codifican la estructura AFP, mientras que los 2 últimos ORFs codifican las toxinas que son transportadas por esta estructura macromolecular hasta el interior celular, donde tiene lugar su acción (Hurst et al. 2007a; Heymann et al. 2013).

Otra bacteria del género *Serratia, Serratia marcescens* ha demostrado presentar actividad patógena frente a un gran rango de animales y plantas, incluidos insectos. Esta bacteria parece secretar una elevada cantidad de enzimas extracelulares, las cuales están relacionadas con la actividad patógena. Cabe mencionar la metaloproteasa Serralisina, identificada por su capacidad anti cicatrizante en las larvas de *Bombyx mori* (Ishii et al. 2014b) parece presentar funciones inhibitorias del sistema inmune de los insectos, reduciendo la capacidad de adhesión de los hemocitos libres del hemocele del insecto debido a la degradación de BmSPH-1, un factor relacionado con la respuesta inmune celular que ayuda a la adhesión de los hemocitos a la superficie del tejido (Ishii et al. 2014a). *S. marcescens* es conocida además por la secreción de quitinasas como la quitinasa CBP21 y otras metaloproteasas que también juegan un papel importante en la patogenicidad de esta cepa (Vaaje-Kolstad et al. 2005; Tambong et al. 2014).

1.1.1.2. Género Photorhabdus

Las bacterias del género *Photorhabdus*, el cual incluye las especies *Photorhabdus temperata*, *Photorhabdus luminescens* y *Photorhabdus asymbiotica*, son bacterias entomopatógenas de amplio espectro pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (Boemare et al. 1993), las cuales viven asociadas a nematodos entomopatógenos específicos de la familia *Heterorhabditidae* (Boemare et al. 1993; Forst and Nealson 1996; Gerrard et al. 2006). Estas bacterias son incapaces de sobrevivir en el suelo de manera independiente, aunque *P. asymbiotica* se ha encontrado asociada a heridas de pacientes humanos, sin la asociación de ningún nemátodo (Gerrard et al. 2006). La interacción nemátodo-bacteria es altamente restrictiva siendo específica de la especie (Hurst et al. 2015).

Se trata de bacterias Gram negativas motiles, cuyo ciclo de vida comprende un estado simbionte en el intestino del nemátodo y un estado virulento, en el interior de la larva del insecto, gracias al transporte asistido realizado por el nemátodo. Una vez en el interior del hemocele del insecto, *Photorhabdus* expresa una gran batería de factores de virulencia que provocan la muerte del insecto (Waterfield et al. 2001; Daborn et al. 2002; Duchaud et al. 2003; Yang et al. 2006; ffrench-Constant et al. 2007; Yang et al. 2012a).

La secuenciación del genoma de la bacteria *P. luminescens* TT01 ha permitido determinar que la bacteria presentaba multitud de islas de patogenicidad en su genoma, con una gran abundancia de genes relacionados con la toxicidad de la cepa (Duchaud et al. 2003). Los principales factores de virulencia caracterizados hasta el momento incluyen las toxinas Mcf (Daborn et al. 2002), las toxinas Tc (Bowen et al. 1998; Bowen et al. 2000; Waterfield et al. 2001) y las toxinas Pir (ffrench-Constant et al. 2007).

Las toxinas Mcf, están codificadas por los genes *mcf1* y *mcf2*, y son denominadas así por las siglas en inglés <u>Make Caterpillars Floppy</u>. Estas toxinas, provocan una peculiar sintomatología, caracterizada por la pérdida de la turgencia debido al elevado daño tisular producido por ellas. Las toxinas Mcf parecen afectar a la reorganización de los filamentos de actina del citoesqueleto e inducen la apoptosis de los hemocitos y las células epiteliales del insecto, así como de células de mamíferos (Daborn et al. 2002; Dowling et al. 2004).

Las toxinas Tc son un complejo multiproteico que presentan toxicidad oral frente a una gran variedad de insectos. Pese a que *P. luminescens* es liberada directamente en el hemocele del insecto por su nemátodo huésped y por tanto no necesita pasar por el intestino de los insectos (Gerrard et al. 2006; Pinheiro and Ellar 2007; Nielsen-LeRoux et al. 2012)actividad entomopatógena cuando es ingerido, concretamente en la región del lumen del intestino medio de los insectos (Waterfield et al. 2001; Lang et al. 2010).

El complejo Tc transporta la enzima toxica ADP-ribosiltransfersa al interior de las células del insecto mediante un sistema similar a una jeringa donde esta realiza su acción tóxica modificando los filamentos de actina, lo que provoca su agregación y la muerte celular (Lang et al. 2010) (**Figura 2**). El complejo está compuesto por tres subunidades, TcA que forma el canal de translocación, y TcB-TcC, que forma un heterodímero que protege al factor de virulencia. La unión del heterodímero al canal provoca su apertura y la traslocación de la toxina ADP-ribosiltransferasa (Meusch et al. 2014; Gatsogiannis et al. 2018).



Figura 2. Estructura y modo de acción del complejo Tc. Panel A. Reconstrucción 3D esquemática de la estructura de la holotoxina Tc. (TcA (coloreada por subunidades), TcB (coloreada de azul) y TcC (coloreada de morado). Panel B. Representación esquemática del mecanismo de acción del complejo Tc. La unión del heterodímero TcB-TcC produce la apertura del canal y la translocación de la toxina ADP-ribosiltransferasa a través del canal de transducción de TcA. Tomada de Gatsogiannis et al., 2018.

Las toxinas Pir (del ingés <u>Photorhabdus insect related protein</u>) han sido identificadas también por presentar tanto actividad toxica oral como en el hemocele del insecto (Duchaud et al. 2003). Las toxinas Pir están compuestas por dos ORFs que actúan de manera conjunta *pirA* y *pirB*, siendo necesaria la presencia de ambas para que se produzca la toxicidad oral sobre las larvas de *Galleria mellonella* (Waterfield et al. 2005b). La toxina PirB presenta homología con una neurotoxina denominada leptinotarsina, que provoca una desregulación de los flujos de Ca²⁺ en la célula, provocando la liberación de neurotransmisores en los terminales nerviosos presinápticos (Crosland et al. 2005). Otro hecho interesante es que además de la

homología observada con la neurotoxina leptinotarsina, la proteína PirB es homóloga al dominio de formación del poro de las toxinas Cry, un conocido factor de virulencia de *B. thuringiensis* (Li et al. 1991; Vachon et al. 2012). Esto podría significar que el modo de acción de esta neurotoxina podría ser la formación de poros por los que se libera el Ca²⁺, en lugar de llevarse a cabo por canales presentes en el sistema nervioso (ffrench-Constant et al. 2007).

Otras proteínas identificadas en el genoma de *Photorhabdus* como la proteína Txp40, o las hemolisinas PhIA y PhIB, las cuales son secretadas por un sistema de secreción TPS podrían estar relacionadas con una actividad citolítica de los hemocitos del insecto cuando la bacteria alcanza la hemolinfa (Brillard et al. 2002). Otras toxinas citolíticas, proteasas, metaloproteasas y lipasas de la familia RTX, similares a las toxinas encontradas en *Vibrio cholerae* (Fullner and Mekalanos 2000), completarían el amplio arsenal de estas bacterias para llevar a cabo su actividad entomopatógena frente a una gran variedad de insectos (Duchaud et al. 2003). La secreción de estas enzimas al exterior bacteriano promueve la degradación de los tejidos del insecto y proporciona nutrientes tanto para la bacteria, como para el desarrollo del nemátodo simbionte, el cual precisa para su desarrollo de factores de crecimientos específicos secretados por la bacteria (Forst and Nealson 1996).

Además, *Photorhabdus* también codifica una gran cantidad de antibióticos y otras moléculas con actividad antimicrobiana para prevenir el desarrollo de competidores, facilitando el desarrollo del nemátodo y evitando la putrefacción del insecto (Akhurst 1982; Sharma et al. 2002; Duchaud et al. 2003).

Se ha descrito que *Photorhabdus* presenta genes ortólogos a los genes codificantes del sistema *antifeeding* de *S. entomophila* mencionado con anterioridad (Hurst et al. 2007a; Heymann et al. 2013), denominados en esta bacteria PVC, del inglés <u>Photorhabdus</u> <u>Virulence Cassette</u> (Yang et al. 2006). El producto de la expresión de este *cassette* es, como en *Serratia*, una estructura similar a piocinas tipo R que carecen de actividad bactericida, pero con una intensa actividad frente a los hemocitos de los insectos (Yang et al. 2006; Wang et al. 2022).

Al igual que en *Serratia*, la región PVC presenta una región conservada similar a fagos con una región variable formada por diferentes moléculas efectoras, que son las que presentan la actividad frente a los insectos. La secuenciación del genoma de varias cepas de *Photorhabdus* ha permitido observar cómo existen varias copias de este *loci* similar a fagos en una misma cepa bacteriana, los cuales se diferencian entre sí por la proteína efectora acompañante (Waterfield et al. 2004; Yang et al. 2006).

Cuatro efectores diferentes, Plu1690, Pnf, RRSPPa y SepC-like, se han asociado a esta partícula y se ha demostrado que poseen citotoxicidad hacia células eucariotas (Geller et al. 2021).

1.1.1.3. Género Xenorhabdus

De un modo similar a *Photorhabdus,* las bacterias del género *Xenorhabdus,* pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae,* son bacterias asociadas a nemátodos entomopatógenos, en este caso a la familia *Steinernematidae* (Forst and Nealson 1996). El ciclo de vida de este género de bacterias es muy similar al mencionado con anterioridad, siendo la principal diferencia que estas bacterias se encuentran en vesículas especializadas formadas en el intestino del nematodo huésped (Bird and Akhurst 1983).

Para sobrevivir en el hemocele del insecto, *Xenorhabdus* debe tolerar o evadir el sistema inmune antes de desarrollar su acción entomopatógena. Para llevar a cabo esta evasión del sistema inmune, *Xenorhabdus* es capaz de producir la lisis de los hemocitos, provocada por la liberación del LPS bacteriano a la hemolinfa. Este LPS ha demostrado poseer la capacidad para unirse a los hemocitos y provocar su muerte, pudiendo presentar un papel fundamental en la patogenicidad de esta bacteria (Dunphy and Webster 1988; Dunphy 1994).

Al igual que en *Photorhabdus*, el complejo de toxinas Tc es el principal factor de virulencia de *Xenorhabdus* para el desarrollo de su patogenicidad (Sheets et al. 2011), donde los componentes son denominados XptA2, XptB1 y XptC1. El funcionamiento de este complejo proteico parece ser equivalente al demostrado en las toxinas Tc de *Photorhabdus*, donde la molécula efectora es introducida en el interior de la célula diana gracias a la acción conjunta del resto de componentes XptA2 y XptB1 (Lang et al. 2010; Sheets et al. 2011).

Esta bacteria, además, produce una gran cantidad de proteínas extracelulares como proteasas, quitinasas y otras toxinas que se encargan de llevar a cabo la degradación de los tejidos, la lisis de las células del sistema inmune del insecto y afectan a las células del epitelio intestinal (Brillard et al. 2001; Caldas et al. 2002; Cowles and Goodrich-Blair 2004) la liberación de vesículas de membrana (OMVs) que presentan proteínas con actividad quitinasa, relacionadas con la actividad citotóxica observada en larvas de *H. armígera* (Khandelwal and Banerjee-Bhatnagar 2003).

Alguna de las toxinas asociadas a las OMVs y que han demostrado actividad citotóxica son las pilinas (Khndelwas et al., 2004), proteínas fibrosas de pequeño tamaño (17 KDa) que se encuentran en los pili y fimbrias bacterianas (Khandelwal et al. 2004). Las proteínas de las fimbrias han mostrado mediar el reconocimiento y la interacción de ciertos patógenos bacterianos y son considerados como importantes factores de virulencia (Gaastra and de Graaf 1982). Otra proteína estructural de las fimbrias de *X. nematophila* (MrxA) presenta actividad citotóxica mediante la formación de poros a través de membrana (Banerjee et al. 2006).

La actividad de diferentes hemolisinas, como la proteína XhlA, presenta un papel importante en la toxicidad de esta bacteria. La proteína XhlA, asociada a la superficie celular, presenta una actividad lítica frente a los dos tipos principales de células del sistema inmune de los insectos, los granulocitos y los plasmatocitos, facilitándose así la evasión del sistema inmune frente a la bacteria (Brillard et al. 2001; Cowles and Goodrich-Blair 2004).

Otra toxina utilizada por *Xenorhabdus nematophila* denominada A24tox, presenta similitud con la toxina Txp40 de *Photorhabdus* (Brown et al. 2004). Se trata de dos proteínas similares entre sí pero que no cuentan con homólogos fuera de este grupo de bacterias. La toxina Txp40 parece producir una disminución significativa de la adhesión intercelular del intestino medio, la degradación de la matriz peritrófica que recubre las células del intestino medio y la degradación de los núcleos del cuerpo graso, lo que parece ser similar al daño producido por *B. thuringiensis* en ciertos insectos (Brown et al. 2006).

Las bacterias del género *Xenorhabdus,* también producen una amplia variedad de proteínas con actividad antibacteriana que les permiten evitar el desarrollo de posibles competidores una vez se produce la muerte del insecto. Entre estas moléculas destaca el operon xenocina. Este está constituido por dos genes, *xciA* y *xciB*, los cuales codifican dos proteínas diferentes. Una proteína secretada y que presenta actividad bactericida con actividad ARNasa, conocida como xenocina y otra proteína, que constituye una proteína periplásmica de inmunidad, la cual protege a la bacteria del efecto de su propia xenocina (Singh et al. 2013) . Por lo tanto, este operón constituye un sistema toxina-antitoxina. Estas proteínas son secretadas a través del sistema flagelar tipo III y presentan un importante papel en el éxito de esta bacteria frente a sus competidores (Singh and Banerjee 2008; Singh et al. 2013)

Por último, se ha identificado una proteína de 57 KDa con actividad entomopatógena denominada HIP57, la cual es homóloga a la chaperona de *E. coli* GroEL (Joshi et al. 2008). La inyección de esta proteína en larvas de *G. mellonella*, provoca tras 15 min, un cambio en la pigmentación de la larva hacia un color negro, provocando su muerte (dependiente de la concentración) a los dos días de la inyección (Yoshida et al. 2001; Yang et al. 2012b). Aunque anteriormente ya se había identificado otra proteína GroEL con actividad entomopatógena, esta fue aislada a partir de la bacteria *Enterobacter aerogenes*, la cual vive asociada a las larvas de insectos de la familia *Myrmeleontidae*,

las cuales son depredadoras de multitud de insectos de los cuales se alimentan tras producir su parálisis gracias a toxinas procedentes de la bacteria endosimbionte (Yoshida et al. 2001).

1.1.1.4. Género Yersinia

El género *Yersinia* está compuesto por bacterias anaerobias facultativas pertenecientes a la familia *Yersiniaceae*, ampliamente conocidas por su patogenicidad frente a humanos, principalmente causada por las especies *Yersinia pestis, Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis* (Hubbert et al. 1971; Perry and Fetherston 1997; Bottone 1999).

Algunas especies de este género, sin embargo, han demostrado actividad entomopatógena frente a algunos lepidópteros y coleópteros, siendo el principal factor de virulencia identificado en este género proteínas homólogas a las toxinas Tc, las cuales se encuentran habitualmente en islas de patogenicidad en el genoma de estas bacterias (Bresolin et al. 2006; Pinheiro and Ellar 2007; Spanier et al. 2010; Hurst et al. 2011). Estudios sobre cepas de *Y. enterocolitica* han demostrado como la expresión de este clúster de genes se encuentra regulada por la temperatura, observándose expresión de las toxinas Tc cuando los cultivos se llevan a cabo a bajas temperaturas (Bresolin et al. 2013).

Sin embargo, estudios de cepas que carecían de estos genes insecticidas demostraron actividad entomopatógena cuando fueron inyectados en larvas de *G. mellonella*, lo cual indica la presencia de determinantes insecticidas desconocidas en estas cepas bacterianas (Fuchs et al. 2008).

La toxina YacT, que presenta cierta similitud con una enterotoxina de *Aeromonas hydrophila*, parece estar relacionada con la toxicidad observada en algunas cepas de *Yersinia* sobre *G. mellonella*. Esta toxina muestra actividad cuando es inyectada en el interior del hemocele del insecto, observándose cómo provoca cambios en la morfología de los hemocitos. La deleción del gen *yact* en una cepa de *Yersinia frederiksenii* provoca un descenso en la mortalidad observada en esta cepa (Springer et al. 2018), lo que implica que YacT es un factor de virulencia.

1.1.1.5. Género Pseudomonas

Por último, el género *Pseudomonas,* pertenecientes a la familia *Pseudomonadaceae,* contiene especies que forman parte de la rizosfera de algunas plantas (Bolwerk et al. 2007; Zboralski and Filion 2020). Esta asociación llevada a cabo por la bacteria precisa de diferentes mecanismos que permiten a esta instalarse y colonizar de manera efectiva un ambiente de gran competencia como es la rizosfera de las plantas. Entre estos mecanismos destacan la quimiotaxis, la capacidad de formar biofilms o la evasión del

sistema inmune de las plantas (de Weert et al. 2002; Danhorn and Fuqua 2007; Zamioudis and Pieterse 2012; Oku et al. 2014; Zboralski and Filion 2020). Algunas de estas especies, como *Pseudomonas protegens, P. fluorescens* y *P. chlororaphis* han demostrado proporcionar protección frente a la infección de determinadas bacterias patógenas de vegetales como *Streptomyces scabies* o *Pseudomonas syringae* y hongos patógenos del género *Fusarium, Gaeumannomyces* o *Rhizoctonia,* causantes de enfermedades que ocasionan la pudrición de las raíces e importantes pérdidas sobre los cultivos tanto en invernaderos o campo abierto (Biessy and Filion 2018; Zboralski and Filion 2020; Castro Tapia et al. 2020). El desarrollo de la protección viene determinado por la inducción del sistema de resistencia sistémica de la planta y la competición interespecífica por los recursos y principalmente mediante la liberación de compuestos tóxicos para estos hongos y bacterias, por lo que estas bacterias actuarían como antagonistas de los organismos patógenos (Haas and Défago 2005; Bolwerk et al. 2007; Lugtenberg 2015; Sosa et al. 2020).

Entre estas especies se ha descrito como determinadas cepas de *Pseudomona* muestran toxicidad frente a *Drosophila* y ciertos nemátodos tras su ingestión, como ocurre con *P. entomophila*, la cual produce mortalidad sobre larvas y adultos de *Drosophila* tras su ingestión (Vodovar et al. 2005; Vodovar et al. 2006). La actividad entomopatógena observada en esta cepa parece estar asociada a una toxina relacionada con las toxinas Tc de *Photorhabdus* codificada en el genoma de esta bacteria (Duchaud et al. 2003; Vodovar et al. 2006).

Otras especies de *Pseudomonas* asociadas a plantas como *P. protegens*, (anteriormente pertenecientes a la especie *P. fluorescens*) han sido identificadas por su acción insecticida frente a *M. sexta* y *G. mellonella* (Péchy-Tarr et al. 2008). Esta acción entomopatógena ha sido asociada a la presencia en su genoma de una toxina relacionada con la toxina Mcf1 de *P. luminescens* (ffrench-Constant et al. 2007). Esta nueva toxina recibió el nombre de Fit, del inglés *P. fluorescens Insectidal Toxin* (Péchy-Tarr et al. 2008). El análisis de la secuencia de esta toxina ha demostrado que forma parte de un clúster conservado en otras dos cepas de *P. fluorescens*, las cepas CHAO y Pf-5 que presentan actividad entomopatógena tras su inyección en larvas de *Manduca sexta* y *Galleria*. Este clúster está formado por 7 ORFs además del responsable de la síntesis de la toxina con funciones de transporte y regulación de la producción de la toxina (Péchy-Tarr et al. 2008).

El estudio de la cepa Pf-5 permitió identificar una gran variedad de exoenzimas como quitinasas, la pesticina (un homólogo de las lisozimas de los fagos que presenta actividad bactericida (Patzer et al. 2012)) y otros productos con capacidad antimicrobiana que fueron responsables de la toxicidad observada en esta cepa (Loper et al. 2016; Ruiu and Mura 2021). La cepa Pf-5, pese a presentar la toxina fluorescente FitD, esta no es la

principal responsable de la toxicidad mostrada por la cepa frente a *D. melanogaster,* ya que cepas que con este gen deleccionado presentaron toxicidad frente a larvas de este insecto mediante ensayos de contaminación de dieta (Loper et al. 2016; Ruiu and Mura 2021). Esto implicaría la presencia de otros factores determinantes en la toxicidad mostrada por esta cepa. Sin embargo, la toxina fluorescente FitD sí que mostró ser esencial para la patogenicidad observada frente a larvas de lepidópteros en la cepa CHAO (Ruffner et al. 2013).

Pseudomonas entomophila presenta una elevada actividad entomopatógena, destruyendo las células del intestino de *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) (Vodovar et al. 2005; Vodovar et al. 2006). La virulencia de esta cepa deriva en gran medida de la toxina monalisina. Esta toxina, con estructura de barril β , es capaz de formar poros en las membranas celulares que provocan daños en el tejido de *Drosophila*, induciendo necrosis y muerte celular (Vesala et al. 2020). La virulencia observada en *P. entomophila* y por tanto la toxina monalisina está regulada por el sistema de dos componentes GacS/GacA (Vodovar et al. 2005). Este sistema también regula la producción de exoenzimas como las quitinasas y proteasas alcalinas, potencialmente relacionadas con el daño tisular producido por esta cepa.

El estudio del genoma de *P. entomophila* permitió observar cómo esta codifica, además, tres genes similares a las toxinas Tc, varios genes con posible acción hemolisina, que podrían estar relacionados con la patogénesis, varias lipasas, cuatro proteasas y una proteína con similitud a las toxinas RTX (de <u>Repeats-In-Toxin</u>) de Vibrio cholerae. Esta toxina pertenece a la familia de toxinas ADP ribosiltransferasas que actúan alterando el citoesqueleto de actina, tal y como ocurre con las toxinas Tc de *Photorhabdus* (Fullner and Mekalanos 2000; Vodovar et al. 2006).

1.1.2. Bacterias entomopatógenas Gram positivas esporulantes

Las bacterias entomopatógenas Gram positivas forman el grupo de bacterias entomopatógenas más estudiado. Este grupo de bacterias ha recibido una importante atención debido a su utilidad a la hora de llevar a cabo el control de insectos plagas y vectores de enfermedades humanas (Nicolas et al. 1993; Toledo et al. 1999; de Maagd et al. 2003; de Oliveira et al. 2004; Perchat et al. 2005; DasGupta et al. 2006; Antúnez et al. 2010; Berry 2012). Su capacidad para la formación de endoesporas (**Figura 3**), estructuras de resistencia frente a los factores externos, es un importante elemento que facilita en gran medida la formulación de los productos a nivel comercial, así como su traslado y almacenaje.

Debido a esto, la mayor parte de las toxinas insecticidas utilizadas en agricultura son predominantemente de este grupo, el cual incluye a especies como *B. thuringiensis, Bacillus cereus, Lysinibacillus sphaericus o Paenibacillus larvae* (Aronson et al. 1986; de Bortoli and Jurat-Fuentes 2019). Este grupo de bacterias, anteriormente unificado dentro del género *Bacillus,* está separado en la actualidad en varios géneros independientes, basándose en análisis moleculares (de Maagd et al. 2003).



Figura 3. Imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión de algunas endosporas de organismos Gram positivos como *Lysinibacillus sphaericus* (A), *B. thuringiensis* (B) y *Clostridium cochelarium* (C). En las bacterias entomopatógenas Gram positivas es común la formación de cristales paraesporales durante el proceso de esporulación, cristales que generalmente se encuentran asociados a la actividad entomopatógena. En la imagen pueden observarse diferentes cristales paraesporales marcados con

flechas en las imágenes A y C y mediante una C en la imagen B. Las imágenes fueron tomadas a partir de Berry, 2012 (A) Swiecicka et al., 2008 (B) y Pope et al., 1968 (C).

A continuación, se describen algunos de los géneros de bacterias Gram positivas entomopatógenas más importantes, junto a los principales factores de virulencia responsables de la toxicidad, siendo en muchos casos proteínas asociadas a inclusiones paraesporales similares a las producidas por *B. thuringiensis*.

1.1.2.1. Género Clostridium

Las especies pertenecientes a este género son bacterias Gram positivas anaerobias y esporulantes. Las especies más estudiadas de este género son *Clostridim botulinum, Clostridium perfringens* y *Clostridium tetani,* todos ellos patógenos de humanos causantes del botulismo, la gangrena gaseosa y el tétanos respectivamente (Petit et al. 1999; Mallick and Winslet 2004; Lund and Peck 2013). Sin embargo, algunas especies de este género han sido identificadas por su actividad patógena frente a diferentes insectos (Bucher 1961; Pope et al. 1968; Nicolas et al. 1993; Kay et al. 2019).

La primera referencia de una bacteria perteneciente al género *Clostridium* con actividad entomopatógena data de 1961, cuando dos especies del género *Clostridium, Clostridium brevifaciens* y *Clostridium malacosomae* fueron aisladas como responsables de producir braquitosis en las orugas de la tienda (*tent caterpillars*) del género Malacosoma, aunque el mecanismo de acción de estas cepas es desconocido (Bucher 1957; Bucher 1961).

Las bacterias entomopatógenas de este género, al igual que las del género *Bacillus* producen toxinas proteicas binarias que son activadas mediante la acción de proteasas y producen su efecto patógeno mediante su acción conjunta (Barth et al. 2004). Estas bacterias infectan insectos sanos y se multiplican únicamente en el intestino, sin producir la invasión del hemocele (Aronson et al. 1986).

En 1990 J.F. Charles et al., describieron una cepa de *Clostridium bifermentans* serovar *malasya*, la cual mostró una elevada toxicidad frente a larvas de mosquito de *Anopheles stephensis*. La toxicidad se relacionó posteriormente con tres proteínas, presentes en el sobrenadante de los cultivos esporulados, de tamaños 16, 18 y 66 KDa, y denominadas por tanto como P66, P18 y P16 (Nicolas et al. 1993; Barloy et al. 1998). Estudios posteriores identificaron la proteína P66 como una proteína con similitud con las delta-endotoxinas de *B. thuringiensis*. La expresión heteróloga de esta proteína mostró actividad frente a larvas de diferentes mosquitos (Barloy et al. 1996). Estudios posteriores permitieron identificar esta supuesta proteína de 66 KDa como dos toxinas diferentes las cuales fueron renombradas como Cry16A, Cry17A, mientras que las

proteínas de pequeño tamaño (16 y 18 kDa) fueron asociadas a proteínas con función de hemolisinas, demostrándose que todas ellas son necesarias para producir el efecto tóxico frente a mosquitos de Aedes (Qureshi et al. 2014).

Clostridium perfringens produce una de estas toxinas binarias denominada iota, la cual está formada por un componente enzimático (Ia) que cataliza la unión de ADP-ribosa al residuo Arg 177 de la cadena de G-actina, provocando la despolimerización del citoesqueleto y un componente de unión (Ib), cuyo dominio C terminal presenta homología con la toxina VIP2 de *B. cereus* (Tsuge et al. 2003; Sakurai et al. 2009).

Esta especie, de gran importancia en la industria alimentaria, ha demostrado presentar toxicidad frente a *G. mellonella* (utilizada como modelo de virulencia). Los bioensayos llevados a cabo mediante la inyección del cultivo completo, así como del sobrenadante del cultivo, han demostrado que el sobrenadante presenta proteínas capaces de producir toxicidad frente a las larvas (Kay et al. 2019).

1.1.2.2. Género Paenibacillus

Varias especies del género *Paenibacillus* han mostrado tener una actividad importante frente a larvas de insectos plagas como escarabajos y lepidópteros (Zhang et al. 1997; Yokoyama et al. 2004; Sharma et al. 2013; Ruiu 2013; García-González and Genersch 2013; Neung et al. 2014; Weselowski et al. 2016).

Algunos de los factores de virulencia presentes en las especies de este género son quitinasas, como la identificada en la cepa *Paenibacillus sp.* D1 (Singh et al. 2016). Estas enzimas provocan la degradación de la quitina del insecto y provocan daños en las paredes del intestino, facilitando el paso de las células vegetativas de la bacteria hacia el hemocele (Mubarik et al. 2010; Gohel et al. 2016). Otras enzimas, como las proteasas también han sido propuestas como factores de virulencia frente a insectos (Neung et al. 2014).

Por último, al igual que en otros géneros de bacterias entomopatógenas, *Paenibacillus* produce una gran variedad de sustancias antimicrobianas las cuales forman parte del secretoma de la bacteria, entre las que destacan los péptidos antimicrobianos mediante los cuales estas bacterias limitan el crecimiento de sus competidores. Estos compuestos incluyen péptidos, enzimas y compuestos orgánicos volátiles (VOCs) (Grady et al. 2016).

Estos péptidos antimicrobianos se dividen en bacteriocinas de síntesis ribosomal, como la paenibacillina (Huang and Yousef 2015), y péptidos no sintetizados ribosomalmente, como la saltavalina, la jolipeptina y la tridecaptina (Cochrane and Vederas 2016). Además, *Paenibacillus* secreta antibióticos como las polimixinas, con una fuerte

actividad frente a bacterias Gram negativas, llevando a cabo su actividad mediante la unión al LPS y desorganizando la membrana externa de bacterias susceptibles. *Paenibacillus larvae* sintetiza varios de estos compuestos antimicrobianos, la paenilimicina, un antimicrobiano para eliminar los competidores bacterianos (Müller et al. 2014) y paenilarvinas, lipopéptidos de la familia de las iturinas con una fuerte actividad antibacteriana y antifúngica. Las paenilarvinas presentan además un efecto negativo sobre la larva de la abeja, siendo tóxicas cuando son ensayadas en bioensayos de contaminación de la dieta (Sood et al. 2014).

Otras especies de *Paenibacillus*, como *Penibacillus lentimorbus*, *Penibacillus popilliae* y *Paenibacillus spp*. Kh3 han mostrado toxicidad frente a diferentes insectos, siendo las responsables de la conocida enfermedad lechosa del escarabajo japonés *Popillia japonica* (Klein and Kaya 1995; Harrison et al. 2000; Yokoyama et al. 2003). *P. popilliae* es responsable de la enfermedad lechosa tipo A mientras que *P. lentimorbus* causa la enfermedad lechosa tipo B, caracterizada por la aparición de costras marrones que bloquea la circulación de la hemolinfa del insecto (Dutky 1940).

El efecto tóxico de estas dos especies de *Paenibacillus* parece estar relacionado con la presencia en su genoma de genes homólogos a los genes *cry* de *B. thuringiensis*. Así en *P. popilliae* subs. *Melolonthae* H1 se ha encontrado el gen *cry18Aa1* cuya proteína presenta similitud con la proteína Cry2 (Zhang et al. 1997). En *P. lentimorbus* se han encontrado los genes codificantes de las proteínas Cry43*Aa1* y Cry43Ba1, que han mostrado poseer una elevada toxicidad hacia larvas de *Anomala cuprea*, (90% de mortalidad) cuando fueron expresadas en *E. coli*. El efecto de esta toxina sobre las larvas es la inhibición de la ingestión por parte de estas y su muerte tras 4 semanas desde la ingestión (Yokoyama 2004).

Se ha descrito que *P. popilliae* produce la infección del hemocele del insecto a través del epitelio intestinal mediante un proceso de fagocitosis (Splittstoesser et al. 1978). Las esporas, una vez ingeridas por el insecto germinan y se multiplican en la región luminal del intestino, tras lo cual invaden el hemocele donde continúan multiplicándose (Kawanishi et al. 1978).

Algunos estudios han descrito que determinadas especies del género *Paenibacillus* se asocian con determinados nemátodos entomopatógenos. Estas bacterias son capaces de unirse a la cutícula del nemátodo donde se reproducen sin necesidad de infectar a ningún insecto (Enright et al. 2003; Enright and Griffin 2004)la capacidad entomopatógena de estas cepas no ha sido demostrada. Lo que si se ha observado sin embargo es un fenómeno sinérgico, de forma que una coinfección de *P. popilliae* con nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis*, rinden porcentajes de
infección superiores que cuando la bacteria no está presente (Thurston et al. 1993; Thurston et al. 1994).

1.1.2.2.1. Paenibacillus larvae

P. larvae es el agente causal de la loque americana o AFP (del inglés *American* Foulbrood), enfermedad que afecta gravemente a abejas a nivel mundial (Genersch et al. 2006). Esta es una de las razones por la que es la especie del género *Paenibacillus* mejor estudiado hasta el momento(Antúnez et al. 2011; Poppinga et al. 2012; García-González and Genersch 2013; Krska et al. 2015; Ebeling et al. 2021).

La loque americana está causada por 4 cepas diferentes de *P. larvae*, denominadas ERIC I-IV, que muestran diferentes niveles de virulencia, siendo ERIC I y II las que presentan mayor virulencia (Djukic et al. 2014; Grady et al. 2016).

Las larvas de las abejas son infectadas a partir de alimento contaminado con esporas de la bacteria. Estas esporas germinan en el intestino de la larva, donde se desarrollan de manera no invasiva. Las larvas recién eclosionadas son mucho más susceptibles a la invasión por *P. larvae*, debido a la delgadez de su membrana peritrófica, la cual es degradada por la bacteria gracias a la presencia de quitinasas y proteasas, accediendo de esta forma al epitelio intestinal (Gregorc and Bowen 1998; García-González and Genersch 2013). La adhesión de la bacteria a la membrana peritrófica se realiza a través de la proteína de la capa superficial o proteína S (S-layer protein) SplA, la cual juega un papel fundamental, considerándose como otro factor de virulencia en *P. larvae* (Poppinga et al. 2012). Una vez que la bacteria alcanza el epitelio intestinal y el hemocele, la larva muere rápidamente. Los adultos, que son inmunes a la infección por *P. larvae*, son los responsables de la propagación de las esporas durante la limpieza de la colmena (Fries and Camazine 2001).

Se han detectado diferentes toxinas presentes en las cepas de *P. larvae*, las cuales afectan al grado de virulencia observado en cada una de ellas. En la cepa ERIC I, una de las más virulentas junto a ERIC II se ha identificado la toxina C3 larvina, una toxina de un solo dominio que presenta actividad mono-ADP-ribosiltransferasa hacia la proteína RhoA mediante la hidrólisis de NAD⁺ tal y como ocurre con otras toxinas de esta familia. Esta proteína juega un papel fundamental en la regulación del citoesqueleto de la célula (Ménétrey et al. 2002; Jørgensen et al. 2008; Krska et al. 2015).

Otra proteína secretada por *P. larvae* que está relacionada con la patogenia de la bacteria, es la enzima Enolasa. Identificada como una proteína secretada por Antúnez et al en el 2010, se ha demostrado finalmente que posee actividad entomopatógena frente a larvas de la abeja cuando es administrada de manera oral junto a la comida (Antúnez et al. 2011).

Pese a ser una proteína citosólica cuya función principal está relacionada con la glucólisis, parece que la Enolasa posee una doble actividad enzimática, una en el interior celular, donde participa en las rutas glucolíticas y otra cuando es secretada al exterior, participando en la virulencia de *P. larvae*. Algunas Enolasas de bacterias Gram positivas patógenas poseen una actividad proteolítica con capacidad de activar el plasminógeno del huésped (Bergmann et al. 2001; Whiting et al. 2002). Aunque este mecanismo solo ha sido identificado en mamíferos, es posible que las abejas presenten un sistema similar y el mecanismo de acción de la Enolasa identificada en *P. larvae* sea análogo al observado en otras bacterias (Antúnez et al. 2011).

1.1.2.3. Brevibacillus laterosporus

Otra especie de importancia por su actividad entomopatógena es *Brevibacillus laterosporus*. Esta especie, caracterizada por su cuerpo paraesporal en forma de canoa (CSPB) (Hannay 1957) ha mostrado toxicidad frente a insectos de diferentes órdenes, como Coleoptera (Boets et al. 2004), Lepidoptera (de Oliveira et al. 2004), Diptera (Favret and Yousten 1985; Rivers et al. 1991; Ruiu et al. 2006) e incluso algunos nemátodos (Singer 1996), hongos (Saikia et al. 2011) y moluscos (Ruiu et al. 2013).

Además, al igual que otras especies del género, *B. laterosporus* ha demostrado poseer una elevada actividad antibacteriana gracias a la producción de numerosos componentes como policétidos, bacteriocinas y toxinas antibacterianas (Djukic et al. 2011; Sharma et al. 2012). Estos compuestos han demostrado tener actividad fungicida y bactericida frente a una gran cantidad de organismos (Zhao et al. 2012; Singh et al. 2012; Song et al. 2019). Otras cepas también producen quitinasas capaces de llevar a cabo la degradación de las paredes celulares de hongos (Prasanna et al. 2013)

Los primeros estudios que relacionaron a esta especie bacteriana con la actividad frente a insectos fueron realizados sobre dípteros, utilizando larvas de mosquitos del género *Culex* y *Aedes*, así como moscas del género *Simulium* (Favret and Yousten 1985). El efecto tóxico frente a dípteros parece estar mediado por toxinas de naturaleza proteica y fuertemente relacionado con las esporas y el cuerpo paraesporal bacteriano. Esta relación pudo observarse tanto en cepas acristaliferas (Ruiu et al. 2007a) como en otras que si presentaron cristales paraesporales (Orlova et al. 1998). Una de las características más llamativas de la actividad observada en *B. laterosporus* es su elevada especificidad, ya que la acción patógena parece no afectar a organismos beneficiosos, como el parasitoide de pupas de dípteros *Muscidifurax raptor* Girault y Sanders (Hymenoptera: Pteromalidae) (Ruiu et al. 2007b). *B. laterosporus* provoca un claro desorden en el intestino de las moscas que se han tratado con la bacteria, produciéndose una desorganización similar a la producida por *B. thuringiensis*, lo que sugiere un mecanismo de acción relacionado con la alteración de la permeabilidad del epitelio intestinal del insecto (Ruiu et al. 2012).

La caracterización de diferentes cepas de *B. laterosporus* con actividad frente a coleópteros ha demostrado una elevada especificidad (Singer 1996; Salama et al. 2004; Rand and Laing 2011). La toxicidad de estas cepas parece estar asociada a la presencia de toxinas secretadas en el sobrenadante del cultivo (Ruiu 2013). El estudio de la secuencia de estas toxinas ha determinado que estas toxinas presentan homología con las toxinas Vip de *B. thuringiensis,* por lo que se les ha denominado Vip1Da1 y Vip2Ad1 (Ruiu 2013). La caracterización de estas toxinas ha permitido observar que llevan a cabo una acción conjunta, dado que su efecto desaparece cuando son ensayadas por separado.

Por último, la actividad nematicida de *B. laterosporus* parece estar vinculada a la presencia de proteasas extracelulares como la proteasa alkalina BLG4, obtenida a partir de la cepa *B. laterosporus* G4, la cual parece producir un importante daño en la cutícula del nemátodo (Huang et al. 2005; Lian et al. 2007). El análisis de la secuencia del gen responsable de la síntesis de esta proteasa ha mostrado una alta similitud con proteasas de la familia de la subtilisinas de *B. subtilis* (Ruiu 2013).

1.1.2.4. Lysinibacillus sphaericus

Lysinibacillus sphaericus es un organismo ampliamente utilizado para el control biológico de mosquitos del género *Culex* y *Anopheles*, caracterizado por la producción de esporas esféricas (Kellen et al. 1965; White and Lotay 1980). Los factores de virulencia responsables de la toxicidad conocidos hasta el momento incluyen una toxina binaria (Toxina BinAB), producida como una inclusión cristalina paraesporal durante la esporulación (Hindley and Berry 1987; Baumann et al. 1988; Berry 2012), toxinas tipo Mtx, que presentan función ADP ribosil transferasa (Thanabalu et al. 1991; Schirmer et al. 2002), la proteína de la capa S y la Sphaericolisina, cuya función en la patogenia de mosquitos todavía se desconoce pero que ha mostrado toxicidad frente a *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae) and *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) (Nishiwaki et al. 2007; Hernández-Santana et al. 2016).

La toxina binaria es sintetizada en las fases finales de la esporulación y es la proteína que presenta la mayor toxicidad de todo el arsenal de factores de virulencia de esta especie. Su mecanismo involucra la unión específica a un receptor del intestino medio del mosquito (Rojas-Pinzón and Dussán 2017).

Además, se han identificado en algunas cepas de *Lysinibacillus* una nueva toxina binaria. Dicha toxina está formada por dos componentes donde el primero (Cry48Aa1) presenta similitud con las toxinas Cry de *B. thuringiensis*, pero cuya toxicidad solo se presenta cuando actúa junto a un segundo componente, Cry49Aa1, el cual presenta homología tanto con la proteína binaria de *L. sphaericus*, como con la proteína Cry35 y 36 de *B. thuringiensis*. Esta nueva toxina binaria es activa frente a mosquitos del género *Culex* resistentes a la acción de las toxinas Bin clásicas de *L. sphaericus*. Aunque el mecanismo de acción conjunta de estas dos proteínas no se conoce (Jones et al., 2007), parece que su acción parece no depender de la unión de estos dos componentes entre sí (Nascimento et al., 2020).

Por último, se ha descrito la presencia en el genoma de *L. sphaericus* genes homólogos a proteínas con actividad hemolítica y una quitinasa que podrían actuar en el proceso de patogénesis de esta bacteria (Hernández-Santana et al. 2016).

1.1.2.5. Bacillus entomopatógenos

Las especies con actividad entomopatógena incluidas en este género son las mejor estudiadas de todas las bacterias entomopatogenas. Presenta un amplio rango de acción, afectando a insectos de diversos ordenes (Gough et al. 2002; Wei et al. 2003; Peña et al. 2006; Swiecicka et al. 2008). Al igual que el resto de las bacterias esporulantes Gram positivas, el principal mecanismo de acción identificado en estas especies bacterianas es la presencia de cristales paraesporales formados por toxinas, que una vez solubilizadas en el insecto diana ejercen su acción, generalmente en el aparato digestivo de este (Hannay 1953; Schnepf et al. 1998).

Las especies entomopatógenas más relevantes de este género son *B. thuringiensis* y *B. cereus,* especies que presentan un elevado nivel de similitud, considerándose filogenéticamente prácticamente idénticos. La principal diferencia entre estas dos especies de bacterias se encuentra en la producción de diferentes tipos de toxinas (principalmente codificadas por elementos extracromosómicos), que hace que tengan espectros de acción muy diferentes (Faust et al. 1983; Reyes-Ramírez and Ibarra 2008; Fagundes et al. 2011).

1.1.2.5.1. Bacillus cereus

Esta especie bacteriana es un conocido patógeno oportunista del ser humano que provoca intoxicaciones alimentarias (Turnbull et al. 1979; Shinagawa 1990). Es una especie que se encuentra ampliamente distribuida en multitud de ambientes, entre ellos el suelo, donde presenta un elevado nivel de asociación con plantas (Stenfors Arnesen et al. 2008).

A diferencia de *B. thuringiensis*, la endospora de *B. cereus* no posee actividad insecticida, ya que no presenta producción de cristales paraesporales. La actividad entomopatógena observada en esta especie proviene, principalmente de las exotoxinas que produce

durante su fase vegetativa (Perchat et al. 2005; Castagnola and Stock 2014). Entre estas toxinas, producidas de forma soluble durante la fase vegetativa y secretadas al exterior celular, se pueden destacar las toxinas Vip, compuestas por dos proteínas. Estas proteínas se encuentran en el mismo operón en la cepa *B. cereus* AB78 y presentan una señal N-terminal para su secreción (Warren G. 1997). Estudios de homología de secuencia parecen indicar que estas dos proteínas funcionan como una típica proteína binaria tipo A+B, donde Vip2 es el dominio A citotóxico y Vip1 contiene el dominio de unión al receptor y posiblemente un dominio de translocación (de Maagd et al. 2003; Chakroun et al. 2016). Estas toxinas binarias son activadas mediante la acción de proteasas. Muchas de estas toxinas binarias están compuestas por un componente A encargado de la unión/translocación y un componente B el cual presenta una actividad enzimática (Visschedyk et al. 2010).

La proteína Vip2 es una ADP ribosiltransferasa dependiente de NAD⁺ que produce la modificación de los filamentos de actina en el residuo de Arg 177, bloqueando de esta manera la polimerización, provocando la desestructuración del citoesqueleto de actina y por tanto la muerte celular (Han et al. 1999; Jucovic et al. 2008).

Además, algunas cepas de *B. cereus* sintetizan durante su fase vegetativa pequeñas exotoxinas no proteicas que presentan actividad frente diferentes insectos como *Aphis fabae* (Ohba et al. 1981; Perchat et al. 2005).

1.1.2.5.2. Bacillus thuringiensis

Bacillus thuringiensis es una bacteria encontrada comúnmente en muestras de suelo (Martin and Traverst 1989; Hastowo et al. 1992), que ha sido aislada a partir de una gran variedad de cadáveres de insectos (Dulmage 1970; Krieg et al. 1983; Carozzi et al. 1991) y asociada a plantas (Kaelin et al. 1994; Giffel et al. 1996), demostrándose su capacidad como organismo endófito (Castagnola and Stock 2014).

La primera comunicación de una bacteria con activad entomopatógena perteneciente a esta especie se realizó en 1911, con el descubrimiento de *B. thuringiensis (Bt)* (Ishiwata 1901; Berliner 1911). Los primeros intentos de llevar a cabo su uso como método de control de plagas se remonta al comienzo de los años 30. A día de hoy es el bioinsecticida con mayor éxito comercial, representando aproximadamente el 90% del mercado (Charles et al. 2000).

B. thuringiensis produce una gran variedad de toxinas diferentes, las cuales la capacitan para llevar a cabo una importante actividad entomopatógena (Schnepf et al. 1998; Toledo et al. 1999; Soberón et al. 2013; Liu et al. 2014; Xu et al. 2014; Martínez-Zavala et al. 2020). Diferentes cepas de *B. thuringiensis* han mostrado toxicidad frente a un reducido número de insectos, siendo las proteínas Cry el principal factor de virulencia

utilizado por esta bacteria para desarrollar su patogenicidad. Estas proteínas han demostrado una gran especificidad por el insecto diana, ya que para ejercer su mecanismo de acción se necesita el reconocimiento de receptores específicos presentes en el intestino del insecto (Knight et al. 1994; Nagamatsu et al. 1998; Griffitts et al. 2005; Pigott and Ellar 2007). Los insectos afectados por la toxicidad de estas toxinas pertenecen al orden Lepidoptera (Damgaard et al. 1998; Stout 2012), Diptera (Aly et al. 1985; Damgaard et al. 1998; Gough et al. 2002), Coleoptera (Krieg et al. 1983; Kaelin et al. 1994), Hemiptera (Sattar and Maiti 2011) e Hymenoptera (Rose et al., 2010). Además, se ha observado como determinadas proteínas Cry presentan actividad frente algunos nemátodos (Wei et al. 2003), protozoos e incluso frente a células cancerígenas humanas (Mendoza-Almanza et al. 2020).

1.1.2.5.2.1. Toxinas producidas por *B. thuringiensis* en la fase vegetativa

Además de la actividad asociada a los cristales paraesporales de *B. thuringiensis,* esta bacteria presenta otros muchos factores de virulencia, los cuales, a diferencia de las toxinas Cry y Cyt (componentes los cristales paraesporales), son expresados durante la fase vegetativa de la bacteria. Uno de estos factores de virulencia son las proteínas de la capa S de *B. thuringiensis*, las cuales han mostrado actividad frente a *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae) (Peña et al. 2006).

Otras de las proteínas que participan en la patogenicidad de *B. thuringiensis* son las proteínas secretadas al medio durante la fase vegetativa como son las proteínas Sip, del inglés <u>Secreted Insecticidal Protein</u> (William P Donovan et al. 2006), cuyo modo de acción es desconocido y las proteínas Vip, del inglés <u>Vegetative Insecticidal Protein</u> (Palma et al. 2014a; Chakroun et al. 2016). Estas proteínas son sintetizadas unidas a un péptido señal, para favorecer la secreción. Posteriormente este péptido señal es procesado por proteasas en el exterior celular dando lugar a la toxina activa (Shi et al. 2004; Shi et al. 2007), exceptuando la toxina Vip3, la cual no presenta procesamiento del péptido señal (Estruch et al. 1996; Doss et al. 2002).

Las toxinas Vip, que se dividen en Vip1-4, presentan diferentes actividades:

Vip1 y Vip2 actúan como una toxina binaria y presentan una actividad sinérgica frente a Coleopteros e Himenopteros (Sattar and Maiti 2011; Yu et al. 2011). La proteína Vip2 es similar al componente de la de la toxina lota de *C. perfringens*, por lo que al igual que esta presenta una actividad ADP-ribosiltransferasa sobre las fibras de actina, desregulando el citoesqueleto del insecto diana y provocando así su muerte (Barth et al. 2004; Jucovic et al. 2008; Chakroun et al. 2016). El funcionamiento de esta toxina binaria es dependiente de la unión de Vip1 a un receptor de membrana específico. La unión provoca un cambio conformacional en su estructura lo que provoca la unión de otros

monómeros de Vip1, formándose un heptámetro (Leuber et al. 2006). Este heptámero, unido al receptor de membrana es capaz de llevar a cabo la translocación del componente tóxico Vip2 hacia el citoplasma, mediante endocitosis (Barth et al. 2004)o a través del poro formado por la proteína Vip1 (Leuber et al. 2006). Una vez internalizado, Vip2 provoca la modificación de los monómeros de actina evitando la polimerización del citoesqueleto (**Figura 4**) (Han et al. 1999; Jucovic et al. 2008; Chakroun et al. 2016).



Figura 4. Representación esquemática del mecanismo de acción de las toxinas Vip 1-Vip 2. Tomada de Chakroun et al., 2016.

Vip3 es una proteína que no presenta identidad con ninguna otra toxina insecticida. Afecta principalmente a lepidópteros (Estruch et al. 1996; Palma et al. 2012; Ruiz de Escudero et al. 2014). Generalmente se encuentra codificada en plásmidos (Ling Wu et al. 2004; Mesrati et al. 2005) y su mecanismo de acción no es conocido, aunque se piensa que podría tener un mecanismo de acción mediante la formación de poros a través de las membranas celulares (Lee et al. 2003; Mendoza-Almanza et al. 2020). Esta toxina sufre, al igual que las proteínas Cry, una activación proteolítica en el intestino del insecto, la unión a receptores específicos del epitelio y la formación de poros en este, mostrando síntomas similares a los producidos por las toxinas Cry (Yu et al. 1997; Lee et al. 2003).

Vip4, identificada por Sun en 2010 (no publicado), guarda cierta similitud con Vip1, por lo que podría ser uno de los componentes de alguna toxina binaria aún desconocida. Aún no se han identificado receptores para esta toxina para la cual se predice un tamaño de aproximadamente 108 kDa (Palma et al. 2014a; Chakroun et al. 2016).

Las β-exotoxinas o exotoxinas, también conocida como thuringiensina, es un metabolito secundario termoestable producido y secretado por *B. thuringiensis*. Las exotoxinas

fueron descritas por primera vez por McConnell & Richards en 1959 por su capacidad de prevenir el desarrollo completo de las larvas de la mosca común hasta adultos (Kim and Huang 1970) y son capaces de retener su actividad tóxica incluso tras ser autoclavadas a 121°C (McConnell and Richards 1959).

Se trata de un pequeño oligosacárido compuesto por adenosina, glucosa, ácido fosfórico y diácido glucónico (Farkaš et al. 1969), que ha demostrado toxicidad frente a una gran variedad de insectos de los órdenes Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Orthoptera, Isoptera e incluso algunos nemátodos (Toledo et al. 1999; Tamez-Guerra et al. 2004; Liu et al. 2010).

El mecanismo de acción de esta toxina no se conoce por completo, pero que se piensa que la thuringiensina actúa como un análogo del ATP, compitiendo con este para la unión a la ARN polimerasa, por lo que produce una inhibición de la síntesis del ARN, tanto en mamíferos como en bacterias (Šebesta and Horská 1970; Beebee et al. 1972). Los efectos de esta toxina sobre los insectos solo se observan durante la muda y la pupa de estos, produciendo malformaciones en los insectos y su muerte de una manera dependiente de la dosis (Burgerjon et al. 1969; Espinasse et al. 2002).

La elevada toxicidad observada por esta toxina de *B. thuringiensis* ha demostrado ir más allá de los insectos, siendo activa también en ensayos realizados con ratas. La inyección de la thuringiensina en el aparato respiratorio de ratas provocó modificaciones histológicas en los pulmones provocando una inflamación en los bronquiolos y los alveolos pulmonares, observándose un LD₅₀ de 4.4 mg/kg (Tsai et al. 2003; Tsai et al. 2006). Esta toxicidad observada en mamíferos ha provocado la exclusión de la thuringiensina del uso público en la Unión Europea, Estados Unidos y Canadá, basándose en las recomendaciones de la organización Mundial de la Salud (Zaim 1999; Palma et al. 2014a).

1.1.2.5.2.2. Toxinas producidas por *B. thuringiensis* como cristales paraesporales

Durante su ciclo de vida, *B. thuringiensis* presenta una etapa de crecimiento vegetativo, durante el cual la bacteria se divide mientras las condiciones son favorables. Cuando las condiciones cambian y la bacteria entra en fase estacionaria de crecimiento esta puede iniciar el proceso de esporulación. Mediante este proceso, la bacteria comienza la formación de la endospora, una estructura de resistencia. Durante el proceso de esporulación, *B. thuringiensis,* como otras bacterias entomopatógenas Gram positivas, forma cristales paraesporales formados por δ -endotoxinas, proteínas con actividad entomopatógena (Hofmann et al. 1988; Li et al. 1991; Knight et al. 1994). Estos cristales

paraesporales están formados principalmente por las conocidas proteínas cristal o proteínas Cry y/o por proteínas Cyt (Citolíticas) (Schnepf et al. 1998; Xu et al. 2014).

1.1.2.5.2.2.1. Toxinas Cyt

Las toxinas Cyt son sintetizadas como protoxinas, y son proteolizadas en el extremo amino y carboxilo terminal para dar lugar a la toxina activa (Drobniewski and Ellar 1989; Knowles et al. 1992; Konit and Ellar 1994). Las toxinas Cyt presentan una arquitectura α - β , con dos capas externas de α hélices y una lámina β central. Las capas helicoidales externas tienen estructuras de horquillas que pueden moverse con respecto a la lámina β sin modificar su estructura (**Figura 5 A**) (Li et al. 1996).

La principal familia de insectos diana de esta familia de toxinas son Dipteros como mosquitos del género *Anopheles, Culex y Aedes* (Gill and Hornung 1987; Konit and Ellar 1994). Se conocen tres subfamilias de toxinas Cyt (Cyt1, Cyt2 y Cyt3). Al contrario que otras toxinas entomopatógenas, esta toxina no une a receptores específicos de membrana, sino que interacciona directamente con la membrana lipídica (Thomas and Ellar 1983; Haider and Ellar 1989; Rodriguez-Almazan et al. 2011). El método de acción de estas toxinas no se conoce, aunque existen dos mecanismos de acción propuestos:

A) Modelo de formación de poro transmembrana:

Este modelo describe un mecanismo de acción similar al propuesto para las proteínas Cry, por el cual un monómero de la toxina Cyt reconoce y se une a receptores específicos de membrana, lo que propicia un cambio conformacional que lleva a la formación de un hexámero. Los monómeros se ensamblan en una estructura similar a un paraguas abierto y se insertan en la membrana, formando un poro que lleva a la permeabilización de la membrana del inserto (**Figura 5, B**) (Butko 2003; Rodriguez-Almazan et al. 2011).

B) Modelo del efecto detergente:

Este modelo sugiere que las toxinas Cyt se unen a la membrana celular y provocan un efecto de solubilización, destruyendo la bicapa lipídica al actuar como un detergente (**Figura 5 B**) (Butko 2003).



Figura 5. Estructura tridimensional predicha de la toxina Cyt1Aa1 donde pueden observarse los dos dominios α hélices flanqueando al dominio de lámina β central (A) y esquema de los dos modelos hipotéticos de acción de las toxinas Cyt de *B. thuringiensis* propuestos (B). A la izquierda se observa el modelo de formación de poro, donde la proteína se inserta en la membrana lipídica mediante una estructura definida y la bicapa lipídica mantiene su estructura. A la derecha se observa el modelo de efecto detergente, donde no existe inserción de la toxina en la membrana y esta se asocia, sin formar estructuras definidas, a la bicapa lipídica, produciéndose la desorganización de la misma y formándose poros temporales en la membrana. 1) Toxina soluble, 2) Modificación de la conformación de la toxina e interacción con la membrana celular, 3) formación del canal o formación de agregados en su superficie que disgrega la membrana permitiendo que las moléculas intracelulares (círculos negros) escapen hacia el exterior celular. Tomada de Butko, 2003.

1.1.2.5.2.2.2. Toxinas Cry

Las proteínas Cry son conocidas por su actividad frente a una amplia gama de insectos plaga (Schnepf et al. 1998; Pardo-López et al. 2013; Palma et al. 2014a). Su elevada toxicidad y especificidad ha incentivado su utilización como un importante bioinsecticida, siendo el principal componente en la mayoría de los insecticidas biológicos, ya sea mediante su utilización para fumigación ectópica o mediante la construcción de plantas transgénicas (Mendelsohn et al. 2003; Romeis et al. 2006; Melo et al. 2014).

Las proteínas Cry son sintetizadas en forma de protoxinas, las cuales son solubilizadas cuando llegan al intestino del insecto gracias al pH alcalino existente. Una vez solubles son activadas proteolíticamente gracias a proteasas digestivas, obteniéndose la toxina activa. La forma activa de la toxina está formada por tres dominios estructurales bien definidos, razón por la cual estas proteínas son conocidas también como toxinas 3D-Cry (**Figura 6**) (Li et al. 1991; Schnepf et al. 1998; Parker and Feil 2005; Mendoza-Almanza et al. 2020).

El dominio I de la toxina Cry activa está formado por 7 α hélices antiparalelas, donde la hélice 5 se encuentra rodeada por el resto de las hélices. Este dominio está relacionado con la formación del poro en la membrana de las células de los insectos diana y es el dominio más conservado entre todas las proteínas Cry. El dominio II consiste en tres láminas β antiparalelas unidas en una estructura de "Ilave griega". Este dominio presenta una gran variabilidad de secuencia, especialmente en los *loops* apicales expuestos al exterior de la proteína. Este dominio es un determinante de la especificidad de la toxina, ya que es el responsable de la unión de la toxina a los receptores de la célula diana (Li et al. 1991). El dominio III está formado por dos láminas β antiparalelas y retorcidas que forman una estructura de sándwich β (Li et al. 1991; Schnepf et al. 1998). Este último dominio está relacionado tanto con la formación del poro como con la especificidad de unión al receptor (**Figura 6**).



Figura 6. Estructura tridimensional de una toxina Cry. Los colores fueron asignados mostrando la dirección de la cadena peptídica mediante los colores del arcoíris, iniciando en rojo en el N terminal y terminando con el morado en el extremo C terminal. El dominio I está compuesto por 7 α hélices, el dominio II y dominio III están compuestos por láminas β . Tomada de Li et al., 1991.

La elevada especificidad observada en la actividad de las proteínas Cry viene determinada tanto por el reconocimiento de receptores de membrana específicos de membrana por el Dominio II y III como por las diferencias en la capacidad de solubilización de estas enzimas en el intestino del insecto (Ge et al. 1989; Aronson et al. 1991; Ge et al. 1991; Du et al. 1994).

Existen actualmente dos modelos propuestos para explicar el mecanismo de acción de las toxinas Cry, el modelo de formación de poro y el modelo de transducción de señales. El mecanismo de acción que cuenta con una mayor aceptación es el modelo de formación de poro (**Figura 7**).

A) Modelo de formación de poro:

En este modelo, el mecanismo de acción comienza cuando los cristales paraesporales de *B. thuringiensis* entran en el intestino de un insecto y son solubilizados por el alto pH de este. La protoxina es degrada enzimáticamente mediante la acción de proteasas dando lugar a la toxina activa. Las toxinas activas son capaces de atravesar la membrana peritrófica del insecto y llegar hasta las células del epitelio donde reconocen receptores específicos y comienzan a acumularse. En el modelo de formación del poro, la unión al receptor de cadherina provoca la hidrólisis y liberación de la hélice α 1, lo que provoca que se produzca un cambio conformacional y la oligomerización de la toxina Cry, formándose un oligómero pre-poro. Una vez oligomerizada, esta estructura pre-poro se asocia a receptores anclados en la membrana a través de dominios GPI que facilitan la inserción del complejo en la membrana formándose un poro en la membrana y provocando la lisis celular (Vachon et al. 2012; Palma et al. 2014a).

B) Modelo de transducción de señal:

Este modelo postula que la citotoxicidad mostrada por las proteínas Cry está mediada por el reconocimiento y la unión a un receptor de cadherina, el cual activa una cascada de señalización dependiente de Mg que lleva a la muerte celular programada.

Al igual que en el modelo anterior, la protoxina es digerida por proteasas del intestino del insecto dando lugar a la toxina activa. La unión de la toxina de manera específica a receptores de cadherina provoca la activación de una adenil ciclasa, la cual provoca un incremento de AMPc, que activa a su vez a una proteína cinasa A (PKA). Esto provoca la formación de un canal de iones, la desestabilización del citoesqueleto y la muerte celular (Zhang et al. 2005; Palma et al. 2014a).



Figura 7. Esquema de los dos modelos de acción de las toxinas 3D-Cry propuestos. El modelo de formación de poro (parte superior) y el modelo de transducción de señal (parte inferior). Tomada de Soberón et al., 2009.

Algunas toxinas Cry, no tienen actividad frente a insectos, sin embargo, presentan actividad frente a células cancerígenas humanas (Mizuki et al. 2000). A estas toxinas producidas por *B. thuringiensis* como inclusiones paraesporales se las conoce con el nombre de paraesporinas. Estas toxinas presentan cierta similitud con las proteínas Cry, presentando estructuras tridimensionales homologas, sin embargo, las paraesporinas reconocen receptores específicos de membrana en células cancerígenas y no en células de insecto, disparando la muerte celular en células humanas (Xu et al. 2014; Akiba and Okumura 2017).

Se conocen 6 subclases de paraesporinas, denominadas PS1-PS6, las cuales presentan diferentes espectros de toxicidad y de acción, produciendo cambios morfológicos en la vacuolización intracelular, turgencia y degradación celular (Kitada et al. 2006; Ohba et al. 2009).

1.2. Ceratitis capitata (Wiedemann)

Entre los principales problemas en el modelo de agricultura actual derivado de la aplicación de la agricultura intensiva y el monocultivo, se encuentran la aparición de enfermedades y plagas que producen enormes pérdidas en los principales cultivos a nivel mundial, estimándose que anualmente se pierde más del 40% de la producción global por este problema (Fao Report, 2021).

El desbalance producido por el hombre en los ecosistemas, debido a la implantación de los cultivos, agrava esta situación. Esta distorsión impide la acción de los posibles depredadores naturales de las plagas, los cuales en condiciones normales llevarían a cabo un control o reducción del problema (Sree and Varma 2015). Además, el incremento del comercio a nivel mundial conlleva un aumento en el riesgo de introducción de plagas y enfermedades exógenas, que no cuentan con mecanismos de control adecuados en el lugar de establecimiento, lo que facilita la expansión de estas plagas a regiones anteriormente inaccesibles para estos organismos (Malacrida et al. 2007).

La mosca de la fruta del Mediterráneo, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (subfamilia Tephritidae), es un díptero braquícero holometábolo considerado como un organismo cosmopolita por su amplia distribución a nivel mundial. Este insecto se encuentra entre las plagas de insectos más destructivas a nivel mundial, afectando a más de 200 especies de frutas y vegetales (Christenson and Foote 1960; Liquido et al. 1991).

C. capitata, procedente de la costa occidental de África, se encuentra en la actualidad distribuido a lo largo de todo el planeta, pudiendo observarse en países tropicales, subtropicales o de climas templados de todos los continentes (**Figura 8**).



Figura 8. Distribución de la mosca de la fruta del Mediterráneo en la actualidad a nivel mundial. Los países se encuentran coloreados en función del nivel de infestación de la plaga. Mapa de distribución obtenido a partir de la base de datos del Compendium de especies invasoras (CABI). www.cabi.org/isc/datasheet/12367#toDistributionMaps

Pese a la gran capacidad de dispersión que presentan los individuos adultos de esta especie, la expansión de esta plaga hacia nuevos territorios, hasta llegar a la distribución actual, se ha producido principalmente por el incremento de las exportaciones de frutas y hortalizas, las cuales portan los huevos y/o las larvas de esta mosca, hasta regiones no endémicas (Malacrida et al. 2007). El establecimiento de esta especie en los países mediterráneos ocurrió hace aproximadamente 200 años, y posteriormente se produjo su llegada a los países del centro y sur de América, detectándose por primera vez en el continente americano en Brasil en el año 1901 (von Ihering 1901). La gran resistencia de esta plaga a los factores ambientales, junto a la gran variedad de frutas y verduras que es capaz de utilizar para llevar a cabo su ciclo biológico, ha permitido el establecimiento de *C. capitata* a nivel mundial.

1.2.1. Ciclo de vida

C. capitata presenta un ciclo de vida con una metamorfosis completa ordinaria, diferenciándose 4 fases o estadios diferentes en su ciclo de vida; huevo, larva, pupa y adulto. En general, la duración del ciclo de vida puede variar entre 21-30 días, en función de la temperatura, pudiendo presentar en regiones templadas entre 6 a 8 generaciones anuales.

La hembra de *C. capitata*, una vez fecundada, pone sus huevos principalmente en la fruta madura o en proceso de maduración gracias a su ovopositor, con el cual atraviesa la epidermis de esta y ovoposita una media de unos 50 huevos por punción. La etapa de huevo dura de media 49.2 h, dependiendo de la Tª, tras lo cual se produce la eclosión del huevo y emerge la larva (Carey 1984).

Una vez las larvas salen del huevo, estas comienzan a alimentarse del interior del fruto y a desarrollarse en el interior de este. La larva pasa por tres estadios diferentes, entre los cuales se produce la muda de la epidermis. La larva de tercer estadio sale del fruto y cae a la tierra, donde por último se forma la pupa, mediante el endurecimiento de la piel de la larva, en cuyo interior se encuentra una larva de cuarto estadio (Christenson and Foote 1960). Es este estadio de larva el que presenta una mayor variabilidad en su duración, observándose como aparte de la temperatura, que es el factor determinante en la mayor parte del ciclo de vida de la mosca, depende también del fruto en el que se hayan desarrollado las larvas. La elección del fruto no solo condiciona la duración de este estadio, que varía entre 1 y 3 semanas, sino que también se observa una gran variabilidad en el porcentaje de larvas supervivientes, entre el 7 y el 100%, en función del fruto escogido (Carey 1984).

A los 11-13 días, el adulto emerge de la pupa. Los machos emiten feromonas que atraen a las hembras para llevar a cabo el apareamiento, completándose de esta forma el ciclo de vida del insecto.

En las regiones tropicales, la temperatura se mantiene estable durante todo el año en el óptimo para el desarrollo de esta especie, sin embargo, en las regiones templadas, donde la temperatura varía en función de las estaciones, se observa una variación en la abundancia de este insecto, con un máximo de presencia en los meses templados y cálidos y un mínimo en los meses de invierno (Escudero-Colomar et al. 2008).

1.2.2. Impacto económico de C. capitata

Los efectos económicos ocasionados por esta plaga se centran, principalmente, en las pérdidas agrícolas producidas por el daño de las larvas sobre los frutos de una gran variedad de cultivos. Las larvas, al alimentarse del fruto, provocan su degradación y descomposición haciendo imposible su uso comercial. Además, la ovoposición de los huevos a través de la piel del fruto facilita la invasión de hongos y bacterias, lo que puede provocar más daños sobre el fruto (Juan-Blasco et al. 2013).

Además, a los costes directos debido a las pérdidas en la producción hay que añadir los costes indirectos asociados tanto al control de la plaga, así como a los impuestos debido a las medidas de control establecidas para evitar o contener la dispersión de esta plaga,

como pueden ser la implementación de cuarentenas, programas de monitoreo o la implementación de límites a la exportación de las áreas infestadas por esta plaga.

A nivel mundial, las pérdidas económicas provocadas por *C. capitata* se estiman en más de 2.000 millones de dólares anuales (Shelly et al. 2014). Algunos estudios realizados por la Universidad de California han estimado las pérdidas en 1,100 millones de dólares anuales, provocadas principalmente por embargos de mercado, pérdida de trabajos, el incremento en el uso de pesticidas y pérdidas de cultivo solamente en el estado de California (Siebert 1991).

En España, esta plaga se encuentra distribuida casi en la totalidad del territorio y afecta a una gran cantidad de cultivos, aunque la mayor parte de los estudios del efecto de esta plaga han sido llevados a cabo en los cultivos de cítricos de la región mediterránea (Magaña et al. 2007; Navarro-Llopis et al. 2011; Martinez-Ferrer et al. 2012). Pese a que los cítricos no presentan los mayores porcentajes de supervivencia para las larvas, su maduración temprana, favorecen su utilización por la mosca.

1.2.3. Control de la plaga

Tradicionalmente, el control de esta plaga se ha llevado a cabo mediante el uso de insecticidas químicos organofosforados, como el malatión, o metil clorpirifos y piretroides. La aplicación directa del insecticida sobre el árbol y el suelo, aunque ha sido utilizada, no es de uso común, debido a los altos costes que acarrea, así como su inespecificidad.

La aplicación de estos insecticidas se realiza habitualmente asociada a cebo pulverizado, que contiene proteínas hidrolizadas, las cuales actúan como atrayente para las moscas. La aplicación puede ser aérea o desde tierra. La aplicación de estos tratamientos, junto a la utilización del trampeo masivo, ha permitido la erradicación de esta plaga en diferentes territorios, incluidos Florida en 1929, y en 1956 (Rohwer 1958) así como en Texas 1966.

Sin embargo, el incremento en el uso de estos insecticidas conlleva el aumento de la aparición de resistencias, como ocurre con el malatión en algunas regiones de España (Magaña et al. 2007). Este insecticida se encuentra actualmente excluido del Anexo I de la directiva europea 91/414 CEE desde el 2007 debido a su amplio espectro de acción y su alta toxicidad. La aparición de resistencias, así como el incremento en la concienciación de gran parte de la población de los perjuicios que acarrean para el medio ambiente, este tipo de insecticidas generalistas ha impulsado la búsqueda en los

últimos años de insecticidas con una mayor especificidad, así como la utilización de métodos mucho más respetuosos con el medio ambiente.

Actualmente, las principales medidas utilizadas para el control de *C. capitata* siguen siendo la utilización de fitosanitarios como el metil-clorpirifos (organofosforado), la lambda cialotrina (piretroide), el etofenprox (piretroide), el spinosad (insecticida de origen natural) y la deltametrina (piretroide).

Los insecticidas de amplio espectro suelen usarse en combinación con otros métodos de control biológico como el trampeo masivo (Navarro-Llopis et al. 2008) o la técnica del insecto estéril.

En México y Guatemala, se ha conseguido detener el avance de esta plaga y su erradicación en determinadas zonas mediante la combinación de cebo insecticida (malatión y proteína hidrolizada), con la técnica del insecto estéril o SIT de sus siglas en inglés (<u>Sterile Insect Technique</u>) (Hendrichs et al. 1983; Enkerlin et al. 2017). Otro ejemplo de actuación es el que fue llevado a cabo en el oeste de Australia, donde la liberación de insectos estériles se combinó con cebo insecticida con metrifonato, otro organofosforado que inhibe la acción de la acetilcolinesterasa (Fisher et al. 1985). Esta técnica, conocida también como lucha autocida, fue ideada en los años 40 en el centro de investigaciones entomológicas de los Estados Unidos por el equipo de E. Knipling (Knipling 1955; Knipling 1959). Consiste en la liberación masiva, generalmente de machos, obtenidos en centros de cría y que han sido esterilizados mediante radiación ionizante. Estos machos, liberados masivamente representan una competencia para el apareamiento con las hembras silvestres, lo cual produce un descenso en el número de individuos en la siguiente generación, debido al descenso en el número de huevos fértiles obtenidos.

1.2.3.1. Control biológico de C. capitata

El aumento de la concienciación social con respecto a los problemas asociados a la agricultura intensiva, como la reducción de la biodiversidad, el daño producido a la fauna adyacente, o contaminación indiscriminada de los hábitats, ha provocado un fuerte incremento en la demanda de productos vegetales obtenidos de manera más respetuosa con el medio ambiente, potenciándose de esta forma el uso de métodos de control biológico.

El principal beneficio del uso de técnicas de control biológico de las plagas en agricultura es la reducción en el uso de los insecticidas químicos generalistas, los cuales producen enormes daños en la población de insectos de la zona de tratamiento, incluidos insectos beneficiosos. El control biológico presenta una elevada especificidad, permitiendo llevar a cabo un control de una plaga sin afectar al resto de especies de insectos.

La regulación, cada vez más restrictiva con respecto a la presencia de insecticidas en los alimentos, también está potenciando la aplicación de estos métodos más respetuosos con la fauna auxiliar.

Los métodos de control biológico para controlar la población de C. *capitata* que se han desarrollado o explorado son muy variados. En esta tesis se mencionarán algunos, que están basados en el uso de depredadores, parásitos y parasitoides, y que han sido capaces de llevar a cabo la reducción de la población de la especie plaga.

1.2.3.1.1. Parasitoides

Para llevar a cabo el control de *C. capitata* se han estudiado numerosos organismos parasitoides naturales de esta especie, conociéndose más de 40 especies capaces de parasitar a esta importante plaga (**Tabla 1**).

La búsqueda y utilización de depredadores naturales de *C. capitata* se ha centrado en el uso de himenópteros parasitoides, principalmente bracónidos como *Fopius arisanus* (Sonan), *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron) y *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead). El primero es un parasitoide que utiliza los huevos de *C. capitata* para depositar sus propios huevos (Bess et al. 1961), produciendo una parasitación de hasta el 67% en condiciones experimentales (Bokonon-Ganta et al. 2005). Los otros dos utilizan las larvas de *C. capitata* para depositar sus huevos (Ovruski et al., 2000; Wharton & Gilstrap, 1983), alcanzándose mortalidades de hasta el 75% en ensayos de campo a pequeña escala (Sánchez et al. 2016). Sin embargo, otros muchos parasitoides de otras familias de insectos han sido identificados como enemigos naturales de *C. capitata*.

El uso de estos organismos a menudo implica la introducción de nuevas especies en los ecosistemas, las cuales generalmente complementan a los depredadores naturales existentes en la región. La introducción puede llevarse a cabo mediante la liberación de un gran número de parasitoides en las zonas afectadas criados en instalaciones especializadas, las cuales, en ocasiones, consiguen establecerse y mantener poblaciones estables (Bess et al. 1961).

Tabla 1. Algunos de los principales parasitoides naturales de la Mosca de la fruta del Mediterráneo (*C. capitata*) que han sido utilizados para llevar a cabo un control biológico de esta plaga. Tomada y actualizada a partir de Guzmán-Plazola, 2010.

Parasitoide	Familia	Estadio sensible	Bibliografía	
Diachasmimorpha kraussii (Fullaway)	Braconidae	Larva	(Argov et al. 2011)	
Diachasmimorpha longicaudata	Braconidae	Larva	(Viscarret et al. 2006)	
Diachasmimorpha tryoni	Braconidae	Larva	(Wharton and Gilstrap 1983)	
Fopius arisanus	Braconidae	Huevo	(Bess et al. 1961)	
<i>Fopius caudatus</i> (Szépligeti)	Braconidae	Huevo	(Kroder and Messing 2010)	
<i>Fopius ceratitivorus</i> (Wharton)	Braconidae	Huevo	(Bokonon-Ganta et al. 2005)	
Fopius vandenboschi (Fullaway)	Braconidae	Larva	(Kroder and Messing 2010)	
<i>Psyttalia concolor</i> (Szépligeti)	Braconidae	Larva	Argov y Gazit (2008)	
<i>Psyttalia incisi</i> (Silvestri)	Braconidae	Larva	(Kroder and Messing 2010)	
<i>Dirhinus giffardii</i> (Silvestri)	Chalcididae	Рира	(Kroder and Messing 2010)	
Coptera haywardi (Ogloblin)	Diapreiidae	Рира	(Baeza-Larios et al. 2002)	
<i>Coptera silvestrii</i> (Kieffer)	Diapreiidae	Рира	(Kroder and Messing 2010)	
<i>Aganaspis daci</i> (Weld)	Eucoilidae	Рира	(Papadopoulos and Katsoyannos 2003)	
Aceratoneuromyia indica (Silvestri)	Eucoilidae	Larva	(Kroder and Messing 2010)	
Tetrastichus giffardianus (Silvestri)	Eucoilidae	Larva	(Kroder and Messing 2010)	
Tetrastichus giffardii (Silvestri)	Eucoilidae	Larva	(Mohamed et al. 2006)	
Muscidifurax raptor	Pteromalidae	Рира	(Kapongo et al. 2007)	

Pachycrepoideus			(Kradar	and
vindemmiae	Pteromalidae	Puna	(KIOUEI	anu
vinaeninae	rteromandue	Гара	Messing 2010)	
(Rondan)			0 /	

Pese al gran número de parasitoides conocidos, la aplicación de estos en las zonas afectadas por la plaga de *C. capitata* ha demostrado ser insuficiente para llevar a cabo un control eficiente por sí solo (Bokonon-Ganta et al. 2005), por lo que generalmente el uso de esta aproximación se utiliza de manera conjunta con otras metodologías, como la técnica del macho estéril y el trampeo masivo.

Además de los parasitoides clásicos se han comenzado a realizar estudios con algunos nematodos entomopatógenos del género *Steinernema* y *Heterorhabditis*. Estos organismos han demostrado, en condiciones de laboratorio, la capacidad de infectar y producir la muerte sobre las larvas y los adultos de *C. capitata*, (Malan and Manrakhan 2009; Karagoz et al. 2009), sin embargo, se desconoce la capacidad de estos organismos para llevar a cabo un control efectivo en condiciones naturales.

1.2.3.1.2. Depredadores naturales

Otra aproximación del control biológico de plagas es la utilización de predadores naturales del insecto, los cuales se alimentan de uno o varios estadios de este, provocando un descenso en la población general. Como el uso de los organismos parasitoides, estos organismos son una buena herramienta para llevar a cabo un tratamiento conjunto con otras técnicas de control.

Aunque el número de depredadores conocidos de *C. capitata* es menor (**Tabla 2**), estos han sido utilizados con diferente nivel de éxito como control biológico de la plaga. Así, por ejemplo, en Italia, se ha llevado a cabo la introducción de *Belonuchus rufipennis* (Fabricius), procedente de Brasil (Silvestri 1945), que se estableció de manera exitosa en Sicilia, aunque sin efectos importantes sobre la población de *C. capitata*. La introducción de *Thyreocephalus albertisi* (Fauvel) en Hawái también conllevó su establecimiento en la isla, recuperándose especímenes en estudios posteriores a su liberación en los años 1940, aunque el efecto causado por este depredador por sí mismo es desconocido, debido a la implementación de un gran número de depredadores y parasitoides en el estudio de manera simultánea. En este caso, los efectos obtenidos para el control de la plaga en las islas fueron positivos (Bess et al. 1961).

Depredador	Orden	Familia	Estadio afectado	Referencia
Belonuchus rufipennis	Coleóptera	Staphylinidae	Larva y pupas	(Silvestri 1945)
Cardiastethus nazarenus (Reuter)	Hemíptera	Anthocoridae	Huevos	-
Cheiracanthium mildei (Koch)	Araneae	Cheiracanthiidae	Adultos	(Kaspi 2000)
Cyrtorhinus lividipennis (Reuter)	Hemíptera	Miridae	Huevos	(Liquido and Nishida 1985)
Linepithema humile (Mayr)	Hymenoptera	Formicidae	Larva y pupas	(Wong et al. 1984)
Solenopsis geminata (Fabricius)	Hymenoptera	Formicidae	Larvas y pupas	(Eskafi and Kolbe 1990)
Thyreocephalus albertisi (Cameron)	Coleoptera	Staphylinidae	Larvas y pupas	(Bess et al. 1961)
Vespula germánica (Fabricius)	Hymenoptera	Vespidae	Adultos	(Hendrichs et al. 1994)

Tabla 2. Principales depredadores descritos frente a diferentes estadios de *C. capitata* encontrados en la base de datos del Compendium de especies invasoras (CABI).

Además de estos organismos, estudios realizados en España han demostrado la presencia de multitud de depredadores nativos en los cultivos de cítricos (Urbaneja 2006), principal cultivo afectado por esta plaga en nuestro país. Entre ellos caben mencionar *Pardosa cribata* (Simon) (Aranae: Lycosidae), una araña frecuente en cítricos que se alimenta de individuos adultos y larvas (Monzó 2009) y *Pseudophonus rufipes* (De Geer), un coleóptero carábido que se alimenta de las pupas de *C. capitata* (Monzó et al. 2011).

1.2.3.1.3. Patógenos

Dentro del control biológico también se incluye el uso de hongos, bacterias y virus capaces de infectar y producir la muerte de los insectos, reduciendo su población o un descenso en el *fitness* del organismo a controlar, y con ello su capacidad de supervivencia a otros factores ambientales o biológicos.

Para el control de *C. capitata* se han identificado una serie de hongos entomopatógenos como *Trichoderma longibrachiatum, Penicillium oxalicum* (Elakhdar et al. 2009) o *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Quesada-Moraga et al. 2006), que son capaces de llevar a cabo la infección de los adultos, provocando un alto porcentaje de

mortalidad 90-100% tras 8-9 días después de la infección en condiciones de laboratorio (Quesada-Moraga et al. 2008).

Estos agentes patógenos han sido ensayados en estudios de campo a pequeña escala, mediante la estrategia del atrayente-contaminante, en la cual los conidios del hongo patógeno se colocan en el interior de una trampa, junto con atrayentes específicos para la plaga a tratar. Esta estrategia presenta numerosas ventajas, entre las cuales se encuentra la protección del agente activo frente al medio, aumentando así su persistencia y la especificidad producida por el uso de atrayentes específicos, permitiendo una acción dirigida.

Los adultos, al entrar en la trampa, se infectan con el hongo y posteriormente, son capaces de llevar a cabo la difusión del hongo a otros individuos de su especie por contacto, incrementándose de esta manera el efecto de este agente de control (Navarro-Llopis et al. 2015).

Los virus específicos de insectos (ISVs) también tienen un papel relevante en el control de *C. capitata.* La infección de determinados virus de insectos ha sido relacionada con cambios fisiológicos y de comportamiento en el insecto. En el caso de *C. capitata* se ha descubierto que la infección con un noravirus (CcaNV) parece afectar negativamente a los individuos de esta especie, observándose como estos presentan una reducción en su esperanza de vida (Llopis-Giménez et al. 2017). Además, recientemente se ha llevado a cabo la identificación de hasta 13 virus capaces de afectar a *C. capitata* mediante estudios del transcriptoma, aunque los efectos de estos nuevos virus sobre la supervivencia de *C. capitata* y su potencial efecto patogénico son aún desconocidos (Hernández-Pelegrín et al. 2022).

Por último, el uso de bacterias entomopatógenas para llevar a cabo el control de determinadas plagas está ampliamente extendido, principalmente por el descubrimiento de la actividad entomopatógena que posee *B. thuringiensis* y el gran éxito alcanzado en otras importantes plagas.

Debido a estos antecedentes, se ha llevado a cabo la búsqueda de cepas de *B. thuringiensis* que presentaran actividad frente a *C. capitata* (Vidal-Quist et al. 2009; Aboussaid et al. 2011) en numerosas ocasiones. Sin embargo, hasta el momento, no se ha descrito el aislamiento de ninguna cepa de *B. thuringiensis* que provoque una mortalidad significativa para llevar a cabo un control de la plaga, encontrándose mortalidades por debajo del 30%.

En el año 2015 se llevó a cabo el aislamiento de una cepa de *Bacillus cereus*, por Ruiu y colaboradores, que presentó una elevada mortalidad (82%) hacia *C. capitata*. La

toxicidad parece estar asociada a la suspensión de cultivos esporulados y no a las células vegetativas. Este efecto parece ser dependiente de la concentración del cultivo, obteniéndose una concentración letal media de esporas similar a la observada en otros estudios con *Bt*.

Para observar el efecto tóxico producido por esta cepa de *B. cereus* sobre *C. capitata* es necesario tanto el contenido proteico extracelular obtenido durante el proceso de esporulación, como la propia espora, lo que parece indicar un posible efecto sinérgico entre ambos componentes. Estudios de identificación de esta fracción proteica externa han permitido determinar la presencia de moléculas funcionales como la chaperona GroEL y enzimas degradativas como metaloproteasas y peptidasas (Ruiu et al. 2015).

Recientemente, se han llevado a cabo estudios del efecto tóxico de otro conocido agente entomopatógenos como es *Brevibacillus laterosporus*, sobre diferentes dípteros, mostrando como *C. capitata* presentó, junto a la mosca del olivo *Bactrocera oleae*, la menor susceptibilidad a este patógeno (Bedini et al. 2020).

La búsqueda de cepas entomopatógenas con actividad frente a *C. capitata* es una actividad que se sigue llevando a cabo y es una de las líneas de investigación que llevamos a cabo en nuestro grupo de investigación.

El aislamiento de una cepa bacteriana, identificada como *Bacillus pumilus*, que presentó una alta mortalidad (94%) hacia larvas de primer estadio de *C. capitata* (Molina et al. 2010), ha constituido una de las actividades de nuestro grupo de investigación durante los 12 últimos años. Esta línea de investigación ha permitido la caracterización de la cepa *B. pumilus* 15.1 a nivel genético (García-Ramón et al. 2015; Garcia-Ramon et al. 2015), microbiológico y bioquímico (Garcia-Ramon et al. 2016). Aunque la caracterización de la patogenicidad de una bacteria y la identificación del/de los factores de virulencia es un proceso lento y difícil, dado que *B. pumilus* no es una bacteria entomopatógena clásica, se prevé que su estudio permita descubrir nuevos factores de virulencia frente a insectos.

1.3. Bacillus pumilus

Bacillus pumilus es una bacteria Gram positiva, aerobia y formadora de esporas, ubicua en la naturaleza y ampliamente aislada en muestras de suelo. *B. pumilus* es una especie que presenta características que la hacen interesante, sobre todo desde un punto de vista industrial o agronómico.

Como otras especies del género *Bacillus, B. pumilus* ha sido ampliamente utilizada en la industria debido a su gran capacidad para la producción de enzimas como celulasas, liquenasas, pectato liasas o serín protesas (Priest 1977; Küppers et al. 2014). Así como el uso de algunas de sus enzimas como las xilanasas, las cuales pueden utilizarse para llevar a cabo el blanqueamiento de la pulpa en la industria del papel (Nagar et al. 2013).

Otras cepas de la especie *B. pumilus* presentan una gran actividad antibacteriana, debido a la producción de antibióticos y péptidos antimicrobianos, los cuales afectan al crecimiento de algunas bacterias potencialmente patógenas, como *Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium* o *Proteus vulgaris* (Bhate 1955; Naruse et al. 1989; Aunpad and Na-Bangchang 2007; Saggese et al. 2022).

Se ha demostrado que algunas cepas de *B. pumilus* presentan actividades beneficiosas para el crecimiento y desarrollo de algunas plantas, formando parte de su rizosfera (Gutiérrez-Mañero et al. 2001), induciendo resistencia sistémica en la planta y ayudando a prevenir la infección de determinados patógenos (Raupach and Kloepper 1998; Zhang et al. 2002; Ryu et al. 2003). También se ha demostrado como *B. pumilus* es útil para el control de diferentes enfermedades provocadas por hongos (Leifert et al. 1995; Fung et al. 2001), y como tiene capacidad de proteger a crustáceos frente a patógenos marinos (Hill et al. 2009).

B. pumilus no es considerada como una bacteria entomopatógena, y solamente existen descritos hasta el momento 3 cepas con actividad frente insectos. La cepa *B. pumilus* AQ 717, que ha sido patentada y muestra actividad frente a insectos del orden Coleóptera, particularmente del género *Diabrotica* (Heins et al. 1999). Además, se han realizado otros aislamientos de diferentes cepas identificadas como *B. pumilus* que han mostrado actividad frente a otros coleópteros como el escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*) y el escarabajo de la corteza del abeto (*Dendroctonus micans*) (Ertürk and Yaman 2008; Yaman et al. 2010). Por último, nuestro grupo de investigación describió el aislamiento de la cepa *B. B. pumilus* 15.1, con actividad frente al díptero *C. capitata* (Molina et al. 2010).

1.4. Bacillus pumilus 15.1

La cepa *B. pumilus* 15.1 fue aislada en nuestro grupo de investigación Control Biológico de Plagas y Vectores como una cepa activa a larvas de la mosca de la fruta del Mediterráneo (Molina et al., 2010), a partir de restos vegetales en descomposición recogidos en la Costa Tropical de Granada. Los cultivos esporulados de esta cepa presentan toxicidad frente a las larvas de primer estadio de *C. capitata*, pero no a adultos. Las células vegetativas de esta cepa carecen de actividad alguna frente a larvas, necesitándose el proceso de esporulación para revelar la actividad, lo que implica que el factor de virulencia principal en esta cepa se produce durante la fase esporulante, tal y como ocurre en otras bacterias entomopatógenas.

La toxicidad de *B. pumilus* 15.1 sobre las larvas de *C. capitata* solo se observa si los cultivos esporulados son previamente incubados a bajas temperaturas durante al menos 4 días. Mediante esta incubación, la cepa posee una mortalidad máxima (85-90%) frente a larvas (**Figura 9**).



Figura 9. Mortalidad sobre larvas de primer estadio de *C. capitata* causada por los cultivos de diferentes cepas de *B. pumilus* (15.1, M1 y M2), además de medio de cultivo T₃ sin bacterias. Los cultivos fueron utilizados directamente tras su crecimiento (0 h a 4°C) o incubados durante 96 h a 4°C. La mortalidad se registró a los 4 días (barras blancas), a los 10 (barras grises) y a los 14 días de iniciado el bioensayo (barras negras). Tomada de Molina et al., 2010.

Para conseguir la mortalidad de las larvas es necesario aportar al bioensayo tanto la fracción sedimento del cultivo como el sobrenadante, ya que cada una de las fracciones por separado no posee actividad, pero cuando se unen, la actividad se recupera (Molina et al. 2010).

Esta cepa fue clasificada mediante secuenciación del gen 16S ARNr como perteneciente a la especie *Bacillus pumilus,* una bacteria Gram positiva y esporulante ampliamente extendida en muestras de suelos y otros ambientes (Molina et al. 2010).

La identificación de la cepa como un miembro del grupo de *B. pumilus* despertó un gran interés, no solo porque describimos por primera vez una cepa altamente activa frente a *C. capitata*, sino porque pertenecía a una especie que no se considera un entomopatógeno clásico (Molina et al. 2010).

La caracterización a nivel microbiológico y bioquímico de esta cepa mostró que *B. pumilus* 15.1 es una bacteria motil, con una estrategia de movilidad tipo *Swarming* y que presenta una diversidad metabólica alta, siendo capaz de usar como fuentes de carbono multitud de carbohidratos y aminoácidos (Garcia-Ramon et al. 2016). *B. pumilus* 15.1 presenta dos fases bien diferenciadas de crecimiento, la célula vegetativa, de 1.4-1.9 µm de longitud y 0.49-0.5 µm de grosor, y la espora, de 1.05-1.25 µm de longitud y 0.45-0.7 µm de grosor. La estructura de la espora de *B. pumilus* 15.1 presenta una estructura típica, en la que se diferencian tanto el núcleo, como las diferentes capas externas, membrana interna, el córtex y las envueltas interna y externa. Cuando termina el proceso de esporulación, la espora se libera de la célula madre (**Figura 10**).



Figura 10. Microscopía electrónica de transmisión de las células vegetativas de *B. pumilus* 15.1 (A) y de las esporas (B) tanto en el interior de la célula madre (derecha) como libres en el medio (izquierda). Tomada de Garcia-Ramon et al., 2016.

B. pumilus 15.1 excreta al medio en su fase vegetativa una gran cantidad de proteasas extracelulares y posee actividad hemolítica en placas de agar sangre, dos hechos típicos de bacterias patogénicas (Garcia-Ramon et al. 2016), aunque no se sabe si estas dos actividades tienen relación con la actividad entomopatogénica de la cepa.

B. pumilus posee una alta capacidad de formar biopelículas, no solo en la interfase líquido-aire de un cultivo estático (Garcia-Ramon et al. 2016), sino en cultivos en agitación, lo que en ocasiones puede estar relacionado con la patogenicidad en algunas bacterias (Fraser and Hughes 1999). En cultivos en agitación, las bacterias de esta cepa forman grumos unidos por un material extracelular, posiblemente exopolisacáridos (EPS), que podría ser el responsable de la formación de biopelículas (**Figura 11**). Estas agrupaciones son especialmente patentes durante la fase estacionaria del cultivo.

Como se ha demostrado para otras bacterias patógenas, la formación de lipopolisacáridos en bacterias patógenas Gram negativas, o la formación del exopolisacárido en bacterias Gram positivas está relacionado habitualmente con el desarrollo de la patogenicidad de las bacterias. Este material extracelular participa en la adhesión de las bacterias a superficie, facilitando el contacto y el mantenimiento del patógeno con su huésped. Además, en ciertos casos, se ha demostrado como este EPS permite a las bacterias producir toxicidad (Dunphy 1994; Wang et al. 2021) o evitar o retrasar la acción de los sistemas de defensa (de Vor et al. 2020).



Figura 11. Microscopía electrónica de barrido de un cultivo de *B. pumilus* 15.1. Las imágenes se tomaron a diferentes tiempos de cultivo, 6 h (A y B), 50 h (C) y 72 h (D). Puede observarse una densa matriz extracelular que se hace más evidente a medida que pasa el tiempo. Tomada de Garcia-Ramon et al., 2016.

B. pumilus 15.1 produce cristales paraesporales electrodensos (**Figura 12**), similares a los producidos por *B. thuringiensis* y otras bacterias entomopatógenas (Yokoyama et al. 2004; Jones et al. 2007). El tamaño y la forma de estas inclusiones es muy variado, aunque la mayoría de ellos presenta una forma cuadrada o bipiramidal. Los cristales se han observado no solo en el exterior celular (**Figura 12, paneles E-H**) sino en el interior de células vegetativas (**Figura 12, paneles I y J**).



Figura 12. Microscopía electrónica de transmisión de cultivos esporulados de *B. pumilus* 15.1 mostrando diferentes morfologías y tamaños de los cristales paraesporales encontrados en esta cepa. Tomada de Garcia-Ramon et al., 2016.

El patrón proteico de un cultivo de *B. pumilus* 15.1 a lo largo del tiempo muestra que se produce un acúmulo de una proteína de 45 kDa conforme avanza el proceso de esporulación (**Figura 13**). Esta proteína puede ser separada del resto de proteínas y de las esporas del cultivo mediante un gradiente preformado de sacarosa. La visualización de la fracción que contiene la proteína de 45 kDa, corresponde a la fracción donde se encuentran los cristales, indicando que los cristales de *B. pumilus* 15.1 son de naturaleza proteica y pueden ser separados utilizando la misma metodología que se usa para separar los cristales paraesporales de *B. thuringiensis*.



Figura 13. Patrón proteico de un cultivo de *B. pumilus* 15.1 analizado mediante SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 12%. Se muestran las fracciones sedimento del cultivo a las 12 h (1), 24 h (2), 48 h (3) y 72 h (4). Se observa la aparición gradual de una proteína de 45 kDa (flecha negra) a lo largo del tiempo. All blue Precision plus de Bio-rad se utilizó como marcador de peso molecular. Tomada de Garcia-Ramon et al., 2016.

El estudio a nivel genético de *B. pumilus* 15.1 ha demostrado que esta cepa posee al menos dos elementos extracromosómicos diferentes, un plásmido de 7.78 Kb conocido como pBp15.1S (Garcia-Ramon et al. 2015) y un megaplásmido conocido como pBp15.1B, de tamaño indeterminado y aún no caracterizado. Dichos elementos extracromosómicos no están presentes en otras cepas de B. pumilus analizadas por nosotros. Dado que las bacterias de la especie B. pumilus no son entomopatógenos clásicos, podría explicarse la actividad de esta cepa mediante la adquisición de elementos móviles como plásmidos y megaplásmidos. La caracterización en detalle del plásmido pBp15.1S (Garcia-Ramon et al. 2015) ha demostrado que el plásmido posee 11 ORF putativos, de los cuales solo 3 son homólogos a genes con función conocida. El resto de ORFs no presentan similitud con ningún factor de virulencia bacteriano conocido, por lo que este plásmido se considera críptico a día de hoy. Cuatro de los ORFs del plásmido pBp15.1S presentan un péptido señal en su región N-terminal, por lo que podrían tratarse de proteínas secretadas, una característica común en determinadas toxinas bacterianas. Sin embargo, su posible relación con la toxicidad de B. pumilus15.1 no ha sido comprobada (Garcia-Ramon et al. 2015).

El genoma de *B. pumilus* 15.1 ha sido secuenciado y se encuentra parcialmente ensamblado en 63 cóntigos. El cóntigo 38 corresponde al plásmido pBp15.1S, sin embargo, el cóntigo responsable del megaplásmido pBp15.1B no se ha identificado aún, por lo tanto, se desconoce su secuencia. El análisis del genoma de *B. pumilus* 15.1 ha permitido identificar la presencia de regiones con genes homólogos a proteínas de fagos y genes codificantes de algunos conocidos factores entomopatógenos, como quitinasas, metaloproteasas o citolisinas (García-Ramón et al. 2015), las cuales podrían estar relacionadas con la patogenicidad de la cepa. No se han detectado en el genoma de *B.*

pumilus 15.1 ningún gen homólogo proteínas entomopatógenas conocidas que forman parte de los cristales paraesporales.

Dado que en el genoma de *B. pumilus* 15.1 no se encontró ningún gen homólogo a toxinas producidas por organismos entomopatógenos en forma de cristales, se procedió identificar la proteína sobreexpresada de 45 kDa mediante *Finger printing*. Esta proteína es homóloga a la enzima oxalato descarboxilasa de varios organismos. Esta es la primera vez que se ha descrito la producción de una enzima en forma de cristal paraesporal en bacterias (Garcia-Ramon et al. 2018).

Las oxalato decarboxilasas descritas en la bibliografía hasta el momento son enzimas citosólicas capaces de catalizar la conversión de oxalato a formiato y CO_2 en una reacción dependiente de O_2 y Mn^{2+} (Conter et al. 2019). La primera oxalato descarboxilasa descrita en una bacteria fue la proteína YvrK de *B. subtilis*, la cual es inducible a pH bajo, pero no por la presencia de oxalato en el medio (Tanner and Bornemann 2000). En *B. subtilis* la oxalato descarboxilasa es un homohexámero compuesto por dos unidades triméricas. La enzima pertenece a la familia de las bicupinas, ya que cada monómero presenta dos dominios cupina. El dominio I de la enzima (residuos 56-233) es responsable de la acción catalítica y el dominio II (residuos 234-379) presenta una función estructural. El residuo en la posición Glu162 del dominio I parece ser el residuo catalítico, ya que al mutarlo se elimina por completo la acción catalítica de la enzima (Just et al. 2004; Just et al. 2007).

Las enzimas oxalato descarboxilasas presentan multitud de usos biotecnológicos. En la industria del papel o en la industria cervecera, se utilizan para evitar la formación de sales de oxalato en las instalaciones (Hiatt and Owades 1987; Sjöde et al. 2008). Esta enzima se ha utilizado para el tratamiento de la hiperoxaluria, una enfermedad provocada por la acumulación y precipitación de oxalato en forma de cristales en el aparato urinario que producen la destrucción de los tejidos renales (Chang Jeong et al. 2009; Grujic et al. 2009).

La mayor parte del oxalato presente en los animales, incluyendo a los humanos proviene de la ingesta de material vegetal (Mehta and Datta 1991), ya que las plantas y sobre todo los vegetales de hoja verde, como las espinacas o el ruibarbo, presentan una gran cantidad de ácido oxálico (Prakash and Pal 1991; Guil et al. 1996), por lo que el consumo de grandes cantidades de estas plantas produce toxicidad en humanos. Estudios recientes han demostrado que la expresión heteróloga del gen de la enzima oxalato descarboxilasa procedente de *B. subtilis* protege a las células de riñón humano del daño oxidativo producido por el oxalato, lo que podría prevenir la formación de piedras de oxalato en el riñón (Albert et al. 2017). La enzima oxalato descarboxilasa nunca se ha relacionado con la patogenicidad de ningún organismo, por lo que no se considera un factor de virulencia por el momento. Sin embargo, la producción de cristales de oxalato cálcico si se ha relacionado con la patogénesis de determinados hongos (Maxwell 1973; Mäkelä et al. 2010; Dutton and Evans 2011). Algunos hongos patógenos de plantas producen cristales de oxalato, lo que le ayuda a la degradación de la lignina, debilitando las paredes celulares y ayuda en la reducción de las defensas de la planta (Mäkelä et al. 2010). Además, la síntesis de ácido oxálico produce la acidificación de los tejidos y el secuestro del calcio de las células huésped (Dutton and Evans 2011). La producción de la enzima oxalato descarboxilasa se ha relacionado con la eliminación de estos cristales de oxalato y así reducir el estrés producido por los mismos (Tanner and Bornemann 2000), observándose como la expresión heteróloga de esta enzima en plantas puede mitigar los efectos patógenos de determinados hongos (Dias et al. 2006; Pereira Menezes Reis et al. 2022).

Una característica compartida por todas las toxinas entomopatógenas que forman cristales paraesporales es la necesidad de que se lleve a cabo su solubilización para que las proteínas que los integran puedan llevar a cabo su acción. Habitualmente esto ocurre en el intestino de los insectos diana, cuando los cristales paraesporales son ingeridos con el alimento junto a las esporas. Por ejemplo, en el caso de las toxinas Cry de *B. thuringiensis,* la solubilización se produce debido al pH alcalino presente en el intestino de los insectos diana, seguida de una digestión mediante proteasas que lleva a la conformación activa de la toxina (Mendoza-Almanza et al. 2020).

El estudio de los cristales paraesporales de *B. pumilus* 15.1 ha permitido observar un comportamiento inesperado en la solubilización de los mismos. La incubación de los cristales a bajas temperaturas (-20°C durante 96 h) es el procedimiento que solemos utilizar para liberar las proteínas que los integran, principalmente la oxalato descarboxilasa de 45 kDa (Garcia-Ramon et al. 2016). Este sorprendente comportamiento está en concordancia con la necesidad de incubar el cultivo de *B. pumilus* 15.1 a bajas temperaturas para que este produzca mortalidad frente a las larvas de *C. capitata,* por lo que aparentemente, los cristales paraesporales codificados por la cepa *B. pumilus* 15.1 reúnen ciertas características que los hacen un buen candidato a explicar la toxicidad encontrada en esta cepa bacteriana.

El conocimiento actual sobre la cepa *B. pumilus* 15.1 es aún muy limitado. Quedan muchos aspectos que describir de la cepa y muchas incógnitas por resolver para entender cuál es el mecanismo de toxicidad hacia larvas de *C. capitata*. Conocer el mecanismo de acción de *B. pumilus* 15.1 es un objetivo muy ambicioso, y aunque es el objetivo final de la línea de investigación, esta tesis no ha podido abordarlo completamente. Sin embargo, esta tesis constituye un avance relevante en el conocimiento de la cepa *B. pumilus* 15.1, ya que se ha procedido a la búsqueda de

determinados elementos presentes en el genoma de *B. pumilus* 15.1 y se ha evaluado su contribución individual en el mecanismo general de patogénesis. Aunque al inicio de esta tesis éramos conscientes de que el resultado podría no ser satisfactorio, la realización de la misma era necesaria, y ha permitido adquirir conocimientos muy valiosos sobre *B. pumilus* 15.1.

Objetivos
2. Objetivos

El objetivo general de esta tesis doctoral fue la búsqueda de potenciales factores de virulencia en la cepa entomopatógena *B. pumilus* 15.1 que pudieran explicar la toxicidad observada frente a larvas de *C. capitata*.

Para el desarrollo de este objetivo general nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1. Caracterizar la enzima oxalato descarboxilasa que *B. pumilus* 15.1 sobreexpresa durante su fase de esporulación en forma de cristales paraesporales y evaluar su relación con la toxicidad observada en larvas de *C. capitata.*
- Identificar posibles factores de virulencia presentes en el genoma de *B. pumilus* 15.1 mediante análisis comparativos y bioinformáticos, subclonarlos y sobreexpresarlos en sistemas heterólogos y evaluar su relación con la toxicidad hacia larvas de *C. capitata*.
- 3. Caracterizar una región del genoma de *B. pumilus* 15.1 con alto contenido en genes homólogos de fagos, con objeto de buscar potenciales factores de virulencia.

Materiales y Métodos

3. Materiales y Métodos

3.1. Medios de cultivo y soluciones

3.1.1. Medios de cultivo (por orden alfabético)

- Medio BHI (Infusión de cerebro y corazón): 37 g/l. Esterilizado mediante calor húmedo (121°C, 1 atm durante 20 min). Millipore, Ref. 53286.
- Medio de recuperación de células después de electroporación: Medio LB suplementado con 0.5 M de sorbitol y 0.38 M de manitol.
- Medio LB: Triptona, 10 g/l; NaCl, 10 g/l; Extracto de levadura, 5 g/l; Agar, 15 g/l (en caso de ser necesario sólido). Esterilizado mediante calor húmedo (121°C, 1 atm durante 20 min).
- Medio T₃: Triptona, 3 g/l; Triptosa, 2 g/l; Extracto de levadura, 1.5 g/l; NaH₂PO₄, 0.05 M; pH 6.8. Esterilizado mediante calor húmedo (121°C, 1 atm durante 20 min). Una vez autoclavado se añadió MnCl₂, 5 mg/l, previamente esterilizada mediante filtración.
- Medio TFB1: Acetato de potasio, 30 mM; MnCl₂, 50 mM; KCl, 100 mM; CaCl₂, 10 mM; pH 5.8. Esterilizado mediante filtración a través de filtro de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.22 μm.
- Medio TFB2: NaMOPS, 10 mM; CaCl₂, 75 mM; Glicerol, 15% v/v, pH 6.8.
 Esterilizado mediante filtración a través de filtro de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.22 μm.
- Medio TSB: 30 g/l. Esterilizado mediante calor húmedo (121°C, 1 atm durante 20 min). Millipore, Ref. T8907.
- Medio TYM: Triptona, 20 g/l; Extracto de levadura, 5 g/l; NaCl, 1 g/l; MgCl₂, 0.1 g/l; esterilizado mediante calor húmedo (121°C, 1 atm durante 20 min).
- Top Agarosa: LB líquido suplementado con Agarosa, 6 g/l. Esterilizado mediante calor húmedo (121°C, 1 atm durante 20 min).

3.1.2. Soluciones

- Solución concentradora geles SDS-PAGE (5%): Acrilamida, 5% (p/v); Tris, 0.13 M pH 6.8; SDS, 1% (p/v); Persulfato de Amonio, 1% (p/v); TEMED, 0.04% (v/v)
- Solución de tinción de geles SDS-PAGE: Metanol, 40% (v/v); ácido acético, 10% (v/v); azul de Coomassie 0.05% (p/v) (Brillant Blue-250, Sigma) en H₂O destilada.
- Solución I extracción de ADN plasmídico: Glucosa, 50 mM; Tris-Cl (pH 8.0), 25 mM; EDTA (pH 8.0), 10 mM. Esterilizada mediante calor húmedo (121°C, 1 atm durante 20 min).
- Solución II extracción de ADN plasmídico: NaOH, 0.2 N (recién diluida a partir de un stock 10 N); SDS, 1% (p/v).

- Solución III extracción de ADN plasmídico: Acetato potásico, 3 M; Ácido acético glacial, 11.5 % (p/v) en H₂O destilada.
- Solución para desteñir geles SDS-PAGE: Propanol, 10% (v/v); Ácido acético, 10% (v/v) en H₂O destilada.
- Solución separadora de geles SDS-PAGE (12%): Acrilamida, 12%; Tris, 0.37 M pH
 8.8; SDS, 1% (p/v); Persulfato de amonio, 1% (p/v); TEMED, 0.04% (p/v).
- Tampón de carga de muestras proteicas (5x): Tris-HCl pH 6.8, 250 mM; SDS, 10% (p/v); Glicerol, 30% (v/v); β-Mercaptoetanol, 5% (v/v); Azul de bromofenol, 0.02% (p/v).
- Tampón de carga para muestras de ADN (6X): Glicerol, 30% (v/v); Azul de bromofenol, 0.25% (p/v); Xileno cianol, 0.25% (p/v).
- Tampón de lisis para el método *Toothpick*: NaOH, 0.05 M; EDTA pH 8, 5 mM; SDS
 0.25 % (p/v); Ficoll, 87.5 g/l; Azul de bromofenol, 0.01% (p/v).
- Tampón de parada del ensayo enzimático de la OxdD: Na₂HPO₄, 160 mM pH 9.5.
- Tampón de reacción de la formiato deshidrogenasa: Na₂HPO₄ 50 mM; NAD⁺, 34 mM pH 7.8
- Tampón de reacción de la OxdD: Tampón citrato (Citrato de sodio dihidratadoácido cítrico), 50 mM pH 4.
- Tampón PBS: NaCl, 138 mM; KCl, 3 mM; Na₂PO₄, 8.1 mM; KH₂PO₄, 1.5 mM; pH
 7.4. Esterilizado mediante calor húmedo (121°C, 1 atm, durante 20 min).
- Tampón SM: NaCl, 100 mM; MgSO₄, 10 mM; Tris, 50 mM; Gelatina, 0.01% (p/v);
 pH 7.5. Esterilizado mediante calor húmedo (121°C, 1 atm, durante 20 min).
- Tampón TAE: Tris-base, 40 mM; EDTA, 1 mM; Ácido acético, 19 mM; pH 7.
- Tampón TBE: Tris-base, 90 mM; Ácido bórico, 90 mM; EDTA, 10 mM; pH 8.
- Tampón TES: Tris, 30 mM; EDTA, 5 mM; NaCl, 50 mM, pH 8.

3.1.3. Dietas para el mantenimiento de insectos

- Dieta artificial de larvas de *Ceratitis capitata*. Salvado de trigo grueso, 200 g;
 Sacarosa, 50 g; Levadura de cerveza, 25 g; Nipagín, 2 g; Nipasol, 2 g; HCl, 7.5 ml;
 H₂O, 500 ml.
- Dieta artificial para bioensayos de larvas de *C. capitata*. Mezclar justo antes de su uso.
 - Solución A. Salvado de trigo fino, 26 g; Sacarosa, 10 g; Levadura de cerveza, 5 g; HCl 37%, 0.75 ml; H₂O, 50 ml. Esterilizado mediante calor húmedo (121°C, 1 atm durante 20 min).
 - Solución B. Agar, 0.8 g; H₂O, 50 ml. Esterilizado mediante calor húmedo (121°C, 1 atm durante 20 min).
- Dieta artificial de adultos de *C. capitata.* 4 partes de sacarosa molida en un mortero y 1 parte de levadura autolisada.

3.2. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

3.2.1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas durante la realización de esta tesis, junto a sus características más importantes, se describen en la **Tabla 3**.

Especie	Сера	Genotipo/ Características	Referencia	Origen	Comentarios
Escherichia coli	DH5a	F– φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK–, mK+) phoA supE44 λ–thi- 1 gyrA96 relA1	(Hanahan 1983)	Thermo Scientific	-
E. coli	BL21 (DE3)	F–ompT hsdSB (rB–, mB–) gal dcm (DE3)		Novagen	-
Bacillus pumilus	15.1	Hemolisina +, Proteasa +	(Molina et al. 2010)	Nuestra colección	Aislada a partir de restos vegetales en descomposi- ción
B. pumilus	15.1C	Derivada de la cepa 15.1 curada de elementos extracromosómicos mediante tratamiento con naranja de acridina	(Garcia- Ramon et al. 2018)	Nuestra colección	-
B. subtilis	168	trpC2	(Burkholder and Giles 1947)	Nuestra colección	Derivada de la cepa Marburg
B. pumilus	M1	-	(Uad et al. 2007)	Dr. Calvo UGR	Cepa degradadora de compuestos aromáticos
B. pumilus	M2	-	(Uad et al. 2007)	Dr. Calvo UGR	Cepa degradadora de compuestos aromáticos
B. thuringiensis	kurstaki	-	CECT 4454	Nuestra colección	-

Tabla 3. Cepas bacterianas utilizadas durante la realización de la tesis.

B. cereus	569	Hemolisina +, Proteasa +	(Kogut et al. 1956)	Prof. Ellar Univ. Cambridge	-
Microbacterium sp.	-	-	-	Dr. Martínez Bueno UGR	-
Lactococcus garvieae	-	-	-	Dr. Martínez Bueno UGR	-
Lactococcus lactis	NZ9000	MG1363; pepN::nisRK	(Kuipers et al. 1998)	Dr. Martínez Bueno UGR	Cepa de expresión
Listeria innocua	Seeliger 1983	-	-	Dr. Martínez Bueno UGR	CECT 4030 Medio BHI

3.2.2. Condiciones de cultivo

Para el cultivo rutinario de la mayor parte de las cepas bacterianas se utilizó medio líquido LB. Los cultivos se mantuvieron en agitación a 240 rpm y 30°C de temperatura en un agitador orbital MaxQ 8000 de *Thermo scientific*, excepto en el caso de las cepas de *E. coli, Lactococcus* y *Listeria*, que se incubaron a una temperatura de 37°C. El cultivo de las cepas de *Lactococcus* y *Listeria* se realizó en el medio TSB (*Tryptic Soy broth*) suplementado con glucosa al 1%, manteniendo las mismas condiciones de agitación y temperatura mencionadas con anterioridad.

Cuando fue necesario llevar a cabo la esporulación de los cultivos de *Bacillus*, las bacterias fueron cultivadas en medio T₃, durante al menos 72 h.

Las cepas bacterianas fueron mantenidas en cultivos en placa sembrados por agotamiento durante periodos cortos de tiempo (alrededor de 1 mes) y conservadas a 4°C.

Cuando fue necesario, el medio de cultivo fue suplementado con los antibióticos adecuados según la cepa. En la **Tabla 4** se detallan los antibióticos utilizados y las concentraciones de las soluciones stock y de trabajo usados en la realización de esta tesis.

Tabla 4. Antibióticos usados en la realización de esta tesis, junto a las concentraciones de stock y de trabajo, así como su mecanismo de acción.

Antibiótico (Abreviatura y casa comercial)	Concentración Stock	Concentración de Trabajo	Mecanismo de acción
Ampicilina (Amp) (Roche) _{Ref. 10835242001}	100 mg/ml en H ₂ O	100 μg/ml	Se une a la subunidad 50S ribosomal e inhibe la unión ribosoma- péptido.
Sulfato de Kanamicina (Km) (Millipore) _{Ref. 420411}	50 mg/ml en H₂O	50 μg/ml	Interactúa con al menos tres proteínas ribosomales inhibiendo la síntesis proteica, e incrementando los errores en la traducción.

3.2.3. Criopreservación de los cultivos bacterianos

El mantenimiento de las cepas bacterianas durante periodos largos de tiempo se realizó a -80°C en una solución de glicerol al 40%. Para ello, las bacterias fueron cultivadas en 5 ml de medio LB, suplementado en caso necesario con el antibiótico correspondiente, e incubadas en agitación a 240 rpm durante toda la noche a la temperatura óptima de crecimiento en función de la bacteria.

A la mañana siguiente, se mezclaron en crioviales, 900 μ l del cultivo con 900 μ l de una solución de glicerol al 80% en H₂O_d, esterilizada previamente mediante calor húmedo, en un autoclave vertical Raypa AES-75. Tras la homogenización, la suspensión bacteriana fue almacenada a -80°C hasta su uso.

3.2.4. Aislamiento de cepas bacterianas a partir de muestras de suelo.

Las muestras de suelo se obtuvieron de 3 localidades con características edafológicas diferentes, i) Málaga Este, España, suelo arcilloso con vegetación silvestre compuesta por plantas de porte bajo (36°.73'N, -4.3°20' W), ii) Granada, España, suelo rico en materia orgánica, zona con plantas ornamentales (37°.18'N, -3°.61'W) y iii) Almería, España, suelo arenoso, desprovisto de vegetación (37°.38'N, -2°.14'W). Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente y oscuridad hasta su uso.

Para el aislamiento de las bacterias esporulantes presentes en las muestras de suelo se colocó 1 g de suelo en 50 ml de PBS estéril y se incubó en agitación durante 2 h. A

continuación, se decantaron las partículas en suspensión y se filtró el sobrenadante a través de papel de filtro estéril. El filtrado se incubó a 70°C durante 10 min para eliminar las bacterias vegetativas y se realizaron diluciones seriadas y siembras en placas de LB agar para realizar una cuantificación. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 12-16 h hasta la obtención de colonias aisladas, las cuales fueron cuantificadas.

3.2.5. Preparación de bacterias competentes mediante el método del CaCl₂

La preparación de bacterias de *E. coli* competentes para la transformación con ADN exógeno se obtuvieron mediante el método conocido como el método del CaCl₂. Para ello, se inocularon 100 ml de medio TYM con un precultivo de 16 h de la cepa de *E. coli* de interés en medio LB. El cultivo fue incubado a 37°C y 240 rpm hasta que alcanzó una D.O. _{600 nm} de aproximadamente 0.5.

A continuación, el cultivo se centrifugó a 3.500x g durante 5 min a 4°C y el pellet se resuspendió en 15 ml de medio TFBI (enfriado en hielo previamente). Posteriormente, la suspensión bacteriana se incubó en hielo durante 15 min y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Por último, el *pellet* se resuspendió en 2 ml de medio TFBII frío y se mantuvo 15 min en hielo. La suspensión bacteriana se separó en fracciones alícuotas de 200 μ l en tubos Eppendorff, que se almacenaron a -80°C hasta su uso.

3.2.6. Preparación de bacterias susceptibles a la transfección con bacteriófagos

Para la obtención de bacterias susceptibles a ser transfectadas por bacteriófagos o por Partículas Similares a Fagos (PSFs) se utilizó un protocolo establecido para el fago lambda (Schwartz 1975; Braun and Krieger-Brauer 1977). Para ello, se partió de un precultivo de 5 ml en medio LB de la cepa indicadora a ensayar, manteniéndolo durante 12-16 h a la temperatura óptima de crecimiento. El precultivo sirvió para inocular 50 ml de medio LB, suplementado con 500 µl de MgSO₄ 1 M y 500 µl de maltosa al 20% (p/v), que se incubó bajo condiciones estándar hasta alcanzar una D.O. _{600 nm} en torno a 0.5, medida en un Nanodrop One^c de Thermo Scientific.

A continuación, las bacterias se recuperaron mediante centrifugación a 4.000x g durante 15' y 4°C, en una centrífuga Sorval ST16R (Thermo Scientific Ref. 75004380) con un rotor TX-400 (Thermo Scientific Ref. 75003629) y se resuspendieron en 25 ml de MgSO₄ 10 mM, para favorecer la adsorción del fago a la bacteria. Las bacterias obtenidas mediante este método fueron utilizadas en las dos horas siguientes a su obtención y desechadas pasado este tiempo, al tratarse de bacterias esporulantes.

3.2.7. Cuantificación de las unidades formadoras de colonias (CFU) mediante dilución seriada y siembra en placa

Cuando fue necesario cuantificar el número de bacterias presentes en un cultivo bacteriano o suspensión bacteriana, se llevaron a cabo diluciones seriadas (10⁻²-10⁻⁸), tras lo cual, 100 µl de cada una de las diluciones se sembraron en placas de LB sólido con ayuda de un asa de Digralsky. Posteriormente, las placas fueron incubadas a la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria en cuestión durante toda la noche. Tras la incubación, se contó el número de colonias en aquellas placas que contuvieron entre 30 y 300 colonias y se calculó el número de unidades formadoras de colonias (CFU), teniendo en cuenta la dilución sembrada mediante la siguiente fórmula:

$\textit{UFC} = rac{N^{\circ} \ \textit{de colonias} \ imes \textit{Factor de dilución}}{\textit{Volumen sembrado}}$

3.3. Plásmidos

A continuación, se detallan los plásmidos utilizados durante la realización de esta tesis doctoral, así como sus características principales.

3.3.1. pUC19

pUC19 (Thermo Scientific, Ref. SD0061) es un vector de clonación, de 2.686 pb, de la familia de vectores pUC, que deriva del plásmido pMB1, pero que presenta modificaciones tanto en el gen *rop*, como en el origen de replicación (grupo de incompatibilidad A), lo que permite la producción de un elevado número de copias del plásmido (1000-3000 por genoma).

pUC19 presenta además un gen de resistencia a ampicilina (**Figura 14**) y un sitio de clonación múltiple en la región codificante de la subunidad alfa de la β -galactosidasa, lo que facilita la identificación por color (blancas/azules) de las colonias que han adquirido un plásmido recombinante, cuando son sembradas en placas suplementadas con IPTG y X-Gal (Yanisch-Perron et al. 1985).



Figura 14. Mapa circular del vector pUC19. En amarillo se representa el origen de replicación, derivado (con ligeras modificaciones) del origen de replicación pMB1, responsable del alto número de copias. En verde se representa el gen de resistencia a la Ampicilina, que codifica una β-lactamasa responsable de la resistencia a este antibiótico. En burdeos se representa el fragmento alfa del gen *lacZ*. Por último, el sitio de clonación múltiple (MCS) se encuentra representado en celeste y flanqueado por los cebadores M13, propios de los plásmidos pUC (representados en morado). El MCS se encuentra en el interior del fragmento alfa del gen *lacZ*, lo que permite diferenciar los clones que presenten una inserción mediante la diferenciación de colonias blancas/azules. El sentido de las flechas indica el sentido de la transcripción de cada gen.

3.3.2. pET28a(+)

Plásmido de expresión en bacterias (Novagen, Ref. 69864-3) de 5.369 pb, con el origen de replicación del plásmido pBM1, derivado de pBR322, que mantiene un alto número de copias (entre 100 y 300 por genoma) y pertenece al grupo de incompatibilidad A. Presenta un gen de resistencia a Kanamicina (**Figura 15**), un sitio de clonación múltiple (MCS) aguas abajo del promotor de la ARN polimerasa del fago T7. El MCS se encuentra flanqueado por etiquetas de Histidina, y existe un sitio de reconocimiento y digestión de la trombina aguas arriba del MCS.

Además, pET28a contiene el gen *lacl*, represor del operón *lac* y un origen de replicación derivado del fago f1, que permite la replicación y empaquetado de ADN de cadena simple en partículas de fago con la ayuda de fagos auxiliares(Rosenberg et al. 1987).



Figura 15. Mapa circular del vector pET28a (+). En amarillo se representan el origen de replicación derivado de pBR322, responsable del mantenimiento de un alto número de copias, así como el origen del fago f1, para el empaquetado de ADN de cadena simple con fagos auxiliares. En verde se representa el gen de resistencia a la Kanamicina y en burdeos el gen *lacl*, represor del promotor del operón *lac*. Por último, el sitio de clonación múltiple (MCS) se encuentra representado en celeste, flanqueado por dos etiquetas de Histidina, una de ellas, la que se encuentra aguas arriba al MCS, tiene un sitio de reconocimiento y escisión para trombina. El sentido de las flechas indica el sentido de la transcripción de cada gen.

3.3.3. pGEM-T

Vector linealizado que forma parte del kit pGEMT-Easy de Promega (Ref. A1360). Sistema útil para la clonación directa de productos de PCR producidos mediante polimerasas que generan adeninas colgantes en los extremos 3'. El vector presenta una timidina colgante en ambos extremos 3' del sitio de inserción. Esto permite la clonación directa de productos de PCR y dificulta la recircularización del vector.

Además, contiene los promotores de la ARN polimerasa del fago T7 y SP6 flanqueando un sitio de clonación múltiple (MCS) en la región del gen *lacZ*, que codifica para la subunidad alfa de la enzima β -galactosidasa (**Figura 16**), permitiendo la selección por color de colonias en las cuales se ha producido la inserción. Las colonias serán blancas, si han adoptado el inserto, y azules si poseen el vector vacío, cuando se siembren en placas suplementadas con IPTG y X-GAL.

Por último, el plásmido presenta el origen de replicación pBM1, relacionado con los vectores pUC, y contiene un gen de resistencia a la Ampicilina y el origen de replicación derivado del fago f1, que permite la replicación y empaquetado de ADN de cadena simple en partículas de fagos auxiliares.



Figura 16. Mapa circular del vector pGEM®-T Easy. En amarillo se representa el origen de replicación, derivado del origen pBM1, así como el origen del fago f1, para el empaquetado de la región codificante en fagos auxiliares. En verde se representa el gen de resistencia a la Ampicilina, junto con su promotor (en blanco). En burdeos se representa el fragmento alfa del gen *lacZ*. Por último, el sitio de clonación múltiple (MCS) se encuentra representado en celeste y flanqueado por los cebadores M13, propios de los plásmidos pUC (morado). El MCS se encuentra en el interior de la región codificante de la subunidad alfa del gen *lacZ*, lo que permite diferenciar los clones que presenten una inserción o no mediante el color blanco/azul. El sentido de las flechas indica el sentido de la transcripción.

3.4. Bacteriófagos y partículas similares a fagos

3.4.1. Inducción de fagos o partículas similares a fagos a partir de cultivos bacterianos.

Para la obtención de bacteriófagos o partículas similares a fagos (PSF) presentes en el genoma de *Bacillus* (profagos o fagos lisogénicos), se llevó a cabo la inducción de cultivos bacterianos mediante Mitomicina C (Roche, Ref. 10107409001), antibiótico y anticancerígeno que inhibe la síntesis de ADN, mediante su unión a la molécula de ADN,

impidiendo así su replicación. Para ello, se inoculó medio LB con un precultivo incubado durante 12-16 h de la cepa de interés a 30°C y agitación a 240 rpm. Una vez alcanzado una D.O. _{600 nm} de aproximadamente 0.4, se añadió al cultivo Mitomicina C a una concentración final de 0.5 µg/ml. El cultivo se mantuvo en agitación hasta que se observó la lisis del mismo (D.O. _{600 nm} <0.2). En ese momento, se añadió cloroformo a una concentración final del 2% (v/v), y se incubó el lisado durante otros 20 min bajo las mismas condiciones.

Una vez finalizada la incubación, los lisados se conservaron a 4°C hasta su uso posterior.

3.4.2. Precipitación de fagos y partículas similares a fagos mediante Polietilenglicol (PEG).

Los fagos y PSFs fueron concentrados y parcialmente purificados del resto de componentes del lisado bacteriano mediante una precipitación con polietilenglicol, siguiendo una metodología descrita anteriormente (Yamamoto et al., 1970) con pequeñas modificaciones. Los lisados bacterianos se centrifugaron dos veces a 4.000x g durante 30 min, para eliminar restos del cultivo bacteriano. A continuación, se llevó a cabo una incubación (30 min a 37°C) del sobrenadante con ADNasa (Sigma-Aldrich, Ref. DN25) y ARNasa (Sigma-Aldrich, Ref. R4875) a una concentración de 1 µg/ml, para eliminar el ADN Y ARN bacterianos presentes en el sobrenadante. Tras ello, se añadió NaCl sólido hasta una concentración final 1 M, y se incubó 1 h en hielo. Tras esta incubación, las muestras se centrifugaron a 12.000x g durante 30 min, en una centrífuga Beckman Coulter Avanti[®] J-30I, usando un rotor de ángulo fijo JA-30.50 Ti (Beckman Coulter, Ref. 363420). Al sobrenadante resultante se le añadió PEG 8000 sólido hasta una concentración final del 10% (p/v) y se incubó durante un mínimo de 1 h. Tras ello, se procedió a una centrifugación a 12.000x g durante 30 min, para precipitar los fagos y PSFs. El sedimento obtenido se resuspendió, mediante agitación suave, en un volumen de medio SM equivalente a 1/400 del volumen de cultivo inicial. Tras la resuspensión se añadió el mismo volumen de cloroformo, se vortexeó y se centrifugó durante 10 min a 16.700x g a temperatura ambiente, en una centrífuga de mesa Eppendorf 5418. Tras la centrifugación, se recogió la fase acuosa superior, donde se encontraron los fagos y las PSFs, con cuidado de no distorsionar el material presente en la interfase. La suspensión de fagos y PSFs se almacenó a 4°C hasta su uso.

3.4.3. Purificación de fagos y partículas similares a fagos mediante ultracentrifugación.

En ocasiones, los fagos y PSFs fueron parcialmente purificados y concentrados mediante ultracentrifugación a 100.000x g. Para ello los lisados se centrifugaron dos veces a 4.000x g durante 15 min, para eliminar los restos celulares, y el sobrenadante se incubó con ADNasa y ARNasa a una concentración de 10 μg/ml, para eliminar los ácidos

nucleicos bacterianos. A continuación, los sobrenadantes se filtraron a través de filtros de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.2 μm. Por último, se llevó a cabo una centrifugación a 100.000x g durante 90 min, en una centrífuga Beckman Coulter Avanti[®] J-30I, con un rotor de ángulo fijo JA-30.50 Ti (Beckman Coulter, Ref. 363420), para precipitar los fagos y los PSF. Los sedimentos o *pellets* obtenidos fueron resuspendidos en un volumen de medio SM equivalente a 1/400 del volumen de cultivo inicial, mediante agitación suave.

3.4.4. Purificación de fagos y partículas similares a fagos mediante gradiente de sacarosa.

Cuando fue necesario llevar a cabo una purificación mayor de los fagos o PSFs, la suspensión de fagos concentrados, obtenidos mediante precipitación con PEG, se colocaron sobre un gradiente discontinuo y preformado de sacarosa en medio SM (60-67-75 y 83% (p/v)). El gradiente fue ultracentrifugado a 53.000x g durante 16 h en un rotor oscilante Beckman JS 24.38 (Beckman Coulter, Ref. 360743). Del gradiente, se obtuvieron diferentes fracciones, que fueron recolectadas desde la parte superior del tubo con la ayuda de una pipeta Pasteur, y lavadas tres veces en medio SM para eliminar la sacarosa. Finalmente, los *pellets* se resuspendieron en medio SM, de forma que se concentraron 4 veces con respecto a la muestra original. Las fracciones se analizaron mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, para determinar en cuál de ellas se encontraban los fagos.

3.4.5. Estudio de la capacidad de lisis de los fagos mediante ensayo en gota sobre una sobrecapa de Top Agarosa

El estudio de la capacidad de lisis de cepas bacterianas de los fagos y PSFs bajo estudio se llevó a cabo mediante un ensayo en gota o *spot test*, tal y como estableció Bradley (1967), con pequeñas modificaciones. La cepa bacteriana indicadora se cultivó tal y como se describió en el apartado 3.2.6 de Materiales y Métodos. A continuación, 200 µl de la suspensión bacteriana obtenida fueron mezclados con 6 ml de Top Agarosa atemperada a 42°C. Tras su homogeneización mediante agitación suave, para evitar la formación de burbujas, se vertieron sobre placas de LB previamente preparadas.

Una vez solidificada la Top Agarosa, se dispuso una gota de 10 μ l de la suspensión de fago/PSF a ensayar, y se dejó secar en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Las placas fueron posteriormente incubadas durante toda la noche a 30°C. A la mañana siguiente, se registró la presencia/ausencia de una zona clara en la zona donde se dispuso la gota, provocada por la acción del fago sobre la cepa bacteriana.

3.4.6. Estudio de la capacidad de lisis de los fagos sobre estría

Cuando fue necesario llevar a cabo un rastreo a gran escala del rango de acción de las partículas de fago/PSF sobre las cepas bacterianas, se utilizó el método de ensayo sobre estría. Para este rastreo se utilizó la colección de bacterias obtenidas a partir de muestras de suelo, tal y como se indica en el apartado 3.2.4 de Materiales y Métodos. Para ello, se inocularon 5 ml de medio LB con las cepas bacterianas a ensayar y se incubaron durante toda la noche en agitación a 30°C, tal y como se indica en el apartado 3.2.2 de Materiales y Métodos. Estos precultivos fueron utilizados para realizar estrías sobre placas de LB agar, con la ayuda de palillos estériles. Las placas se incubaron con la tapadera levantada en una cámara de flujo laminar, hasta que el líquido aplicado fue completamente absorbido. A continuación, se dispuso una gota de 2 µl de la suspensión de fagos o PSFs concentrados mediante PEG sobre la estría y se dejó secar. Tras ello se incubó la placa durante toda la noche a 30°C y se examinó al día siguiente en busca de la inhibición del crecimiento bacteriano.

3.4.7. Ensayo de adhesión de fagos o PSFs a cepas susceptibles

La capacidad de unión de los PSFs (o fagos) a diferentes cepas bacterianas, se determinó mediante ensayos de adhesión.

Para ello, se inocularon 50 ml de LB con cada una de las bacterias a ensayar, y se incubaron a 30°C y en agitación hasta que el cultivo alcanzó una D.O. _{600 nm} de aproximadamente 1. En este momento, el cultivo se centrifugó y se lavó tres veces en medio SM. A continuación, el sedimento se resuspendió en 1 ml de medio SM y se procedió a la cuantificación del número de cfu/ml mediante diluciones seriadas y plaqueo, tal y como se detalla en el apartado 3.2.7 de Materiales y Métodos.

Las PSFs, obtenidas a partir de un cultivo de 50 ml inducido con Mitomicina C, fueron concentradas mediante ultracentrifugación a 100.000x g, tal y como se describe en el apartado 3.4.3. de Materiales y métodos.

A continuación, 50 μ l de una suspensión bacteriana, conteniendo 1 x 10⁸ UFC/ml, fue incubada durante 10 min a 37°C con el mismo volumen de la suspensión de PSFs, concentrada mediante PEG y obtenida como se indica en el apartado 3.4.2. Tras la incubación, se llevó a cabo una centrifugación a 16.000x g durante 2 min, para eliminar las bacterias y los complejos bacteria-PSF. A continuación, los sobrenadantes obtenidos fueron analizados mediante SDS-PAGE.

Las proteínas mayoritarias de las PSFs, presentes en los sobrenadantes, se cuantificaron en un equipo ChemiDoc de BioRad, usando un patrón de BSA. La cantidad de cada proteína se comparó con las presentes en la muestra control, en la que la suspensión de PSFs fue incubada sin bacterias. La capacidad de unión de las PSF a las bacterias se infirió considerando la diferencia entre cada muestra y el control.

3.4.8. Titulación del número de bacteriófagos mediante ensayo en placa

Doscientos microlitros de bacterias susceptibles a la transfección, obtenidas tal y como se detalla en el apartado 3.2.6 de Materiales y Métodos, se mezclaron con 200 µl de las diferentes diluciones del bacteriófago o PSFs a titular y se incubaron durante 20 min en un baño termostatizado a 37/30°C. Tras este tiempo de incubación, la mezcla se añadió a 6 ml de Top Agarosa fundida y atemperada a 42°C, que, tras mezclarse mediante agitación suave para no formar burbujas, se dispusieron sobre una placa de LB agar. Una vez solidificada, la placa se incubó a 37/30°C durante toda la noche. A la mañana siguiente se procedió a la cuantificación de las calvas de lisis producidas en la sobrecapa de la bacteria indicadora. El número de Partículas Formadoras de Placas por ml de suspensión (UFP/mI) se calculó mediante la siguiente fórmula.

$$\frac{UFP}{ml} = \frac{N^{\underline{o}} \ de \ placas}{ml \ sembrados} \times \frac{1}{Factor \ dilución}$$

3.4.9. Visualización de fagos o PSFs mediante Microscopía Electrónica de Transmisión.

Las partículas similares a fagos (PSFs) y fagos, obtenidos tras la inducción de diferentes cultivos de *Bacillus*, se observaron mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), tras realizar una tinción negativa. Un mililitro de un lisado, obtenido tras la inducción con Mitomicina C (u otro método), se centrifugó, y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.2 µm. La fijación de las muestras se realizó en rejillas con cobertura de carbono, mediante el secado de una gota de muestra sobre el soporte. Para ello, se dispuso una gota de la suspensión de fago/PSF sobre la rejilla y se dejó secar. A continuación, se hicieron dos lavados, de 1 min cada uno con H₂O miliQ, y se procedió a su tinción, con una solución del 1% de acetato de uranilo, durante 1 min. La tinción negativa se realizó en el Centro de Instrumentación de la Universidad de Granada (CIC). Posteriormente, las muestras fueron examinadas en un microscopio electrónico de transmisión LIBRA 120 PLUS de Carl Zeiss SMT.

3.5. Aislamiento, manipulación y análisis de ADN

3.5.1. Extracción de ADN total

La extracción de ADN total (ADNt) a partir de cepas *Bacillus* se llevó a cabo tal y como describen Reyes-Ramírez e Ibarra (2008) para *B. thuringiensis*, con algunas modificaciones introducidas por nuestro grupo con anterioridad (García-Ramon *et al.*, 2015). El cultivo bacteriano se llevó a cabo en medio LB en lugar de medio Spizizen. Para ello, un precultivo de 5 ml en medio LB se utilizó para inocular 50 ml de medio LB, cultivo que fue incubado a 30°C y 240 rpm hasta alcanzar una D.O. _{600 nm} entre 0.9 y 1.1. A continuación, las bacterias se recolectaron mediante centrifugación a 20.200x g en una centrífuga Beckman Coulter Avanti[®] J-30I, con un rotor de ángulo fijo JA-30.50 Ti (Beckman Coulter, Ref. 363420) durante 15 min a 10°C. El sedimento fue resuspendido en 20 ml de tampón TES, enfriado previamente en hielo, y centrifugado nuevamente en las mismas condiciones. Las bacterias se resuspendieron en 2 ml de tampón de lisis (Tampón TES con 20% sacarosa, 2 mg/ml de lisozima de clara de huevo (Sigma, Ref. 62970), y ARNsa a una concentración final de 1 µg/ml) y se incubaron a 37°C durante al menos 90 min.

La suspensión de esferoplastos fue suplementada con 3 ml de una solución al 8% de Sodio Dodecil Sulfato (SDS) en tampón TES e incubada durante 10 min a 68°C, tras lo cual se añadió 1.5 ml de una solución 3M de acetato de sodio a pH 4.8 y se incubó durante 30 min a -20°C para precipitar restos bacterianos. La mezcla se centrifugó dos veces, a 20.200x g durante 30 min a 10°C, hasta conseguir un sobrenadante traslúcido. Por último, el sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de nitrocelulosa de 0.22 µm, mezclado con dos volúmenes de etanol absoluto frío, e incubado toda la noche a -20°C. A la mañana siguiente, la muestra se centrifugó a 20.200x g durante 20 min a 10°C, y el botón fue resuspendido en agua miliQ estéril. El ADN fue cuantificado tal y como se indica en el apartado 3.5.5 de Materiales y Métodos.

3.5.2. Extracción de ADN plasmídico

El aislamiento de ADN plasmídico (ADNp) se realizó a partir de 5-10 ml de un cultivo bacteriano en medio LB, suplementado con el antibiótico adecuado, e incubado toda la noche en condiciones aeróbicas (200 rpm) y a la temperatura óptima de crecimiento (37°C para *E. coli* y 30°C para *Bacillus*). Las bacterias se recogieron mediante centrifugación a 17.000x g a temperatura ambiente (RT) en una centrífuga de mesa Eppendorf 5418.

Para la extracción de plásmidos, a partir de cepas de *E. coli,* se utilizó el kit de Extracción de Promega *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega, Ref. A1223) o el kit de extracción de ADN plasmídico de *Qiagen QiaPrep® Miniprep* (Qiagen, Ref. 27104), siguiendo las indicaciones del fabricante. Cuando se llevó a cabo la extracción de ADN

plasmídico a partir de cepas de *Bacillus*, se realizó una incubación de las bacterias durante 45 min con 2 mg/ml de Lisozima de clara de huevo (Sigma, Ref. 62970-1G-F), 10 μ g/ml de ARNasa y 20% sacarosa a 37°C, antes de llevar a cabo la lisis bacteriana.

3.5.3. Extracción de ADN plasmídico mediante el método Fenol-cloroformo

Cuando se requirió una mayor cantidad de ADN plasmídico se llevó a cabo el método de extracción de Fenol-Cloroformo, con la utilización de la mezcla comercial de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 de *Acros Organics* (Ref. 327111000), tras la lisis bacteriana. Para ello se siguió el siguiente procedimiento.

Veinte mililitros de un cultivo bacteriano, incubado durante toda la noche en condiciones óptimas, se centrifugaron a 4.000x g durante 10 min a 4°C. El botón fue resuspendido en 400 μ l de solución de extracción I, enfriada en hielo, y la suspensión se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 ml. A continuación, se añadieron 800 μ l de solución de extracción II y se agitó mediante inversión suave, hasta obtener una solución homogénea. Seguidamente se añadieron 600 μ l de solución de extracción III, se agitó nuevamente y se incubó en hielo durante 5 min, tras lo cual se centrifugó a 14.000x g y 4°C en un rotor Microliter 30x2 sealed (Thermo Scientific, Ref. 75003652) durante 5 min. Tras la centrifugación, se recogieron 600 μ l de sobrenadante y se transfirieron a tubos nuevos, se añadieron 12 μ l de ARNasa, a partir de un stock de 10 mg/ml, y se incubó durante 40 min a 37°C. Tras ello, se añadió el mismo volumen de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, se mezcló vigorosamente mediante vórtex y se centrifugó durante 5 min a 14.000x g y 4°C, antes de recoger la fase acuosa con cuidado de no arrastrar la interfase.

Para llevar a cabo la precipitación del ADN se añadió 1/10 del volumen inicial de acetato de sodio 3M a pH 4.8 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. Tras su mezcla, se incubó durante al menos 1 h a -80°C, antes de centrifugar a 14.000x g durante 5 min. El *pellet* se lavó con etanol al 70% (v/v), para retirar las sales, y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones.

Por último, el botón se dejó secar completamente en cámara extractora antes de resuspender en 80-100 µl de agua miliQ estéril. La solución de ADN se cuantificó, tal y como se especifica en el apartado 3.5.5 de Materiales y Métodos, antes de ser almacenada a -20°C.

3.5.4. Extracción de ADN de bacteriófagos y PSFs

La extracción del ADN presente en el interior de los fagos y PSFs se llevó a cabo utilizando el kit de extracción de ADN a partir de sangre y tejidos de *Qiagen (DNeasy Blood and Tissue DNA kit)* (Qiagen, Ref. 69506), siguiendo las instrucciones del fabricante para

muestras de sangre. Un máximo de 200 μ l de una suspensión de fagos o PSFs, concentrados mediante PEG o gradiente de sacarosa, fue procesada mediante este kit.

3.5.5. Determinación de la concentración de ADN

La cuantificación del ADN extraído se llevó a cabo mediante espectrofotometría, con un equipo *Nanodrop One^c* (*Thermo*-Scientific, Ref. ND-ONEC-W4). El análisis de la pureza del ADN extraído se realizó mediante el cálculo de la relación de la absorbancia a 260/280 y 260/230 nm. Las medidas se llevaron a cabo con 2 µl de muestra, usando un blanco con agua miliQ estéril.

3.5.6. Digestión de ADN

Cuando fue necesario llevar a cabo la digestión del ADN con enzimas de restricción, las condiciones usadas fueron las establecidas por el fabricante *New England Biolab (NEB)* o Promega. La cantidad de ADN en la reacción fue de 1 μ g de ADN, en un volumen final de 50 μ l y 1-2 U de enzima, y con el tampón proporcionado con cada una de las enzimas utilizadas. La mezcla de reacción se incubó de 1 a 2 h a la temperatura óptima de cada enzima. Tras la reacción, la enzima se inactivó bien por calor o bien mediante la purificación del ADN.

3.5.7. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

La visualización y separación de las moléculas de ADN se realizó en geles de agarosa a una concentración entre el 0.8 y el 2% (p/v) y en tampón TAE o TBE, realizados en agua destilada. La mezcla de agarosa y tampón se calentó en un microondas para permitir la disolución de la agarosa. Una vez fundida, se agregó SYBR[®] safe DNA gel stain 10.000X (Invitrogen, Ref. S33102) antes de su gelificación, para permitir la visualización posterior del ADN. Como marcadores de peso molecular se utilizaron el 50-1000 bp DNA Ladder (Canvax, Ref. L0010) o el *HiperLadder* de 1 Kb (Bioline, Ref. BIO-33053). Las muestras de ADN se mezclaron con Tampón de carga 6x justo antes de ser cargadas en el gel, hasta conseguir una solución 1X. A continuación, las moléculas de ADN fueron separadas electroforéticamente a 80 V durante aproximadamente 1 h, en un sistema de electroforesis *MAXI-VG* (VWR), acoplado a una fuente de alimentación *Power Pac* HV (Bio-Rad). El resultado se visualizó en un fotodocumentador *Chemidoc™ MP Imaging System* (*Bio-Rad*).

3.5.8. Desfosforilación del ADN mediante fosfatasa alcalina

La desfosforilación de los grupos fosfato de los extremos del ADN se llevó a cabo mediante la fosfatasa alcalina intestinal bovina (Promega, Ref. M182A) siguiendo las instrucciones establecidas por el fabricante. Para ello se añadieron 0.01 U de enzima por

pmol de ADN en el tampón de reacción 1X, suministrado junto la enzima. La muestra se incubó durante 30 min a 37°C, momento en el cual se añadió de nuevo la misma cantidad de enzima y se incubó de nuevo durante 30 min en las mismas condiciones. A continuación, se procedió a la concentración del ADN mediante precipitación etanol. Para ello, se añadió 0.1 volúmenes de Acetato de sodio 3M a pH 4.8 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto y a continuación, las muestras se incubaron durante 1 h a -20°C. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 16.800x g a 4°C y los pellets fueron lavados en etanol al 70% antes de resuspenderse en agua miliQ estéril.

3.5.9. Purificación de fragmentos de ADN

La purificación de los fragmentos de ADN obtenidos se llevó a cabo mediante el *kit* de Purificación de productos de PCR *Qiaquick PCR Purification Kit* de *Qiagen*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la purificación de bandas de ADN extraídas de gel se utilizó el kit de purificación a partir de geles de agarosa *Quiaquick Gel Extraction Kit* de *Qiagen*, utilizando en este caso agarosa con bajo punto de fusión (US Biological, Ref. A1015).

Una vez purificado el ADN se llevó a cabo su cuantificación tal y como se especifica en el apartado 3.5.5 de Materiales y Métodos.

3.5.10. Ligación de fragmentos de ADN mediante la enzima T4 ligasa.

Los fragmentos de ADN se ligaron al vector de interés mediante una incubación con la enzima T4 ligasa, utilizando relaciones vector:inserto de 1:3, 1:5 y 1:10. Las reacciones contuvieron aproximadamente 50 ng de vector, una unidad de enzima (T4 ligasa Invitrogen, Ref. 15224-017) y la cantidad correspondiente del inserto en un volumen final de 10-20 µl de reacción. La mezcla de reacción se incubó a 8°C durante 16 h.

3.5.11. Secuenciación del ADN

La determinación de la secuencia del ADN se llevó a cabo con los cebadores apropiados en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neira, Granada, mediante el procedimiento de secuenciación cíclica, utilizando la química *BigDyeTerminator* v3.1 y una electroforesis en sistema multicapilar automático en un equipo 3130XL *Genetic Analyzer* de *Applied Biosystems*. Los electroferogramas resultantes se analizaron mediante el software *Finch* TV 1.4 y las secuencias fueron comparadas con las bases de datos mediante el algoritmo *BLASTn* o mediante *ClustalW*.

3.5.12. Transformación de bacterias competentes con ADN plasmídico mediante choque térmico.

Para la transformación de cepas de *E. coli* con el plásmido de interés se utilizó el método del choque térmico, para lo cual previamente se prepararon bacterias competentes mediante lavados con CaCl₂, tal y como se detalla en el apartado 3.2.5 de Materiales y Métodos.

Tras la obtención de las bacterias competentes, se dispusieron en un tubo Eppendorf 50 μ l de suspensión bacteriana, a la cual se añadieron 2 μ l del ADN a transformar con una concentración conocida, entre 10 y 20 ng. A continuación, se procedió a incubar la mezcla durante 30 min en hielo, tras lo cual se incubó durante 45 s en un baño a 42°C, y posteriormente se volvió a incubar la mezcla en hielo durante 2 min más. Tras esta última incubación, se añadieron 950 μ l de medio LB y se transfirió el volumen a un tubo Falcon de 50 ml que fue incubado durante 1 h a 37°C, con agitación suave (150 rpm). Por último, se sembraron 100 μ l de la suspensión de células en una placa de LB con el antibiótico adecuado, que se incubó durante toda la noche a 37°C.

3.5.13. Rastreo de clones positivos después de una transformación bacteriana

Para comprobar la presencia del plásmido de interés en los clones obtenidos tras la transformación bacteriana en *E. coli* se utilizaron dos métodos de rastreo. Previamente, las colonias candidatas se repicaron al azar en estrías en una nueva placa de LB con el antibiótico de selección correspondiente. Tras ser incubadas durante toda la noche a 37°C, la biomasa se utilizó para realizar el rastreo mediante la técnica del *toothpick* o mediante PCR de colonia.

3.5.13.1. Visualización directa de plásmidos en geles de agarosa o método "toothpick"

Para comprobar la presencia y el tamaño del plásmido de interés en los clones obtenidos tras transformación bacteriana, se procedió a realizar un rastreo mediante el método *Toothpick*, en donde se realiza la visualización directa de los plásmidos en geles de agarosa.

Con la ayuda de palillos de dientes estériles, se tomaron pequeñas cantidades de biomasa de cada una de las estrías repicadas el día anterior, y se colocaron en tubos Eppendorf con 30 μ l de tampón de lisis del método *Toothpick*. Tras liberar la biomasa, se agitó intensamente y se incubó durante 20 min a 65°C, permitiendo la lisis bacteriana. A continuación, se cargaron 10-20 μ l de cada muestra en un gel de agarosa al 0.8 % en tampón TBE, junto a un control obtenido con una colonia conteniendo el plásmido sin

inserto. Las muestras se separaron electroforéticamente, tal y como se especifica en el apartado 3.5.7 de Materiales y Métodos.

La selección de los clones potencialmente positivos se realizó en base al incremento del tamaño del ADN plasmídico observado con respecto al control (plásmido vacío). Una vez seleccionados aquellos clones potencialmente positivos, se procedió a la extracción de ADNp, tal y como se detalla en el apartado 3.5.2 y 3.5.3 de Materiales y Métodos, con objeto de comprobar posteriormente la presencia del inserto de interés.

3.5.13.2. PCR de colonia

Cuando fue posible demostrar la presencia del inserto de interés mediante su amplificación con cebadores específicos, se utilizó la técnica de PCR de colonia. Para ello, una vez obtenidas las estrías frescas a partir de la transformación original, la biomasa se resuspendió en un pequeño volumen de agua miliQ esteril (20-25 µl) en tubos Eppendorf. Las suspensiones bacterianas se calentaron a 98°C durante 5-10 min en un termobloque, para provocar la lisis bacteriana y de esta forma liberar los ácidos nucleicos. Tras la incubación, las muestras se centrifugaron a 14.000x g durante 2 min, para retirar los restos bacterianos. Dos microlitros de cada sobrenadante se utilizaron como ADN molde para llevar a cabo la reacción de PCR, según la metodología descrita en el apartado 3.6 de Materiales y Métodos.

El resultado de la PCR se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa, tal y como se describe en el apartado 3.5.7 de Materiales y Métodos.

3.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de ADN *in vitro* mediante la reacción en cadena de la polimerasa se realizó bajo las siguientes condiciones.

El ADN molde se utilizó en concentraciones que oscilaron entre 50-80 ng, si se trataba de ADN plasmídico (ADNp), y de 100-200 ng si se trataba de ADN genómico (ADNg). Cada reacción también contuvo 0.5 µM de cada cebador, 2 mM de MgCl₂ (Canvax), 0.2 mM de cada dNTP (Canvax, Ref. N0030), 1 µl de Tampón 10x de Taq por cada 10 µl de reacción y 1 U de Taq polimerasa (*Horse-Power™ Taq* DNA *Polymerase*, Canvax, Ref. P0023) por cada 20 µl de reacción.

Todas las muestras fueron sometidas a una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, tras la que se llevaron a cabo 30 ciclos de amplificación con 1 min de desnaturalización a 95°C, seguido de una hibridación de 1 min a la temperatura óptima para cada pareja de cebadores, una extensión a 72°C, de duración variable en función del tamaño del amplicón, (tomando como referencia 1 min/kb) y, por último, una extensión final de 3 min a 72°C.

Los cebadores utilizados en esta tesis se encuentran, junto a las temperaturas de hibridación utilizadas para cada pareja de cebadores, en la **Tabla 5**. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador *CFX Connect™ Real-Time System* de Bio-Rad. Tras la amplificación, los resultados fueron visualizados en geles de agarosa, con una concentración comprendida entre el 0,8 y el 2% (en función del tamaño del amplicón), en tampón TAE, tal y como se especifica en el apartado 3.5.7 de Materiales y Métodos.

Nombre Cebador	Secuencia	Gen	Tamaño amplicón (pb)	Tª de anillado o annealing (℃)
ORF 7_F	5' - GCCGGTCAFAAATTCATAFCTF -3'	Amplicón específico del	100	
ORF 7_R	5' - TAGCAACCACTCGAGTTCCAC -3'	B. pumilus 15.1	199	55
Smc_F	5' - GCTGAAAATCTCGCTTGCCA - 3'	Gen de copia única	177	FF
Smc_R	5' - TCTTCCAGTTGTTCGGCTCC - 3'	15.1	177	22
Out5'_F	5' - GTCAGTTTGATGTCCGTCACGG - 3'	Oxidorreductasa de la		
Out5′_R	5' - CCTATCAGGCAAGTGGTCGC - 3'	Cóntigo 59. Genoma de B. pumilus 15.1	387	57
Reg 1_F	5' - CGGACGGTGTTTGGTATTCGG - 3'	Espícula de la cola.	514	57
Reg 1_R	5' – CCCTCTTCGATACGGATTCCG – 3'	<i>B. pumilus</i> 15.1	514	57
Reg 2_F	5' – CAGTTGATACGGAGACAACTGGC – 3'	ADN polimerasa tipo I. Cóntigo 59. Genoma de	276	57
Reg 2_R	5' - GCATCGCGGTCATTGTATCCC - 3'	B. pumilus 15.1		
Reg 3_F	5' - TGATCGCCAGTATGGTGAGCG - 3'	Regulador		57
Reg 3_R	5' - CCCTTCATATAATCCCGCTTGGC - 3'	y subunidad pequeña de la terminasa. Cóntigo 59. Genoma de <i>B. pumilus</i> 15.1	596	
Out3'_F	5' - AACAGGTGTAGCGATGATCGG - 3'	Transportador de		
Out3'_R	5' - GTGAACATTCGTTGTTCTGACCC - 3'	(ThiT). Cóntigo 59. Genoma de <i>B. pumilus</i> 15.1	408	55
16sB1	5' - TACGGYTACCTTGTTACGACTT - 3'	165 rDNA bastarian-	1000 mh	53
553F	5' - GTGCCAGCMGCCGCGGTA - 3'	TOS LKINA DACTELIANO	αq υυυτ	52

Tabla 5. Cebador	es utilizados en	la realización d	le esta tesis.
	cs atmzaaos cm		10 0310 10313.

M13_F	5' - GTTTTCCCAGTCACGAC - 3'	Gen <i>lacz</i> de los		
M13_R	5' - CAGGAAACAGCTATGAC - 3'	plásmidos pUC.	-	-
Oxd_Bp15.1 _F (<u>HinDIII</u>)	5' – AAAA <u>AAGCTT</u> GACGAGTATCCGCTGG GGGG - 3'	Extremo 5´ del gen de la oxalato decarboxilasa de R	826 pb	60.5
Oxd_Bp15.1 _M	5' - ACTTCCTCTGGCGTATGGGC - 3'	pumilus 15.1		
Oxd_Bp15.1 _R (<u>BamHI</u>)	5'- AAA <u>GGATCC</u> AACAGACAGCCGACGCC GCC-3'	Junto al cebador Oxd_Bp15.1_F incluye el gen completo de la Oxalato decarboxilasa de <i>B. pumilus</i> 15.1	1500 pb	62.5
Enol_F (<u>BamHI</u>)	5'- AAAAA <u>GGATCC</u> CCATACATTGTTGACG TATATGC -3'	Gen eno. Cóntigo 18.	1000	58
Enol_R (<u>Xhol</u>)	5'- AAAAA <u>CTCGAG</u> TCAAATGAATTAG CCAGCGG -3'	Genoma de <i>B. pumilus</i> 15.1	1399	
Gro_F (<u>BamHI</u>)	5'- AAAAA <u>GGATCC</u> GCAAAAGATATTA AGTTCAGGAAG -3'	Gen groEL. Cóntigo 15.	1622	48
Gro_R (<u>HinDIII</u>)	5' AAAAA <u>AAGCTT</u> AAGTTAATGTTACT CTTTCATTATCC 3'	15.1	1033	
Promotor T7 (#69348-3)	5' TAATACGACTCACTATAGGG – 3'	Cebador para secuenciación tras clonación en vector de expresión pET	-	50
Terminador T7 (#69337- 3)	5'- gctagttattgctcagcgg -3'	Cebador para secuenciación tras clonación en vector de expresión pET	-	50

3.7. Técnicas comunes de obtención, análisis y cuantificación de proteínas

3.7.1. Preparación de muestras de proteínas para electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Las muestras proteicas a analizar fueron mezcladas con el tampón de carga 5x, cuya composición se recoge en el apartado 3.1.2 de Materiales y métodos. Tras la mezcla, las

muestras fueron incubadas a 95°C durante 5 min, antes de ser cargadas en los geles de poliacrilamida, con el objetivo de desnaturalizar las proteínas y producir la ruptura de puentes disulfuro internos y entre monómeros.

3.7.2. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE

El análisis proteico se llevó a cabo en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, con presencia de dodecil sulfato sódico (SDS), utilizando un equipo *mini-protean system* de *Bio-Rad* (Ref. 1658004).

Generalmente los geles se prepararon a una concentración del 12% de poliacrilamida, mediante la dilución de un stock de acrilamida/BIS-acrilamida al 30% (37.5:1) (Sigma, Ref. A3699). Los geles constaron de una región concentradora (parte superior), con una concentración de acrilamida del 5%, donde se encontraban los pocillos donde se cargaron las muestras, y una región separadora (parte inferior), con una concentración de acrilamida del 12%, donde las muestras fueron separadas en función de su tamaño. En cada pocillo se cargaron entre 10 y 15 μ l de muestra, con un contenido proteico que osciló entre 10 y 40 μ g. La electroforesis se llevó a cabo a 40 V durante los primeros 10 min y a continuación a 120 V, durante aproximadamente 80 min más. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron *Precision Plus Protein All Blue* (Bio-Rad, Ref. #1610373) y *Page Ruler Prestained Protein Ladder* 10 to 250 KDa (Thermo Scientific, Ref. 26619).

3.7.3. Tinción de geles SDS-PAGE con Azul de Coomassie

Tras la electroforesis SDS-PAGE, los geles se tiñeron mediante incubación en el tampón de tinción con azul de *Coomassie*. Tras una incubación de 1-2 h a temperatura ambiente y en agitación, el gel se enjuagó con H₂O destilada, para retirar el exceso de tampón, y se incubó nuevamente en una solución de desteñido, realizándose varios cambios hasta que el gel quedó completamente transparente. Una vez desteñido, el gel se mantuvo en agua destilada y se fotografió o cuantificó con un fotodocumentador *ChemiDoc*TM de *Bio-Rad* y el software *ImageLab*.

3.7.4. Cuantificación proteica mediante análisis comparativo en gel con una recta patrón

La cuantificación de una proteína en concreto, presente en una mezcla compleja de proteínas, se realizó mediante la comparación con una recta patrón construida con Albúmina de Suero Bovino (BSA) (Sigma, Ref. A7906) con concentraciones entre 0.625 y 10 µg de BSA. Estas soluciones patrón se incluyeron en gel de poliacrilamida junto con la muestra proteica a cuantificar.

La cuantificación se llevó a cabo mediante la interpolación de la intensidad de la banda problema en la recta patrón de BSA construida, con la utilización de un equipo *ChemiDoc*^M y el *software ImageLab* de *Bio-Rad*.

3.7.5. Cuantificación proteica mediante el método de Bradford

Para llevar a cabo una cuantificación de la proteína total presente en una muestra se utilizó el método de Bradford, método colorimétrico basado en la variación en la absorbancia medida a 595 nm producida por la unión del reactivo Coomassie blue G-250 a los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas presentes en la muestra. Para llevar a cabo la cuantificación, se prepararon soluciones patrón con cantidades conocidas de BSA, a partir de un stock a 1 mg/ml preparado en agua miliQ autoclavada. Las concentraciones finales de las soluciones patrón fueron 0, 1.25, 2.5, 5 y 10 µg/ml. Las muestras problemas se ensayaron a diferentes concentraciones (1x y 0.1x). Tanto a las muestras de las soluciones patrón como a las muestras problema se les añadió la misma cantidad del reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich, Ref. B6916), y tras una incubación de 5 min, se llevó a cabo la medida de la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro *Nanodrop One^c*. La concentración proteica en las muestras problema se calculó por interpolación en la recta patrón.

3.7.6. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF MS)

La identificación proteica se realizó mediante espectrometría de masas con la técnica denomina MALDI-TOF, por sus siglas en inglés <u>Matrix-Assisted</u> Laser Desorption/Ionization (desorción/ionización láser asistida por matriz) y TOF por el detector de iones que se acopla al MALDI (en inglés *Time-Of-Flight*). La muestra proteica se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida. Para ello, siguiendo las instrucciones del Servicio de Proteómica, todos los reactivos utilizados en la preparación del gel se realizaron con agua miliQ. El gel se tiñó y se destiñó tal y como se detalla en el apartado 3.7.3 de Materiales y Métodos. Una vez desteñido el gel completo se envió en el interior de una bolsa zip sellada con tampón de desteñido al servicio de proteómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa de Madrid, para su análisis mediante MALDI-TOF tras la tripsinización de las bandas seleccionadas para su identificación. Los resultados se analizaron mediante MASCOT, para llevar a cabo la identificación final de las proteínas.

3.7.7. Concentración de proteínas mediante centrifugación con concentradores *Amicon*

Cuando fue necesario concentrar las muestras proteicas, se utilizaron tubos *Amicon* Ultra-15 *centrifugal-filters* de Millipore (Ref. UFC903024). Para ello, los filtros se lavaron previamente con agua miliQ, para eliminar los posibles restos de glicerina, y luego con

el tampón en el que se encontrara la muestra. Posteriormente, se colocó la muestra proteica en los tubos y se centrifugó en una centrifuga Sorval ST16R (Thermo Scientific, Ref. 75004380) con un rotor oscilante TX-400 (Thermo Scientific, Ref. 75003629), a una velocidad máxima de 4.000x g, hasta obtener la concentración deseada.

3.7.8. Diálisis de muestras proteicas en membranas de celulosa

Cuando fue necesario el intercambio de tampón en muestras proteicas, se realizó una diálisis en tubos de diálisis de celulosa, con un tamaño de poro de 14.000 Da (*Dialysis tubing cellulose membrane, cut off* 14.000 de Sigma, Ref. D9652). Para ello, en primer lugar, se lavó la membrana en H₂O destilada dos veces durante 30 min, se selló con una pinza uno de los extremos y se procedió a introducir la muestra proteica en el interior del tubo de diálisis. Tras cerrar el otro extremo, el tubo se colocó en un contenedor con el tampón deseado y se dializó frente al nuevo tampón durante 48 h a 4°C y en agitación, realizándose cambios del tampón cada 12 h. Tras la diálisis, se procedió a la cuantificación de las proteínas tal y como se detalla en el apartado 3.7.4 o 3.7.5 de Materiales y Métodos. En caso de necesitar concentrar las muestras, se procedió tal y como se detalla en el apartado 1.7.7 de Materiales y Métodos.

3.8. Purificación de cristales proteicos paraesporales de *B. pumilus* 15.1.

Para purificar los cristales paraesporales de *B. pumilus* 15.1 se siguió el protocolo desarrollado por nuestro grupo de investigación y publicado en (Garcia-Ramon et al. 2018). Brevemente, un cultivo de *B. pumilus* 15.1, incubado 72 h en medio de esporulación T₃, fue centrifugado a 20.000x g durante 20 min a 4°C. A continuación, el pellet fue lavado 3 veces en tampón PBS frío y centrifugado en las mismas condiciones. Finalmente, el pellet se resuspendió en 1/50 del volumen inicial de cultivo en agua miliQ estéril y fría. La muestra, conteniendo tanto los cristales paraesporales como las esporas, se dispuso sobre un gradiente discontinuo y preformado de sacarosa, con concentraciones de 67, 72, 79 y 84% (p/v) en agua.

La centrifugación se llevó a cabo en una ultracentrifuga Beckman J-30 I, con el rotor oscilante JS 24.38, a 53.000x g durante 16 h. Tras la centrifugación, se recogieron cada una de las fracciones observadas con la ayuda de una pipeta Pasteur, las cuales se colocaron en tubos limpios. Cada fracción se diluyó y lavó 3 veces con PBS frío y estéril, mediante centrifugaciones a 23.700x g durante 15 min y 4°C, para eliminar los restos de sacarosa. Los pellets obtenidos fueron resuspendidos en agua miliQ estéril, en un volumen 500 veces menor que el volumen del cultivo inicial. La suspensión de cristales proteicos de *B. pumilus* 15.1 se conservó a temperatura ambiente para análisis posteriores.

3.8.1. Solubilización de los cristales paraesporales de B. pumilus 15.1 mediante incubación a bajas temperaturas

Los cristales paraesporales de *B. pumilus* 15.1 presentan la particularidad de que se solubilizan cuando son incubados a bajas temperaturas (Garcia-Ramon et al. 2018). Por tanto, cuando fue necesario trabajar con la proteína soluble, se llevó a cabo una incubación de la suspensión de los cristales purificados mediante gradiente discontinuo de sacarosa a -20°C durante al menos 96 h.

3.9. Obtención y purificación de proteínas recombinantes

3.9.1. Inducción de la expresión de proteínas recombinantes con Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG)

La sobreexpresión de proteínas recombinantes se realizó mediante inducción, con IPTG, de los promotores situados aguas arriba del gen de interés, e inducibles por este compuesto. Una colonia aislada de cada clon se utilizó para inocular 5 ml de LB, suplementado con el antibiótico apropiado según el plásmido, cultivo que se incubó durante toda la noche a 37 °C en agitación. A la mañana siguiente, este cultivo se utilizó para inocular, a una dilución 1/100, 50 ml de medio LB estéril, suplementado con el antibiótico de selección. El nuevo cultivo se incubó en agitación a 200 rpm y 37°C hasta alcanzar una D.O. _{600 nm} entre 0.5 y 0.6. En este momento se añadió al cultivo IPTG, a una concentración final de 1 mM, y se mantuvo en las mismas condiciones descritas anteriormente el tiempo suficiente para una producción óptima de la proteína recombinante.

Para determinar el tiempo óptimo de expresión, se recogieron fracciones alícuotas de 1 ml de cultivo cada 2 h, se centrifugaron a 14.000x g y los sedimentos obtenidos fueron almacenados a -20°C. Las muestras fueron lisadas, como se detalla en el apartado 3.9.2 de Materiales y Métodos, y analizadas mediante electroforesis, para determinar el contenido proteico de la fracción insoluble y la soluble, tal y como se describe en el apartado 3.7.2 de Materiales y Métodos. Una vez comprobada la presencia de la proteína de interés, así como el tiempo óptimo de la inducción, se escaló el procedimiento para la obtención de grandes cantidades de proteína.

3.9.2. Lisis bacteriana

Una vez realizada la inducción proteica bajo condiciones óptimas, las bacterias se recogieron mediante centrifugación a 4.500x g durante 30 min, separándose el sobrenadante del cultivo de la fracción celular o *pellet*. El botón celular fue resuspendido en un pequeño volumen de tampón de lisis (2.5 ml por cada gramo de precipitado) y se

incubó durante 1 h a 37°C. Tras ello, se añadió ADNasa y ARNasa a una concentración final de 10 μ g/ml y MgCl₂ a 6 mM y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, los cultivos se sonicaron en un sonicador digital *Branson* SLPe, con objeto de producir la lisis celular. La sonicación se llevó a cabo en ciclos de 10 s de encendido/apagado, durante al menos 5 min o hasta conseguir un aspecto homogéneo y translúcido de la suspensión bacteriana. Alcanzado este momento, se llevó a cabo una centrifugación a 12.000x g y 4°C durante 30 min.

A continuación, se analizó tanto el pellet como el sobrenadante de la fracción celular, junto el sobrenadante del cultivo, en geles de acrilamida al 12%, tal y como se detalla en el apartado 3.7.2 de Materiales y Métodos, para saber en qué fracción estaba la proteína de interés.

3.9.3. Solubilización de cuerpos de inclusión

Cuando la proteína de interés se encontraba en la fracción *pellet* tras la lisis bacteriana, formando cuerpos de inclusión, fue necesario la solubilización de la misma. La solubilización de los cuerpos de inclusión, obtenidos tras la inducción de la enzima oxalato decarboxilasa en *E. coli* 16.10, se llevó a cabo aplicando misma metodología que la utilizada para los cristales paraesporales de *B. pumilus* 15.1, tal y como se detalla en el apartado 3.8.1 de Materiales y Métodos.

3.10. Medida de la actividad de la enzima oxalato decarboxilasa producida por *B. pumilus* 15.1

La enzima oxalato decarboxilasa cataliza la conversión de oxalato hasta formiato y CO₂ en presencia de oxígeno. La medida de la actividad de la enzima oxalato decarboxilasa producida por *B. pumilus* 15.1 se realizó mediante un método espectrofotométrico basado en un kit comercial de la casa Sigma y/o por la cuantificación directa de la producción de formiato mediante Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

3.10.1. Medida de la actividad oxalato descarboxilasa mediante un método espectrofotométrico

La actividad enzimática de la enzima oxalato decarboxilasa fue medida mediante un método espectrofotométrico indirecto, donde se acopló una segunda reacción catalizada por la enzima formiato deshidrogenasa. En este método, el formiato generado por la enzima oxalato descarboxilasa a partir de oxalato, se utilizó como sustrato de una segunda reacción enzimática que tenía aparejado la reducción de NAD⁺. La producción de NADH fue proporcional al formiato producido.

El ensayo se llevó a cabo en tampón citrato 50 mM a pH4, con una concentración de enzima constante de 0.3 μ g/ μ l, y en presencia de 100 mM de oxalato, el sustrato de la enzima. La mezcla se incubó durante 1 h a 37°C, recogiéndose fracciones alícuotas de 50 μ l a lo largo del tiempo (0, 1, 2, 5, 15, 30 y 60 min), las cuales fueron añadidas a 80 μ l de tampón de parada para detener la reacción.

La cantidad de formiato producida se determinó espectrofotométricamente mediante la reducción del NAD⁺ hasta NADH, catalizada por la enzima formiato deshidrogenasa de *Candida boidinii* (Sigma-Aldrich, Ref. F5632). Para ello, 50 µl del producto de la enzima oxalato descarboxilasa, se añadieron a 50 µl de tampón fosfato 50 mM a pH 7.8, junto con 34 mM de NAD⁺ y 20 U/ml de la enzima formiato deshidrogenasa, en un volumen final de 100 µl, en una placa de 96 pocillos. Esta reacción se incubó de nuevo durante 1 h a 37°C, tras lo cual se midió la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda 340 nm. La concentración de formiato se infirió mediante la comparación de los datos de absorbancia obtenidos en una recta patrón con concentraciones conocidas de formiato.

3.10.2. Medida de la actividad oxalato descarboxilasa mediante cuantificación del formiato por Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (H-RMN)

La actividad de la enzima oxalato decarboxilasa producida por *B. pumilus* 15.1 fue también evaluada en un ensayo enzimático directo discontinuo, donde la concentración de producto fue determinada mediante Resonancia Magnética Nuclear.

Para ello, 0, 5 o 10 µg de la enzima purificada y solubilizada mediante la incubación a - 20°C durante 96 h, tal y como se detalla en el apartado 3.8.1 de Materiales y métodos, se dispusieron en 300 µl de tampón fosfato 0.1 M a pH 5. A la mezcla de enzima se le añadieron 200 µl de oxalato de sodio (0.3 M pH 5), sustrato de la reacción, en un volumen final de 600 µl. La concentración final de oxalato sódico y de tampón fosfato fue 100 mM y 50 mM respectivamente.

El ensayo se llevó a cabo en presencia y ausencia de Mn²⁺, ya que este ion divalente actúa como cofactor de la enzima (Tanner et al. 2001). La mezcla de reacción se incubó durante 2 h a 37°C, momento en el cual se paró la reacción mediante la adición de 1 ml de tampón de parada, descrito en el apartado 3.1.2 de Materiales y Métodos.

Antes de realizar la espectrometría RMN-H se añadió metanol como referencia interna, a una concentración final de 5 mM, a cada una de las muestras. Las muestras fueron analizadas mediante un Espectrómetro *Varian Direct* de 500 MHz en el Centro de Instrumentación de la Universidad de Granada. El espectro fue obtenido bajo condiciones completamente relajadas y la señal del agua fue eliminada. El área de cada pico obtenido fue integrada usando el software METRENOVA 9.0 (*Mestrelab Research*, Santiago de Compostela, España) tomando la señal del metanol como referencia interna.

3.11. Trabajo con insectos

3.11.1. Mantenimiento de la colonia de *Ceratitis capitata*

La colonia de *C. capitata* mantenida en nuestro grupo de investigación proviene del centro de Centro de Ecología Química Agrícola (CEQA) de la Universidad Politécnica de Valencia y se mantiene en un insectario con condiciones de humedad (50 \pm 5%) y temperatura (25 \pm 2°C) controlados y con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Los adultos se mantuvieron en cajas de metacrilato, llamadas cajas de cría, las cuales poseen la cara frontal abierta. En esta abertura se dispuso una tela en la cual las hembras ponían sus huevos, que fueron recogidos en un contenedor con agua destilada, colocado en la parte de abajo. Tras la recogida, los huevos se dispusieron sobre la dieta artificial para larvas con ayuda de una pipeta Pasteur de plástico. Tras un periodo de incubación de 72 h a 25°C, los huevos eclosionaron y las larvas comenzaron a alimentarse. El contenedor con la dieta y los huevos de *C. capitata* fue incubado durante 9 días en una estufa, a una temperatura constante de 25°C y en oscuridad.

Transcurrido este tiempo de incubación, cuando las larvas ya se encontraban en el tercer estadio de desarrollo, el contenedor se colocó abierto en una caja que contenía tierra seca, donde las larvas saltaron y llevaron a cabo la pupación. Tras 7 días desde el cambio, la tierra se tamizó para recoger las pupas, que fueron utilizadas para formar una nueva colonia del insecto, en nuevas cajas de cría, que tenían una placa Petri sin tapa con 40 g de dieta para adultos y un recipiente con agua destilada que empapa una bayeta, de la cual los adultos bebían.

3.11.2. Bioensayos con larvas de C. capitata

Para los bioensayos de contaminación de dieta realizados en esta tesis doctoral se utilizaron larvas de *C. capitata* de primer estadio, obtenidas a partir de la colonia tal y como se especifica en el apartado anterior.

Las muestras a bioensayar se mezclaron con 20 ml de dieta artificial de larvas para bioensayo, cuya composición se detalla en el apartado 3.1.3 de Materiales y métodos, y se colocaron en placas de Petri. En cada placa de bioensayo se colocaron, con la ayuda de palillos estériles y una lupa, 48 larvas de primer estadio de *C. capitata*. Las placas de bioensayo se incubaron durante 14 días a 25°C, hasta el momento de realizar el registro de la mortalidad.

3.12. Bases de datos y herramientas bioinformáticas utilizadas

3.12.1. PHASTER

Para la identificación de potenciales profagos en el genoma de *B. pumilus* 15.1 se utilizó el software PHASTER (*PHAge <u>Search Tool Enchanced Release http://phaster.ca</u>, Universidad de Alberta) (Zhou et al. 2011; Arndt et al. 2016).*

Los 63 cóntigos obtenidos y publicados por nuestro grupo de investigación (García-Ramón 2015), que se encuentran disponibles en el *National Center of Biotechnology Information* (NCBI), bajo los números de acceso (NZ_LBDK0100001.1 -NZ_LBDK01000063.1), se analizaron mediante este software.

3.12.2. National Center of Biotechnology Information (NCBI)

Base de datos perteneciente a la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos. Pone a disposición del investigador una gran cantidad de herramientas bioinformáticas de gran utilidad (<u>www.ncbi.nlm.nih.gov</u>).

3.12.2.1. PubMed

Motor de búsqueda de libre acceso que permite consultar principalmente los contenidos de revistas científicas de Biomedicina y Ciencias Biológicas.

3.12.2.2. Basic Local Alignment Search Tool (Blast)

Herramienta bioinformática de alineamiento de secuencias ya sean de ADN, ARN o proteínas. El programa compara la secuencia/s problema/s con las incluidas en la base de datos del NCBI.

Para el estudio y la asignación de la función teórica de los ORFs (del Inglés <u>Open Reading</u> <u>Frame</u>) identificados durante el estudio de la región similar a fago se utilizó *BLASTp* y el resultado de la búsqueda se analizó junto a la base de datos de <u>Uniprot</u>. Para la comparación de las secuencias nucleotídicas se utilizó *BLASTn*.

Todos los ORFs identificados fueron analizados mediante BLAST (<u>Basic Local Alignment</u> <u>Search Tool</u>, del NCBI) haciendo uso de *BLASTp* (protein BLAST, para la búsqueda a partir de secuencias proteicas) (Altschul et al. 2005). Para llevar a cabo la predicción de la posible función de cada ORF se siguió el siguiente flujo de trabajo:

> En primer lugar, se tuvo en cuenta la presencia/ausencia de motivos conservados relacionados con familias de proteínas conocidas, siempre y cuando el E-valor fuera inferior a 10⁻⁵.

- 2. En ausencia de estos dominios conservados se tuvo en cuenta la anotación de las proteínas con mayor similitud tras el análisis mediante la base de datos del NCBI con *Blastp*.
- 3. Por último, en caso de no poder asignar una función al ORF se tuvo en cuenta la asignación de la función propuesta por PHASTER.

3.12.3. UniProt

Repositorio de datos de proteínas utilizado para la asignación de funciones de los ORFs identificados en esta tesis (<u>www.uniprot.org/</u>).

3.12.4. Virus Host Database

Los genomas víricos utilizados en las comparaciones con el genoma de *B. pumilus* 15.1 en esta tesis se recopilaron de la base de datos Virus Host *DataBase*, que forma parte de la Base de datos de *GenomeNet* (Mihara et al. 2016) (www.genome.jp/virushostdb). Esta base de datos incluye los virus cuyos genomas están completamente secuenciados y ensamblados, tanto en el NCBI como en el *GenBank* (EBI *Genomes*). La información de los hospedadores se recopila desde el NCBI, *GenBank, UniProt, ViralZone* y datos obtenidos a partir de la literatura. También incluye la relación entre los virus y su hospedador.

3.12.5. Subtiwiki

Base de datos específica para el organismo modelo *Bacillus subtilis* (<u>http://subtiwiki.uni-goettingen.de</u>) (Zhu & Stülke, 2018). Esta base de datos recoge información contrastada tanto de genes como de proteínas, así como de elementos de regulación y expresión de genes, vías metabólicas etc.

3.12.6. tRNA-scanSE

La identificación de los posibles ARNt se llevó a cabo mediante tRNA-scanSE (Lowe and Eddy 1997). Para ello se depositó toda la secuencia identificada mediante PHASTER en formato FASTA y se utilizó el método de búsqueda Infernal, sin filtro HMM para ADN de origen bacteriano.

3.12.7. Gepard 1.41

La comparativa de la sintenia entre la secuencia problema y otras secuencias de fagos y PSFs encontradas en las bases de datos se llevó a cabo mediante *DotPlot*, gracias al software GEPARD 1.41 (Krumsiek et al. 2007), para el cual se utilizó un tamaño de 10 pb en la comparación de las secuencias.

3.12.8. MEGA X

El análisis filogenético y la construcción de los árboles filogenéticos se llevó a cabo mediante la comparación de las secuencias mediante *ClustalW* (Brosig-Koch and Heinrich, 2014) y posteriormente con la construcción de un árbol filogenético (*neighbour joining-tree*) con ayuda del software MEGAX (Kumar et al. 2018). Para ello se siguió el modelo *Poisson*, con un *bootstrapping* de 1000 intentos. Las ramas con menos del 30% de coincidencia fueron colapsadas.

3.12.9. EasyFig 2.2.5

Los estudios de homología, realizados mediante Blastx fueron representados utilizando el software *EasyFig 2.2.5.* (Sullivan et al. 2011). Se utilizó un tamaño mínimo de 50 pb para la realización del Blast. Los ORFs fueron dibujados según la función predicha obtenida tal y como se indicó en el apartado 3.13.2.2 de Materiales y Métodos.

3.12.10. Otros programas/bases de datos utilizados

Para la representación de las figuras de los plásmidos, así como el análisis de las clonaciones y el análisis de las secuencias del ADN se utilizó el software *SnapGene* (desarrollado por *Insightful Science*, snapgene.com). Para el diseño de los cebadores se utilizó el software *Primer-Blast*, el cual forma parte de los recursos bioinformáticos disponibles en la web del NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Para el diseño y el análisis de los sitios de corte específicos para las enzimas de restricción utilizadas en esta tesis se utilizó el software *NebCutterV2.0* (https://nc2.neb.com/NEBcutter2/) disponible en la web de *New England Biolabs* (Vincze et al. 2003).

Para el análisis de los electroferogramas, cuando fue necesario analizar los resultados de secuenciación, se utilizó el software FinchTV 1.4 (Desarrollado por Geospiza Research Team, http://www.geospiza.com). Para el estudio del ANIb (Average Nucleotide Identity, basado en blast+) se utilizó JSpeciesWS (Richter et al. 2016). Para el estudio teórico del punto isoeléctrico y el peso molecular de las diferentes secuencias aminoacídicas se utilizó el software Compute pl/Mw tool de Expasy (Gasteiger et al. 2004). Para el análisis de la presencia de señales peptídicas en la secuencia aminoacídica de los péptidos se utilizó el software SignalIP 6.0 (https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP) (Almagro Armenteros et al. 2019).
Resultados

4. Resultados

4.1. Capítulo I. Determinación de la actividad enzimática de la proteína OxdD de *B. pumilus* 15. Clonación del gen *oxdD*, expresión heteróloga de la proteína OxdD y evaluación de la relación de la proteína Oxalato descarboxilasa con la actividad entomopatógena

Antecedentes

Como se describió en la introducción de esta tesis doctoral, durante la caracterización de la cepa entomopatógena *B. pumilus* 15.1, se pudo comprobar, mediante microscopía electrónica de transmisión, que la cepa sintetizaba unos cristales paraesporales durante el proceso de esporulación. Estos cristales se observaron tanto libres en el medio, junto a las esporas, como en el interior de las células madre, y en muy escasas ocasiones dentro de las células vegetativas, demostrándose así su origen intracelular. Los cristales paraesporales presentaron una estructura geométrica, de tamaño y forma variable, siendo mayoritarios los cristales con una estructura bipiramidal y cuadrada. Además, los cristales presentaron un aspecto en forma de cuadrículas espaciadas uniformemente (García-Ramón 2016), sugiriendo una ordenación y estructuración definida de sus componentes.

Los cristales paraesporales producidos por *B. pumilus* 15.1 recordaron a los observados en otras cepas entomopatógenas del género *Bacillus*, como *B. thuringiensis*, los cuales están formados por inclusiones cristalinas de δ -endotoxinas y son los factores de virulencia principales responsables de la actividad insecticida de esta bacteria (Bravo et al. 2007; Palma et al. 2014b).

Los cristales paraesporales de *B. pumilus* 15.1 se han asociado con la sobreexpresión de una proteína de 45 KDa durante el proceso de esporulación de la cepa. Los cristales no forman parte de las esporas, ya que se pueden separar de estas en un gradiente discontinuo de sacarosa (Garcia-Ramon et al. 2016). La proteína de 45 kDa ha sido identificada mediante MALDI-TOF como una oxalato decarboxilasa, y se ha demostrado su codificación cromosómica gracias a la observación de que estos cristales son producidos igualmente por la cepa de *B. pumilus* 15.1C, una cepa derivada de *B. pumilus* 15.1 curada de elementos extracromosómicos (Garcia-Ramon et al. 2018).

Además, en estudios anteriores se ha descrito que estos cristales paraesporales se solubilizaban cuando son sometidos a bajas temperaturas, hecho de interés, ya que, aparte de ser un fenómeno curioso y poco frecuente, se sabe que para que un cultivo de *B. pumilus* 15.1 muestre toxicidad, es condición indispensable que se incube a baja

temperatura (Molina et al. 2010). La alta producción de la proteína de 45 kDa por parte de *B. pumilus* 15.1 y el hecho de que tanto la solubilidad de la proteína como la toxicidad de la cepa son dependientes de la incubación a bajas temperaturas, nos hizo realizar la hipótesis de que la oxalato descarboxilasa producida por *B. pumilus* 15.1 pudiera estar involucrada en el mecanismo de toxicidad de las larvas de *C. capitata*. Por esta razón se emprendió el estudio y la evaluación de esta enzima como potencial factor de virulencia.

Un primer paso para iniciar la caracterización de esta enzima y su relación con la virulencia fue su expresión en un sistema heterólogo, con objeto de obtener una alta cantidad y una forma de obtención más sencilla que la enzima silvestre. Los resultados de dicha clonación y expresión, así como la determinación de la actividad y relación con la toxicidad frente a *C. capitata* se describen en este capítulo.

4.1.1. Determinación de la actividad enzimática oxalato descarboxilasa en la proteína OxdD producida por *B. pumilus* 15.1

La proteína de 45 kDa, expresada a partir del gen *oxdD*, tiene predicha una actividad enzimática muy definida, la descarboxilación del oxalato hasta formiato, con la liberación concomitante de CO₂.

Los estudios de comparación de la secuencia aminoacídica de la proteína codificada por el gen *oxdD*, con los depositados en las bases de datos, mostraron una alta identidad con otras proteínas de organismos similares (**Tabla 6**).

Organismo	Cobortura	Idontidad	Número de
Organismo	Copertura	luentiuau	acceso
Bacillus pumilus	1	100%	WP_047202064.1
Bacillus safensis	1	99,74%	RKE68669.1
<i>Bacillus sp</i> Root 920	1	99,22%	WP_056767804.1
Bacillus australimaris	1	99,22%	WP_060700021.1
Bacillus zhangzhouensis	1	98,19%	WP_034323051.1
Bacillus altitudinis	1	97,93%	WP_148943332.1
Bacillus stratosphericus LAMA			
585	1	97,93%	EMI14945.1
Bacillus aerophilus	1	97,93%	MBX7001741.1

Tabla 6. Principales proteínas homólogas a la OxdD de *B. pumilus* 15.1 encontradas en la base de datos del NCBI.

Tras una revisión bibliográfica de las proteínas recogidas en la **Tabla 6**, se determinó que a ninguna de ellas se le había demostrado experimentalmente la actividad enzimática de oxalato descarboxilasa. Por tanto, el primer paso en nuestra investigación fue evaluar si la proteína OxdD, producida por *B. pumilus* 15.1 en forma de cristales, presentaba actividad oxalato descarboxilasa. Para ello, se diseñó un ensayo enzimático directo

discontinuo, donde se detectó la formación de formiato mediante Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN-H).

La capacidad de descarboxilación de la enzima oxalato decarboxilasa producida por *B. pumilus* 15.1 en forma de cristales se llevó a cabo tras la purificación de los mismos, tal y como se detalla en el apartado 3.8 de Materiales y Métodos (Garcia-Ramon et al. 2018).

La mezcla de cristales y esporas obtenidos a partir de un cultivo de *B. pumilus* 15.1 se resuspendió en agua estéril, en un volumen 100 veces menor que el del cultivo original. Tras la purificación mediante un gradiente preformado de sacarosa, las fracciones se visualizaron en geles SDS-PAGE, con objeto de determinar la fracción en la cual la proteína de interés era más abundante (**Figura 17**).



Figura 17. Electroforesis SDS-PAGE en acrilamida al 17% de las distintas fracciones (1-7) y pellet obtenidos tras someter el sedimento de un cultivo esporulado de *B*. pumilus 15.1 a un gradiente preformado de sacarosa. Las fracciones fueron recogidas mediante pipeteo y lavadas 3 veces con PBS antes de resuspenderse finalmente en agua estéril. Como marcador de peso molecular se utilizó *Precision Plus Protein All Blue* de *Biorad* (calle M).

Como puede observarse en la **Figura 17**, y tal como había sido descrito anteriormente por nuestro grupo de investigación, la proteína de interés, de 45 kDa de tamaño, se encontró mayoritariamente en las fracciones 5 y 6 del gradiente. Sin embargo, también estuvo presente en las fracciones 4 y 7, aunque en menor cantidad.

La solubilización de los cristales de oxalato decarboxilasa se llevó a cabo mediante incubación a baja temperatura (-20°C durante 96 h) de las fracciones que contenían la proteína. Tras una centrifugación, se separó la fracción soluble (sobrenadante) de la insoluble (pellet) y el sobrenadante se cuantificó en un gel SDS-PAGE, junto a un patrón de BSA de concentración conocida (**Figura 18**).



Figura 18. Electroforesis SDS-PAGE en acrilamida al 12% de la OxdD solubilizada de los cristales producidos por *B. pumilus* 15.1 (calle 4), junto a un patrón de BSA de concentraciones conocidas 5 (calle 1), 2.5 (calle 2) y 1.25 µg (calle 3) de BSA. Como marcador de peso molecular se utilizó *Precision Plus Protein All Blue* de *Biorad* (calle M).

La concentración de la OxdD soluble se estimó ser de 0.4 μ g/ μ l.

El ensayo enzimático se llevó a cabo con tres concentraciones de enzima (0, 5 y 10 μg), en presencia y ausencia de Mn²⁺ y con una concentración de sustrato de 100 mM. La actividad enzimática se determinó mediante la cuantificación por RMN-H del formiato producido, tal y como se describe en el apartado 3.10.2 de Materiales y Métodos. El formiato fue observado en el espectro de RMN-H como un singlete a 8.40 ppm (**Figura 19**), y se cuantificó (**Tabla 7**) mediante la integración de los picos y comparación con el área del control interno, que este caso fue el metanol, incluido en cada una de las muestras, y observado como un singlete a 3.31 ppm.



Figura 19. Espectros representativos obtenidos mediante análisis por RMN-H del producto de los ensayos enzimáticos realizados con 0, 1 y 5 µg de OxdD solubilizada. La presencia de formiato se observó como un singlete a 8.40 ppm (flecha negra). La posición del singlete se comparó con los controles preparados con concentraciones conocidas de formiato de sodio (primer espectro). El control interno de metanol, observado como un singlete a 3.31 ppm (flecha roja), se utilizó para llevar a cabo una cuantificación del formiato presente en la muestra.

En aquellas muestras donde no se añadió la proteína de 45 kDa no se detectó la producción de formiato (**Tabla 7**), descartándose la degradación espontánea del oxalato en las condiciones ensayadas.

Tabla 7. Valor de la integral del pico observado a 8.40 ppm (correspondiente al formiato) y la concentración estimada de formiato en la muestra, usando metanol como patrón interno. La formación de formiato fue evaluada en presencia (1 mM) y en ausencia de Mn²⁺ y a diferentes concentraciones de enzima.

		Sin Mn ²⁺	Con Mn ²⁺	
			Concer	ntración
µg de	Valor	Concentración de	de Fo	rmiato
enzima	Integrado	Formiato (mM)	Valor Integrado (m	nM)
0	0	0	0 ± 0.00 0 ±	± 0.00
5	0.19 ± 0.00	0.31 ± 0.00	0.11 ± 0.00 0.18	3 ± 0.01
10	0.42 ± 0.01	0.60 ± 0.02	0.18 ± 0.00 0.29	9 ± 0.00

Estos resultados demuestran que la proteína de 45 kDa posee la capacidad de transformar el oxalato en formiato y por tanto presenta actividad oxalato decarboxilasa. La actividad se observó tanto en presencia como en ausencia de Mn²⁺, aunque la cantidad de formiato obtenida en presencia de Mn²⁺ fue aproximadamente la mitad de la obtenida en ausencia (**Tabla 7**).

4.1.2. Clonación del gen *oxdD* de *B. pumilus* 15.1 y expresión de la proteína OxdD en un sistema heterólogo

4.1.2.1. Localización de la ORF codificante de la oxalato descarboxilasa en el genoma de B. pumilus 15.1 y análisis bioinformático de la región flanqueante a la ORF oxdD

La localización en el genoma de *B. pumilus* 15.1 del gen responsable de la síntesis de la proteína de 45 KDa, identificada por MALDI-TOF como oxalato decarboxilasa (García-Ramón), abrió la posibilidad de llevar a cabo su clonación y expresión de manera

heteróloga. La obtención de grandes cantidades de proteína de manera fácil, permitió emprender su caracterización y el análisis de su relación con la toxicidad hacia insectos.

El gen responsable de la codificación de la enzima oxalato descarboxilasa se identificó en el cóntigo 4, de 57,32 Kb de tamaño (No. Acceso GenBank NZ_LBDK01000004.1) del genoma parcialmente ensamblado de *B. pumilus* 15.1. La ORF *oxdD* (ORF 52), de 1163 pb (No. de acceso WP047202064.1) codificó una proteína de 387 aa que presentaba homología con un dominio conservado de la familia de las bicupinas. Esta familia de proteínas recibe este nombre debido a que presentan duplicado el dominio cupina, formada por regiones conservadas con una conformación estructural de barriles β en forma de copa. Cada una de estas regiones presenta un sitio de unión a iones divalentes, que suelen actuar como cofactor de la reacción enzimática que catalizan. La superfamilia de las cupinas es una de las familias de proteínas conocidas con mayor diversidad funcional, entre las cuales se encuentra la familia de las enzimas oxalato descarboxilasas (Khuri et al. 2001).

En el caso de las oxalato descarboxilasas, se trata de enzimas con dos dominios cupina conservados, dependientes de Mn^{2+} , el cual se une al dominio mediante 4 residuos (tres histidinas y un glutamato) y actúa como cofactor de la reacción. Se conocen dos funciones entre las proteínas pertenecientes a esta familia de bicupinas relacionadas con la degradación del oxalato, una actividad oxalato descarboxilasa, descarboxilación del oxalato hasta formiato y CO_2 y una actividad oxalato oxidasa, que cataliza la degradación del oxalato hasta CO_2 y H_2O_2 , aunque esta última reacción es catalizada habitualmente por enzimas de la familia de las monocupinas (Khuri et al. 2001; Just et al. 2004; Conter et al. 2019).

El ORF 52 del cóntigo 4 de *B. pumilus* 15.1 se encontró flanqueado aguas arriba por un regulador tipo sigma y otras proteínas de función desconocida y aguas abajo por un inhibidor de un regulador tipo sigma, una proteína de membrana y una glicosil-transferasa (**Figura 20**).



Figura 20. Representación esquemática de la región flanqueante al ORF 52 del cóntigo 4 de *B. pumilus* 15.1, el cual codifica una proteína con un dominio conservado de la familia de las bicupinas, proteínas a la que pertenece la familia de la oxalato descarboxilasa. La función de cada ORF se infirió a partir de su secuencia aminoacídica y se indicó mediante un código de color. El tamaño relativo de cada ORF y la dirección de la transcripción se indicó en la figura mediante el tamaño y el sentido de cada flecha.

El fragmento de ADN que contuvo el potencial gen *oxdD* se extendió desde la posición 53,367 hasta la 54,730 (secuencia reverso-complementaria) (**Figura 21**).

```
53341 agatgcccat aaataaaagc atcgataaaa tcgattgata aaaagcacca gttaaatgaa
53401 agaacagtac acaaaacaac aaaaatatgt aacagacagc cgacgccgcc atgaaccatt
53461 ttagcccttg ccataaagcg tgaacagatt gctgcatagt tgaacaaaca ctcccttaca
53521 tgaagatacc tgcaaaaagg acagcctttt tgcaggaagt catacg<mark>ttaa teetetttt</mark>
53581 taggtgcagc gatcacagga tgtttttcag tatcaagcag ttttaagaaa tcttcgcctt
53641 gatctaaatg atcaagaaca agctgtttcg gtgtgaccgc aagccactga ttaagtgaga
53701 tatctgcata atgatcgctc ttaaagattt ctaagaaata aagcggttcg tcgcctgtat
53761 tetetacata atgececate geaaatggga catateeaac gteteeegee tgatagttga
53821 aggttetege atgtecatea gaageaaata cegteatteg tgetttteea gaaatgaaat
53881 attgccattc atccgtattt ggatgccaat gcagctcgcg aatggcacct ggatcaactt
53941 tcacaagagc ggatgcaatc gttttagacg ctttgaaatt ggtagagtcc gcaatccaca
54001 cttgtccgcc gcttgacgta atcggctcct gttttaacag ctcatattta aaggaattcg
54061 ggacttetee ttgetetgtt tteacettgt cacatteaag ggaaceagga atteetttt
54121 ggaaaatata tttttctttc tctgtcagct tgtcaaactg ctcttttgtc ataccgaagt
54181 tettaageae gaetteetet ggegtatggg eaageeaate ggttaettgg aaegtaetat
54241 tttctgagaa tgacccatca tcaaacacaa gcaagaattc agctcccggt tcaagtgctt
54301 ggatagagtg cggcaggcca gaagggaagt accacaaatc accctcagtc acatcetctg
54361 taaaattgcg cccctctgca tcaaccgatg taatccgagc ttccccataa atcatgtacg
54421 cccatteege tteettatge cagtgeagtt caegaatgge accaggettt aategeatat
54481 tgacagatgc aagactttta gagatcggca gttcgcggac tgttacctca cgagcgtagc
54541 cgcctttttc taaacgattg tgtgtatcag aaaaagaata tttcaggttg gagaccgttc
54601 catgateggt ttetggegge gtgageatat etggattttg tetgteeege tegagattae
54661 gtggaatttt gaccgttgct cctttttctc ctcgaatcgg ctgtggtatt ccatttggct
54721 tttcactcat gataaaatcc cctttcaaca tcgtatggtg tgaggtgaca aaaggccttt
54781 catttcgccc tcgttttcat aaggtgaaac gaatcaagca gatgtcaatc tgattcatca
```

Figura 21. Secuencia parcial del cóntigo 4 de *B. pumilus* 15.1 desde la posición 53341 hasta la 54840. La ORF, de 1163 pb, predicha para el gen *oxdD* de *B. pumilus* 15.1, se muestra en rojo y es reverso-complementaria a la mostrada en la figura.

El potencial gen *oxdD* de *B. pumilus* 15.1 se encontró bien conservado en bacterias próximas a *B. pumilus*, (**Tabla 8**), presentando valores de identidad que oscilaron entre el 98.63% y el 91.24%.

Organismo	Cobertura	Identidad	Número de
			acceso
B. sp WP8	1	98.63 %	CP010075.1
B. safensis Bcs96	1	98.20 %	CP084677.1
B. pumilus BIM B-171	1	96.56 %	CP085037.1
<i>B. cellulasensis</i> ku-bf1	1	93.64 %	CP014165.1
B. altitudinis UKM RB11	1	93.64 %	CP094654.1
B. aerophilus KJ82	1	93.21 %	CP091093.1
B. xiamenensis VV3	1	91.24 %	CP017786.1

Tabla 8. Principales resultados obtenidos en estudios comparativos de secuencia del gen *oxdD* codificado por *B. pumilus* 15.1 con los presentes en las bases de datos del NCBI.

El potencial gen *oxdD* codificó una proteína de 387 aminoácidos, con un tamaño previsto de 43.79 KDa y un punto isoeléctrico teórico de 5.2. La secuencia aminoacídica de esta proteína se puede observar en la **Figura 22**.

Como se ha podido demostrar anteriormente de manera experimental, la OxdD de *B. pumilus* 15.1 presenta un punto isoelétrico de 5.5 y un tamaño de aproximadamente 45 KDa (Garcia-Ramon et al. 2018), lo cual concuerda con los cálculos teóricos llevados a cabo, con un punto isoeléctrico teórico de 5.2 y un tamaño de 43.79 KDa.

MSEKPNGIPQPIRGEKGATVKIPRNLERDRQNPDMLTPPETDHGTVSNLKYSFSDTHNR
 LEKGGYAREVTVRELPISKSLASVNMRLKPGAIRELHWHKEAEWAYMIYGEARITSVDA
 EGRNFTEDVTEGDLWYFPSGLPHSIQALEPGAEFLLVFDDGSFSENSTFQVTDWLAHTP
 EEVVLKNFGMTKEQFDKLTEKEKYIFQKGIPGSLECDKVKTEQGEVPNSFKYELLKQEP
 ITSSGGQVWIADSTNFKASKTIASALVKVDPGAIRELHWHPNTDEWQYFISGKARMTVF
 ASDGHARTFNYQAGDVGYVPFAMGHYVENTGDEPLYFLEIFKSDHYADISLNQWLAVTP
 KQLVLDHLDQGEDFLKLLDTEKHPVIAAPKKED

Figura 22. Secuencia aminoacídica de la potencial OxdD de *B. pumilus* 15.1.

4.1.2.2. Diseño del clonaje

Antes de llevar a cabo la clonación del gen *oxdD* de *B. pumilus* 15.1 se realizó un análisis de la secuencia nucleotídica de la ORF *oxdD* mediante la herramienta *NEBcutter* V2.0, con objeto de determinar las enzimas de restricción comerciales que no presentaban sitio de corte (142 enzimas) dentro de esta región del ADN. A continuación, se comprobó si alguna de ellas podía ser utilizada para la clonación de la región codificante en el *polilinker* o sitio de clonación múltiple del vector pUC19 (**Figura 23**).



Figura 23. Detalle de la región del *polilinker* o sitio de clonación múltiple del vector pUC19 (Yanisch-Perron 1985) dibujado con *SnapGene*.

Para llevar a cabo la clonación del potencial gen *oxdD* en el vector pUC19 se seleccionaron las enzimas de restricción *HinD* III y *Bam*H I, cuya secuencia de reconocimiento fue incluida en los cebadores específicos *Forward* (Oxd_Bp15.1_F) y *Reverse* (Oxd_Bp15.1_R) respectivamente, con objeto de facilitar la clonación del fragmento de PCR.

El diseño general del clonaje puede observarse en la **figura 24** y consistió en i) la obtención del potencial gen *oxdD* mediante PCR, usando ADN genómico de *B. pumilus* 15.1 como molde y los cebadores OxD_Bp15.1_F y OxD_Bp15.1_R, cuya secuencia se detalla en la sección 3.6 de Materiales y Métodos, ii) digestión del fragmento amplificado con las enzimas de restricción *HinD* III y *Bam*H I, iii) ligación al vector pUC19 previamente digerido con las enzimas *HinD* III y *Bam*H I y iv) transformación de *E. coli* DH5 α con la mezcla de ligación y selección de transformante mediante siembra en placas de LB con Amp¹⁰⁰ suplementadas con X-GAL e IPTG.



Figura 24. Esquema general de la estrategia de clonación del gen *oxdD* identificado en el genoma *B. pumilus* 15.1. La amplificación del gen *oxdD* se llevó a cabo mediante PCR con los cebadores específicos OxdD_Bp15.1_F y OxdD_Bp15.1_R (i), obteniéndose un amplicón de 1605 pb que se sometió a digestión con las enzimas de restricción incluidas en los cebadores (*HinD* III y *BamH* I). Tras la digestión, el inserto de 1596 pb (ii), se ligó al vector pUC19, digerido con las mismas enzimas de restricción (iii), obteniéndose el plásmido pUC19_oxD1, de 4282 pb. Esta construcción fue utilizada para transformar bacterias competentes de *E. coli* DH5 α mediante choque térmico (iv) las cuales fueron sembradas en placas de LB Amp¹⁰⁰ suplementadas con X-GAL e IPTG.

En esta construcción, el gen de la enzima oxalato descarboxilasa se expresaría desde el promotor Lac, y una vez clonado interrumpiría al gen de la subunidad α del gen *lacZ*, permitiendo la selección de colonias que presenten el inserto mediante color (selección de colonias blancas/azules).

El nuevo plásmido, conteniendo el potencial gen *oxdD* de *B. pumillus* 15.1, recibió el nombre de pUC19_oxD1.

4.1.2.3. Clonación del gen oxdD en el vector pUC19

La clonación de la ORF codificante de la enzima oxalato decarboxilasa presente en el genoma de *B. pumilus* 15.1 comenzó con el aislamiento del ADN genómico de esta cepa, tal y como se detalla en el apartado 3.5.1 de Materiales y Métodos. Este ADN se utilizó como molde para la amplificación mediante PCR del gen de interés, mediante los cebadores específicos OxD_Bp15.1_F y OxD_Bp15.1_R, con una Tª de anillado de 62.5°C, y una extensión de 2 min y siguiendo el protocolo estándar descrito en la sección 3.6 de Materiales y Métodos. La Reacción en Cadena de la Polimerasa dio como resultado la amplificación de un fragmento de 1,605 pb, tal y como estaba previsto.

El amplicón fue purificado mediante el kit de Qiagen *Qiaquick PCR Purification Kit* y cuantificado espectrofotométricamente tal y como se detalla en el apartado 3.5.5 de Materiales y Métodos, obteniéndose una concentración de ADN de 110 ng/µl.

Además, se llevó a cabo la extracción de ADN plasmídico mediante el kit de extracción de plásmidos de Qiagen a partir de un cultivo *overnight* de *E. coli* DH5 α que portaba el plásmido pUC19. La preparación obtenida fue cuantificada espectofotométricamente obteniéndose una concentración de 499 ng/µl.

Tanto el vector pUC19 como el amplicón fueron digeridos con la enzima *Hin*D III y con la enzima *Bam*H I, ya que ambas comparten el mismo tampón y temperatura de incubación.

Para ello, siguiendo las indicaciones del fabricante, se dispuso 1 µg de ADN plasmídico (2 µl) o del amplicón purificado (9.09 µl) en tampón *CutSmart* (NEB), en un volumen de reacción final de 50 µl. Posteriormente, a cada reacción se le añadieron 10 U de cada

una de las enzimas (0.5 μ l de *Hin*D III y 0.5 μ l de *Bam*H I) y las reacciones se incubaron durante 3 h a 37°C.

Los productos de las digestiones fueron purificados mediante el kit de *Qiagen* de purificación de fragmentos de PCR (*Qiaquick PCR Purification Kit*), para eliminar tanto el tampón como las enzimas. Una vez purificados, las muestras se cuantificaron espectrofotométricamente obteniéndose una concentración de 27 ng/µl para el vector pUC19 digerido con *HinD* III y *Bam*H I y 25,2 ng/µl para el amplicón de PCR digerido con *HinD* III y *Bam*H I.

Estos fragmentos fueron utilizados para preparar una reacción de ligación en 10 μ l, usando una relación vector:inserto de 1:4 y utilizando 50 ng de vector pUC19 digerido. Tras la incubación *overnight* a 16°C, 2 μ l de la reacción fueron utilizados para transformar, mediante choque térmico, células competentes de *E. coli* DH5 α preparadas tal y como se detalla en el apartado 3.5.12 de Materiales y Métodos.

Algunos de los transformantes obtenidos fueron seleccionados al azar, para llevar a cabo un rastreo de la presencia del plásmido pUC19-Oxd1 mediante la metodología *toothpick*, tal y como se detalla en el apartado 3.5.13.1 de Materiales y Métodos.

De los transformantes analizados, se seleccionaron 10 como posibles candidatos a contener la construcción deseada. Estos clones fueron analizados mediante PCR de colonia, tal y como se detalla en el apartado 3.5.13.2 de Materiales y Métodos, utilizando los cebadores M13_R (cebador diseñado en el vector) y Oxd_M (cebador diseñado dentro del gen *oxdD*) y una temperatura de anillado de 52.8°C. Uno de los clones, el clon 16.10, que presentó amplificación de un fragmento de 679 pb, fue seleccionado.

Tras extraer el ADN plasmídico de un cultivo de este clon y cuantificarlo (112.5 ng/µl), se utilizaron 300 ng para su secuenciación con los cebadores M13_F y M13_R, situados en el vector pUC19, a ambos lados del inserto. El resultado de la secuenciación mostró que el gen *oxdD* presente en el plásmido pUC19-oxD1 poseía una secuencia idéntica a la secuencia alojada en el NCBI con el número de acceso XJ18_RS02345.

4.1.2.4. Expresión del gen oxdD y producción de la proteína oxalato decarboxilasa de B. pumilus 15.1 en un sistema heterólogo

La cepa 16.10 fue utilizada para llevar a cabo un ensayo de la expresión de la proteína oxalato decarboxilasa. Para ello, se cultivó en medio LB Amp¹⁰⁰ y el crecimiento del cultivo se siguió espectrofotométricamente hasta una D.O. _{600 nm} de 0.5, momento en el que se indujo la expresión del gen mediante la adición de 1 mM de IPTG. Tras ello, el

cultivo se mantuvo en las mismas condiciones durante 4 h, momento en el que se recogieron las bacterias mediante centrifugación y se llevó a cabo la lisis tal y como se detalla en el apartado 3.9.2 de Materiales y Métodos.

Tras la lisis, se analizó mediante SDS-PAGE la fracción citoplasmática soluble y la fracción insoluble, para determinar en qué fracción se encontraba la proteína recombinante.

Como puede observarse en la **Figura 25**, existió una expresión intensa de una proteína en la fracción pellet del clon 16.10 (calles 2 y 4) con un, tamaño aproximado de 45 KDa, similar al esperado para la enzima oxalato decarboxilasa de *B. pumilus* 15.1. Esta proteína no estuvo presente en la fracción citoplasmática soluble de la bacteria (calles 1 y 3), encontrándose por completo formando cuerpos de inclusión dentro de la bacteria.



Figura 25. Electroforesis SDS-PAGE en acrilamida al 12% de un cultivo de *E. coli* DH5α 16.10 inducido mediante IPTG. Puede observarse el resultado de la inducción tras 2 h (calles 1 y 2) y 4 h (calles 3 y 4). Se muestra el sobrenadante del cultivo (calles 1 y 3) frente a la fracción pellet completa (calles 2 y 4). M: marcador de peso molecular *PageRuler Prestained Protein Ladder* 250 (*Thermo Scientific*). Se indica mediante una flecha la posición aproximada según el tamaño previsto de la proteína OxdD.

Tanto el tamaño de la proteína sobreexpresada, similar al observado cuando se obtuvo a partir de *B. pumilus* 15.1, como la ausencia de esta en el cultivo realizado con el vector vacío (datos no mostrados), parecen indicar que la banda observada en los geles de acrilamida corresponde con la proteína oxalato decarboxilasa de *B. pumilus* 15.1.

4.1.2.5. Solubilización de la enzima oxalato decarboxilasa de B. pumilus 15.1 obtenida en un sistema heterólogo

Como se ha descrito con anterioridad, la proteína oxalato decarboxilasa obtenida de *B. pumilus* 15.1 en forma de cristales proteicos presenta un comportamiento de

solubilización llamativo. Cuando estos cristales de oxalato descarboxilasa, purificados mediante un gradiente discontinuo de sacarosa, son almacenados a -20°C, se observa una solubilización progresiva de la proteína a lo largo del tiempo, solubilización que no se observa cuando la proteína se incuba a temperatura ambiente durante el mismo periodo de tiempo (Garcia-Ramon et al. 2018).

Dado que la proteína oxalato decarboxilasa expresada en *E. coli* formó cuerpos de inclusión, se evaluó la posibilidad de que la proteína recombinante tuviera el mismo comportamiento que la proteína silvestre y se solubilizara en frío. Para ello, se incubaron fracciones alícuotas de 10 μ l de una muestra de la fracción insoluble resuspendida en PBS a temperatura ambiente y a -20°C durante 3 h. Tras esta incubación, las muestras se centrifugaron, se separó el sobrenadante del sedimento y se analizaron mediante SDS-PAGE al 12% (**Figura 26**). Los resultados mostraron que la proteína de 45 KDa, correspondiente a la enzima oxalato decarboxilasa, se encontró tanto en la fracción insoluble como una única banda en la fracción soluble, indicando que la enzima oxalato decarboxilasa expresada en *E. coli* DH5 α presentó el mismo comportamiento de solubilización con la temperatura que la proteína silvestre obtenida a partir de *B. pumilus* 15.1.



Figura 26. Electroforesis SDS-PAGE en acrilamida al 12% de la fracción pellet (1) y la fracción soluble (2) obtenida después de incubar durante 24 h a -20°C la fracción insoluble de un cultivo de *E. coli* 16.10. Se muestra mediante una flecha el tamaño esperado para la enzima OxdD.

La proteína solubilizada fue cuantificada en un gel SDS-PAGE mediante comparación con un patrón de BSA de concentración conocida (**Figura 27**).



Figura 27. Electroforesis SDS-PAGE en acrilamida al 12% de la enzima oxalato descarboxilasa recombinante, solubilizada en frio (calle 4) junto a un patrón de BSA de concentración conocida (calles 1-3). La enzima fue obtenida de manera heteróloga en *E. coli* 16.10 y solubilizada mediante incubación a -20°C durante 3 h. Para la cuantificación, se incluyeron en el gel 5, 2.5 y 1.25 µg de BSA. Como marcador de peso molecular se utilizó *Precision Plus Protein All Blue* de *Biorad* (calle M).

Tras la comparación con el patrón de BSA, se determinó que la proteína oxalato descarboxilasa recombinante se obtuvo a una concentración de $0.8 \ \mu g/\mu l$.

4.1.3. Ensayo enzimático de la actividad de la enzima oxalato decarboxilasa recombinante mediante un kit comercial

Con objeto de utilizar una metodología más sencilla para la determinación de la actividad oxalato descarboxilasa que la cuantificación del formiato por RMN, se decidió utilizar un kit comercial, basado en una reacción acoplada con la enzima formiato deshidrogenasa y con la determinación espectrofotométrica del NADH producido.

Para ello, en primer lugar, se llevó a cabo la incubación de 0.3 μ g/ μ l de la enzima oxalato descarboxilasa recombinante en presencia de oxalato (100 mM), para la obtención de formiato, tal y como se indica en el apartado 3.10.1 de Materiales y Métodos. La reacción se incubó durante 1 h y a distintos tiempos se recogieron fracciones alícuotas que se utilizaron para llevar a cabo la cuantificación del formiato generado. Esta cuantificación se realizó en una segunda reacción enzimática, catalizada por la enzima formiato deshidrogenasa de *Candida boidinii*. Esta enzima utiliza el formiato como sustrato para llevar a cabo su oxidación hasta CO₂, con la reducción acoplada del NAD⁺ hasta NADH. La cuantificación del NADH mediante espectrofotometría (A_{340nm}) permitió la determinación de la cantidad de formiato producido por la enzima oxalato descarboxilasa, ya que es equimolar al NADH producido (**Figura 28**).



Figura 28. Representación esquemática de las reacciones catalizadas por las enzimas oxalato descarboxilasa (Panel A) y Formiato deshidrogenasa (Panel B) en las que se basa el método de cuantificación de la actividad oxalato descarboxilasa.

La concentración de formiato producido por la enzima oxalato descarboxilasa se estimó mediante la interpolación de los valores de la concentración de NADH en una recta patrón obtenida a partir de concentraciones conocidas de formiato. Los valores de la concentración de formiato, obtenidos en los primeros minutos de la reacción, permitió la construcción de una curva de avance de la reacción para la enzima oxalato descarboxilasa (**Figura 29**).



Figura 29. Representación gráfica de la curva de avance de la reacción catalizada por la enzima oxalato descarboxilasa recombinante, expresada como la producción de formiato (nmol) frente al tiempo (min). Los datos fueron utilizados para llevar a cabo una regresión lineal, la cual puede observarse en la parte inferior del gráfico.

La curva de avance de la reacción permitió calcular la V_0 de la enzima a una concentración 100 mM de sustrato, que fue 0.0735 nmol/min. Por tanto, se demostró que, aunque baja, la enzima oxalato recombinante poseía actividad, al igual que la enzima silvestre.

4.1.4. Evaluación de la relación de oxalato decarboxilasa silvestre y recombinante en la toxicidad de la cepa *B. pumilus* 15.1 frente a larvas de *C. capitata*

Una vez demostrada la actividad de la enzima oxalato decarboxilasa, tanto en forma nativa, como la expresada de forma heteróloga, se trató de evaluar la relación de esta actividad con el hecho de que la cepa *B. pumilus* 15.1 fuera activa hacia larvas de *C. capitata*. Dicho de otro modo, se analizó si la actividad oxalato descarboxilasa pudiera ser uno de los factores de virulencia que posee la cepa *B. pumilus* 15.1 para provocar la muerte a este insecto. La hipótesis de que la enzima oxalato descarboxilasa pudiera representar un factor de virulencia estuvo basada en el hecho de que su producto, el formiato, es un conocido compuesto tóxico (Haritos and Dojchinov 2003). El razonamiento que se siguió fue que si se aumentaba la concentración de oxalato descarboxilasa en un bioensayo debería existir un aumento de mortalidad debido a un aumento de la producción de formiato.

En los bioensayos de contaminación de dieta se utilizó un cultivo completo de *B. pumilus* 15.1 a concentraciones subletales, con objeto de poder observar el efecto que tenían sobre la mortalidad de las larvas la adición de otros componentes a la dieta. Los cultivos completos se ensayaron en presencia y ausencia de oxalato, con objeto de observar si un aumento del sustrato producía un aumento de la mortalidad de las larvas (a causa de la transformación de oxalato a formiato por la OxdD producida por *B. pumilus*). También se ensayaron las enzimas silvestres y recombinantes en presencia y ausencia de oxalato, para demostrar si por ellas mismas la producción de formiato era suficiente para provocar la muerte de las larvas.

Como controles se realizaron bioensayos únicamente con oxalato o con formiato (100 mM), para comprobar si estos compuestos eran tóxicos para las larvas de primer estadio de *C. capitata* y un ensayo con agua como control negativo.

De esta forma, en el caso de que, en presencia de oxalato, tanto el cultivo completo de *B. pumilus,* como las enzimas purificadas fueran capaces de llevar a cabo la degradación del oxalato hasta formiato, observaríamos las diferencias en la mortalidad entre los tratamientos.

En cada ensayo se utilizaron 48 larvas por cada tratamiento y se realizaron tres réplicas de cada uno de ellos. La mortalidad se registró a los 4 y a los 10 días del inicio del bioensayo. Los resultados de mortalidad obtenidos se recogen en la **Figura 30**.



Figura 30. Mortalidad de larvas de primer estadio de *C. capitata* observada a los 4 días (barras negras) y a los 10 días desde el inicio del bioensayo (barras grises). La figura muestra la media de 3 repeticiones, junto al error estándar de la media (SEM). Se realizó un estudio estadístico mediante ANOVA de una vía (P < 0.05) entre el control con agua y el resto de los tratamientos. Los tratamientos con diferencias significativas con respecto al control negativo (agua) fueron marcados mediante un asterisco (*).

Tanto el oxalato como el formiato por si solos provocaron un aumento de la mortalidad de las larvas de primer estadio de *C. capitata* con respecto al bioensayo con agua, por lo que aparentemente ambos compuestos tienen cierto efecto sobre el insecto, aunque estadísticamente no fue significativo. Además, se observó que las larvas tratadas con formiato presentaron un claro retraso en su desarrollo, mostrando un tamaño muy inferior a las larvas control. Pasados 14 días de bioensayo, cuando en el resto de los tratamientos se observaron pupas, en el bioensayo con formiato los individuos de *C. capitata* aún eran larvas pequeñas.

La adición a los bioensayos de 10 µg/ml de la enzima oxalato decarboxilasa silvestre o recombinante, en presencia o ausencia de oxalato no mostraron diferencias significativas entre si ni entre el control negativo, observándose únicamente un aumento de mortalidad del doble (**Tabla 9**). La adición de oxalato al cultivo completo de *B. pumilus* 15.1 tampoco provocó un aumento significativo de la mortalidad.

Tabla 9. Resultados de mortalidad obtenidos tras 10 días del bioensayo de *C. capitata* usando diferentes tratamientos. Los productos químicos (oxalato y formiato) se ensayaron a una concentración de 100 mM. Los cultivos de *B. pumilus* 15.1 se ensayaron a una concentración subletal para provocar aproximadamente el 40% de mortalidad. Las enzimas oxalato decarboxilasa silvestre y recombinante se ensayaron a 10 μg/ml de dieta.

Pioonsavo	(%)	Incremento en	
Вюепзауо	Mortalidad	mortalidad	

Agua	14.3 ± 5.7	1
<i>B.p</i> 15.1	41.67 ± 10	2.8
<i>B. p</i> 15.1 + oxalato	44.79 ± 25	3.0
OxdD silvestre	27.19 ± 5.6	1.8
OxdD silvestre + oxalato	28.3 ± 24	1.9
OxdD recombinante	21.38 ± 3.8	1.5
OxdD recombinante + oxalato	29.76 ± 11.3	2.1
Oxalato	29.84 ± 2.2	2.0
Formiato	27.35 ± 2.57	1.8

El estudio estadístico de la mortalidad obtenida a tiempo final (10 días) entre cada uno de los tratamientos y el control con agua, mostró que sólo existieron diferencias significativas en los bioensayos realizados con los cultivos bacterianos (representado mediante * en la **Figura 30**).

Estos datos parecen indicar que, en las condiciones ensayadas, la enzima oxalato descarboxilasa, tanto en su forma silvestre como en su forma recombinante, no tiene influencia alguna en la mortalidad de las larvas. Sin embargo, estos bioensayos ponen de manifiesto que el formiato (ensayado a 100 mM) posee un claro efecto sobre el desarrollo de las larvas, aunque este no se viera reflejado en la mortalidad de los insectos.

4.2. Capítulo II. Identificación de potenciales factores de virulencia en el genoma de *B. pumilus* 15.1 y evaluación de su toxicidad frente a larvas de *C. capitata*

Antecedentes

El genoma de la cepa *B. pumilus* 15.1, tal y como se ha mencionado con anterioridad, se encuentra secuenciado, ensamblado en 63 cóntigos y publicado (Nº Acceso PRJNA281235) gracias a estudios anteriores de nuestro grupo de investigación (García-Ramón et al. 2015). Dado que el genoma se encontraba disponible, se llevó a cabo un estudio comparativo de su secuencia con una base de datos construida con todos aquellos factores de virulencia descritos en la literatura por ser activos frente a insectos. La base de datos fue construida a partir de una base de datos recopilada por el Dr. Leopoldo Palma, de la Universidad Nacional del Litoral (Palma et al. 2014b) que contenía todas las toxinas conocidas en *B. thuringiensis* (Cry, Cyt, Vip) a la que se añadió manualmente secuencias de aminoácidos de toxinas y factores de virulencia de otros organismos entomopatógenos como *B. thuringiensis, Bacillus cereus, Lysinibacillus sphaericus, Paenibacillus larvae, Photorhabdus luminescens, Photorhabdus temperate, Xenorhabdus japonica, Xenorhabdus nematophila, Pseudomonas spp., Yersinia spp. y Serratia entomophila. Además, se añadieron secuencias de antibióticos antibacterianos y antifúngicos de <i>B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*.

El estudio comparativo del genoma de *B. pumilus* 15.1 con la base de datos actualizada del Dr. Palma permitió identificar 6 ORFs con similitud (identidad mayor del 50%) a factores de virulencia encontrados en bacterias y que potencialmente podrían estar relacionados con la toxicidad observada en *B. pumilus* 15.1 hacia *C. capitata*. El resultado de este estudio comparativo se muestra en la **Tabla 10**.

Cóntigo del genoma de <i>B. pumilus</i> 15.1	Proteína identificada	Número de acceso	Tamaño proteína de referencia (aa)	Identidad	Cobertura	E-valor
18	Enolasa [<i>Paenibacillus</i> <i>larvae</i>]	ETK29332.1	430	338/430 (78%)	100%	0
15	GroEL [Xenorhabdus nematophila]	AFW05298.1	548	303/525 (57%)	95,80%	0
11	Lipopéptido antibiótico Iturina [<i>Bacillus subtilis</i>]	BAM49288.1	165	84/158 (53%)	95,80%	2,00 ⁻⁴⁷

Tabla 10. Principales coincidencias encontradas en la búsqueda de posibles factores de virulencia en el genoma de *B. pumilus* 15.1. Los potenciales factores de virulencia se muestran junto al cóntigo en el que se encuentran y el porcentaje de identidad que presentan.

11	Surfactina sintasa subunidad 3 [Bacillus amyloliquefaciens]	CCP20389.1	1278	655/1275 (51%)	99,80%	0
53	Surfactina sintasa subunidad 1 [Bacillus amyloliquefaciens]	CCP20387.1	3584	1318/2567 (51%)	71,60%	0
41	Surfactina sintasa [Bacillus amyloliquefaciens]	CDG24630.1	3586	1291/2560 (50%)	71,40%	0

El ORF con un mayor porcentaje de identidad (78%) fue el ORF 28 del cóntigo 18 del genoma de *B. pumilus* 15.1. Este ORF presentó identidad con la proteína Enolasa de *Paenibacillus larvae*, el agente causal de la loque americana (*American Foulbrood* (AFB)). Esta enfermedad afecta a las larvas de la abeja (*Apis mellifera*) las cuales se infectan al alimentarse de esporas de *P. larvae*.

La Enolasa es una proteína citoplasmática relacionada con la glucólisis, ya que cataliza la conversión del 2-fosfo-D-glicerato a fosfoenolpiruvato. Las Enolasas han sido consideradas tradicionalmente como enzimas citosólicas, sin embargo, estas proteínas se han detectado en el sobrenadante del cultivo de diferentes organismos patogénicos, incluido *P. larvae*, pese a carecer de una señal de secreción reconocible. Sin embargo, lo más interesante es que la Enolasa de *P. larvae* es tóxica para abejas en ensayos de contaminación de dieta (Antúnez et al. 2011). Las Enolasas de algunos patógenos de mamíferos parecen participar en el mecanismo de interacción patógeno-huésped, debido a que presentan actividad proteolítica y son capaces de activar el plasminógeno a plasmina, y provocar así toda una cascada de activación de otras proteasas que acaban degradando el tejido del huésped (Bergmann et al. 2001; Agarwal et al. 2008; Esgleas et al. 2008). Aunque este sistema solamente ha sido identificado en mamíferos, es posible que el sistema funcione también en patógenos de insectos (Antúnez et al. 2011).

El ORF con el siguiente porcentaje de identidad más elevado (57%) fue el ORF 57, del cóntigo 15. Este ORF fue homólogo a la proteína GroEL de *Xenorhabdus nematophila*, una bacteria Gram negativa entomopatógena conocida por vivir en simbiosis con nematodos del género *Steinernema*. GroEL es una proteína de la familia de las chaperonas moleculares Hsp60, del inglés *"Heat Shock proteins"*, que participa en el plegamiento correcto de ciertas proteínas. Para llevar a cabo su función como chaperona, GroEL actúa en conjunto con la proteína GroES y produce la hidrólisis concomitante de ATP.

La cepa *X. nematophila* secreta un homólogo de GroEL (XnGroEL), el cual presenta toxicidad frente a las larvas de diferentes insectos (Yoshida et al. 2001). La actividad entomopatógena de XnGroEL parece estar relacionada con la capacidad que presenta esta proteína de unión a la quitina de la membrana peritrófica del intestino del insecto. XnGroEL posee un dominio de unión a quitina, por lo que se propone que se une a esta molécula, impidiendo el acceso a la quitina sintasa y por tanto la correcta regeneración y mantenimiento de la membrana peritrófica, provocando el cese en el desarrollo y crecimiento de las larvas de insecto (Kumari et al. 2014). Otros homólogos de GroEL, en otras especies bacterianas, han mostrado toxicidad frente a un amplio rango de insectos, como es el caso de la bacteria simbiótica *Enterobacter aerogenes* (Yoshida et al. 2001).

El siguiente ORF con un mayor porcentaje de identidad (53%) fue el ORF 40 del cóntigo 11, el cual fue anotado como una proteína de la familia de las 4'-fosfopanteteinil transferasas, enzimas relacionadas con la síntesis de un amplio rango de moléculas como ácidos grasos, policétidos, péptidos de síntesis no ribosomal o antibióticos. La ORF 40 fue homóloga a una proteína del operón de síntesis de la Iturina A, un lipopéptido con actividad antifúngica y antibacteriana, considerado como un buen agente de biocontrol. Este operón ocupa una región de 42 Kb en el genoma de *B. subtilis* RB14.

Por último, en el genoma de *B. pumilus* 15.1 se encontraron tres ORFs homólogas a subunidades de la surfactina sintasa de *B. amyloliquefaciens* (ORF 51 del cóntigo 11, ORF 16 del cóntigo 53 y la ORF 2 del cóntigo 41). Esta enzima es la responsable de la biosíntesis de la surfactina, un heptapéptido unido a un hidroxiácido graso, que forma una estructura de lactona cíclica. La surfactina es un potente bio-surfactante que presenta actividad hemolítica, antimicrobiana y antiviral, gracias a la capacidad que tiene de alterar la integridad de membranas biológicas. En *B. amyloliquefaciens*, la surfactina sintasa está codificada por un clúster de 26.5 Kb y contiene 4 ORFs, que codifican 3 proteínas multifuncionales (*srfAA*, *srfAB*, *srfAC*) y una aciltransferasa (*srfAD*) (Chen et al. 2009).

La surfactina sintasa es un complejo multienzimático encargado de sintetizar la cadena de péptidos de la surfactina, mediante síntesis no ribosomal (*non-ribosomal peptide synthesis*).

Todos los ORFs del operón *srfA* se identificaron en el genoma de *B. pumilus* 15.1, aunque en diferentes cóntigos (11, 53 y 41), probablemente porque esta zona del genoma no se encuentra ensamblada.

De los 6 potenciales factores de virulencia encontrados, 2 fueron proteínas (Enolasa y GroEL) que han demostrado presentar actividad entomopatógena en determinadas

especies bacterianas, a pesar de presentar otras funciones biológicas bien definidas (Lamonica et al. 2005; Georgescauld et al. 2014). Las otras cuatro ORFs codificaron enzimas responsables de la síntesis de moléculas bioactivas (iturina y surfactina) conocidas por presentar actividad antibióticas y antifúngicas, pero no identificadas como entomopatógenas por sí mismas por el momento.

Dado que la Enolasa y GroEL son proteínas con actividad frente insectos, y que la actividad entomopatogénica de *B. pumilus* 15.1 desaparece cuando el cultivo bacteriano esporulado se trata con diferentes proteasas (Molina et al. 2010), lo que implica que el principal factor de virulencia debe ser de naturaleza proteica, consideramos que la Enolasa y GroEL eran los dos mejores candidatos para evaluar su relación con la toxicidad frente a *C. capitata*.

En este capítulo describimos los trabajos que se llevaron a cabo para estudiar si la Enolasa y GroEL de *B. pumilus* 15.1 estaban relacionados con la toxicidad frente a *C. capitata*. Para ello realizamos una expresión heteróloga de las dos proteínas y ensayamos su actividad frente larvas de *C. capitata* en bioensayos de contaminación de la dieta.

4.2.1. Análisis bioinformático de las ORFs *eno* y *groEL* de *B. pumilus* 15.1 y diseño de la estrategia de clonaje para la expresión heteróloga de los mismos

Con objeto de realizar la expresión heteróloga de las potenciales proteínas Enolasa y GroEL de *B. pumilus* 15.1, se realizó un estudio bioinformático de la secuencia de ambos ORFs por independiente y se realizó el diseño de su clonado en el vector de expresión pET28a.

4.2.1.1. Análisis bioinformático de la ORF codificante del gen eno de B. pumilus 15.1 y diseño de la estrategia de clonaje en el vector pET28a de Novagen

El diseño de la estrategia de clonaje del potencial gen *eno* de *B. pumilus* 15.1 comenzó con el análisis bioinformático de la región que contenía el ORF.

El ORF del potencial gen *eno* se encontró en el cóntigo 18, de 59.8 Kb (No. Acceso GenBank NZ_LBDK01000018.1), del genoma de *B. pumilus* 15.1. El ORF *eno* (ORF 28), de 1293 pb (No. acceso KLK99626) estuvo flanqueado aguas abajo por ORFs que codifican dos potenciales proteínas de membrana, un transportador ABC, y una proteína hipotética. Aguas arriba se encontraron genes relacionados con la glucólisis, que codificaron una fosfoglicerolmutasa, una triosafosfato isomerasa, una fosfoglicerato kinasa, y una gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (**Figura 31**), tal y como cabría esperar, ya que la principal función de la Enolasa se relaciona con esta vía metabólica.



Figura 31. Representación esquemática del contexto genético del ORF 28 del cóntigo 18 de *B. pumilus* 15.1 el cual codifica una proteína homóloga a la Enolasa de la cepa *P. larvae*. La función de cada ORF se propuso tras estudios comparativos de su secuencia aminoacídica con las existentes en las bases de datos. El tamaño relativo de cada ORF y la dirección de la transcripción se indicó en la Figura mediante el tamaño y el sentido de cada flecha.

El fragmento de ADN que contuvo el potencial gen *eno* se extendió desde la posición 20,596 hasta la 19,304 (secuencia reverso-complementaria) del cóntigo 18 (**Figura 32**).

```
19201 cagaaatagg ataagtcaaa tgaattagcc agcggatttc gctcaacaaa aaaacgctgc
19261 gtcccgctct catgaaagag tggaacgcag cgcatagctg acattattta ttcaagttat
19321 agaatgttgc aatgccgtga tattgtgctg tttcagccaa ttgatcttcg atgcgaagta
19381 attggttgta tttcgccaca cggtccgtac gagacggagc acctgttttg attgtccag
19441 cgtttgttgc aacagcgatg tctgcaatag tgctgtcttc agtttcacca gaacggtgag
19501 aaataacagc tgtgtatcct gcgcgttttg ccatttcgat tgcatcaaat gtttcagtta
19561 atgtaccgat ttggtttact ttgatcagga ttgagttacc gacaccattt ttaatacctt
19621 cagaaagett ettegtgtte gttaegaata agteatetee taetagetga acettgetge
19681 caaggegete agttaatagt ttgtgacett eecagtegtt tteateaagg eegtettega
19741 tagagatgat tgggtatttc gataccatat cttcatacca gtcaaccatt tcagcagatg
19801 ttttcacaac accttcgcct gataaatgat atttaccgtc ttctttgttg tagaactcag
19861 aagatgcagc atccattgca agtttcactt cttcacctgg tttgaagcca gctttttcga
19921 tcgcttcaac gatagtttga agtgcttctt cgttagaacc aaggtttgga gcgaatccac
19981 cttcgtcacc tacagctgtg tttaaacctt ttgcgcttaa tacagatttc aggctatgga
20041 agatttgagc gcccatgcga agtgcttcac ggaagtttgg agcacctaca ggcataatca
20101 tgaattettg aatgtetaeg ttgttateeg eatgetetee accgttgaeg atgtteatea
20161 teggtaetgg aagegttttg gagttgaate eaceaaggta ttgataaagt ggaatttgta
20221 agaaatcagc agccgcacgt gctacagcga tagatacgcc aaggattgcg tttgcgccta
20281 atttcccttt gttttctgtt ccgtcaagtt cgattaacat tttgtcgatc gctacttgtt
20341 ctgttacatc aaagcctaaa agctctggtg caatgatttc gtttacgttg tttacagctg
20401 tcagaacacc ttttccaagg taacggtctt tgtctccgtc acgtagttct actgcttcat
20461 attcaccagt agaagcacca cttggaacaa gcgcacggcc aaagccgcca gattctgtgt
20521 aaacttetae tteaactgtt gggttaeege gagagtetaa taettegegt geatataegt
20581 caacaatgta tggcattttt aatttetete ettttgaate aatttgttat ttttgaatea
20641 atgatgttcc tgtcatctct tttggttttt caagaccaag taagtctaaa agtgttggag
20701 atagatcggc
```

Figura 32. Secuencia parcial del cóntigo 18 de *B. pumilus* 15.1 desde la posición 19201 hasta la 20710. La ORF 28, de 1292 pb, predicha para el gen *eno* de *B. pumilus* 15.1, se muestra en rojo y es reverso-complementaria a la mostrada en la Figura.

El potencial gen *eno* de *B. pumilus* 15.1 se encontró bien conservado en especies próximas a *B. pumilus*, (**Tabla 11**), presentando valores de identidad que oscilaron entre el 98.35% y el 86%.

				Número de
_	Organismo	Cobertura	Identidad	acceso
1	Bacillus sp WP8	1	98,35%	CP010075.1
2	<i>B. safensis</i> sami	1	97,92%	CP032830.1
3	B. pumilus NCTC10337	1	96,88%	LT906438.1
4	B. altitudinis UKM RB11	1	96,70%	CP094654.1
5	B. xiamenensis VV3	1	95,72%	CP017786.1
6	B. atrophaeus 1492	1	86,75%	CP002207.1
7	B. halotolerans ZB201702	1	86,27%	CP029364.1
8	B. subtilis BEST7003	1	86,20%	AP012496.1
9	B. amyloliquefaciens 35M	1	86,02%	CP082278.1
10	B. mojavensis PS17	1	86,02%	CP066516.1

Tabla 11. Principales resultados obtenidos en la comparación del gen *eno* de *B. pumilus* 15.1 con los existentes en las bases de datos.

El ORF *eno* codificó una proteína potencial de 430 aminoácidos, con un tamaño previsto de 46.5 KDa, y un pl teórico de 4.67. La secuencia aminoacídica de dicha proteína se recoge en la **Figura 33**.

MPYIVDVYAREVLDSRGNPTVEVEVYTESGGFGRALVPSGASTGEYEAVELRDGDKDRY
 LGKGVLTAVNNVNEIIAPELLGFDVTEQVAIDKMLIELDGTENKGKLGANAILGVSIAV
 ARAAADFLQIPLYQYLGGFNSKTLPVPMMNIVNGGEHADNNVDIQEFMIMPVGAPNFRE
 ALRMGAQIFHSLKSVLSAKGLNTAVGDEGGFAPNLGSNEEALQTIVEAIEKAGFKPGEE
 VKLAMDAASSEFYNKEDGKYHLSGEGVVKTSAEMVDWYEDMVSKYPIISIEDGLDENDW
 EGHKLLTERLGSKVQLVGDDLFVTNTKKLSEGIKNGVGNSILIKVNQIGTLTETFDAIE
 MAKRAGYTAVISHRSGETEDSTIADIAVATNAGQIKTGAPSRTDRVAKYNQLLRIEDQL
 AETAQYHGIATFYNLNK

Figura 33. Secuencia de la potencial Enolasa de *B. pumilus* 15.1.

El análisis de la secuencia aminoacídica de la potencial Enolasa de *B. pumilus* 15.1 con el algoritmo Signal P 6.0 no predijo la existencia de ningún péptido señal en esta proteína (datos no mostrados). Sin embargo, como se ha mencionado con anterioridad, algunas Enolasas, para las cuales tampoco pudo identificarse péptido señal para su secreción, se han encontrado formando parte del proteoma secretado de bacterias (Antúnez et al. 2010), por lo que no puede descartarse la hipótesis de que esta proteína pueda ser secretada al exterior celular.

Antes de llevar a cabo la clonación de la región codificante de la Enolasa de *B*. pumilus 15.1 se realizó un análisis de la secuencia nucleotídica del ORF *eno* mediante la herramienta NEBcutter V2.0. Con ello se determinó que existían 127 enzimas de restricción comerciales que no presentaron dianas de reconocimiento dentro del ORF

eno. A continuación, se comprobó si alguna de ellas podía ser utilizada para su clonación en el *polilinker* o sitio de clonación múltiple del vector de clonación y expresión pET-28a de Novagen (**Figura 34**).



Figura 34. Detalle de la región del *polilinker* o sitio de clonación múltiple del vector pET-28a de Novagen, obtenido del manual del usuario.

Se pudo comprobar que las enzimas *Xho* I, *Not* I, *Eag* I, *Sal* I, *Sac* I y *Bam*H I fueron potencialmente útiles para el diseño del cloning. Finalmente, se seleccionaron *Bam*H I y *Xho* I para realizar el clonado del potencial gen *eno* en pET-28a. El diseño general del clonaje puede observarse en la **Figura 35** y consistió en i) la obtención del potencial gen *eno* mediante PCR, usando como molde ADN genómico de *B. pumilus* 15.1 y los cebadores Enol_F y Enol_R, cuya secuencia se detalla en la sección 3.6 de Materiales y métodos, ii) digestión del fragmento amplificado con las enzimas de restricción *Bam*H I y *Xho* I, iii) ligación al vector pET-28a, previamente digerido con las enzimas *Bam*H I y *Xho* I y iv) transformación y selección en *E. coli* DH5α mediante siembra en placas de LB Km⁵⁰.

El nuevo plásmido, conteniendo el potencial gen *eno* de *B. pumillus* 15.1, recibió el nombre de pSVC-Eno. En esta construcción, la proteína Enolasa, cuyo gen se expresaría desde el promotor T7, quedaría fusionada a una cola de His en su extremo N-terminal, lo que permitiría su purificación mediante cromatografía de afinidad, y con un sitio de digestión para la trombina, en caso de que fuera necesario eliminar dicha cola.



Figura 35. Estrategia de cloning del gen *eno*. El Panel A muestra la secuencia de los cebadores específicos utilizados para la amplificación del gen *eno*. La región homóloga al gen de cada cebador se encuentra marcada en rojo, mientras que la secuencia de reconocimiento de las enzimas de restricción seleccionadas para llevar a cabo la clonación se marcó de diferentes colores en función de la enzima *Bam*H I (azul) y *Xho* I (verde)). A los cebadores se añadieron 5 Adeninas en los extremos 5' (región sin colorear) para asegurar una buena digestión de las enzimas de restricción tras la amplificación mediante PCR. El Panel B muestra el esquema general de la estrategia de clonación por PCR de un amplicón de 1,399 pb con cebadores específicos Enol_F y Enol_R (i). El siguiente paso fue una digestión con las enzimas de restricción cuyas dianas estuvieron incluidas en los cebadores (*Bam*H I y *Xho* I), obteniéndose un inserto de 1,387 pb (ii). Posteriormente, el fragmento digerido se ligó al vector pET28a, digerido a su vez con las mismas enzimas de restricción (iii). Por último, el plásmido pSVC-Eno, de 6,720 pb, que contenía el gen *eno* se introduciría mediante choque térmico en células de *E. coli* DH5α (iv).

4.2.2. Análisis bioinformático de la ORF codificante del gen *groEL* de *B. pumilus* 15.1. y diseño de la estrategia de clonaje en el vector pET28a de Novagen

El diseño de la estrategia de clonaje del potencial gen *groEL* de *B. pumilus* 15.1 comenzó con el análisis bioinformático de la región que contenía el ORF.

El ORF del potencial gen *groEL* (ORF 57) se encontró en el cóntigo 15, de 68.5 Kb (No. Acceso GenBank LBDK01000015.1), del genoma de *B. pumilus* 15.1. Este ORF presentó un tamaño de 1,633 pb (No. acceso KLK99918). Aguas abajo a este ORF se encontró i) un ORF con un dominio DUF2075, de función desconocida pero que lo poseen proteínas con capacidad de unión al ATP, y además con un dominio de GIY-YIG con actividad nucleasa (E-valor 1.37⁻¹⁹), ii) un ORF con similitud a una nucleótido pirofosforilasa, y iii) un ORF de función desconocida con un dominio DUF3578. Aguas arriba a *groEL* se encontró i) un ORF homólogo al que codifica la proteína GroES, ii) un ORF con homología a una metaloproteasa, con un dominio conservado Abi (E-valor 7.32⁻¹⁷), relacionada con la autoinmunidad frente a sistemas bacteriocina y iii) un ORF homólogo a la subunidad C y A/E de un transportador de membrana de la superfamilia Tat, los cuales transportan proteínas o complejos de proteínas a través de la membrana citoplasmática (E-valor 3.07⁻⁷²) (**Figura 36**).



Figura 36. Representación esquemática del contexto genético del ORF 57 del cóntigo 15 de *B. pumilus* 15.1 el cual codifica una proteína homóloga a la GroEL de la cepa *X. nematophila*. La función de cada ORF se propuso tras estudios comparativos de su secuencia aminoacídica con las existentes en las bases de datos. El tamaño relativo de cada ORF y la dirección de la transcripción se indicó en la Figura mediante el tamaño y el sentido de cada flecha.

El fragmento de ADN que contuvo el potencial gen *groEL* se extendió desde la posición 57,774 hasta la 56,140 (secuencia reverso-complementaria) (**Figura 37**).

55981	acaaaataat	gaaaaagagg	cttcccaaaa	gttcaaagaa	cttatggaaa	acctctaatt
56041	tagacctgta	ttgaagttaa	tgttactctt	tcattatcct	ggttacctta	agaataatat
56101	aggtctaatc	ccaattttaa	tgggattcag	gaagcatga <mark>t</mark>	tacatcatgc	cgcccattcc
56161	acccatgccg	cccatatctg	gcattccgcc	gcctgagccg	ccttcttctg	gtttgtcagc
56221	tacgactgct	tcagttgtta	gaagcattgc	tgctacagaa	gctgcgtttt	gaagtgcaga
56281	gcgagtgact	tttgttgggt	caacgattcc	tttttcgatc	atgtttaccc	attcatttgt
56341	tgctgcgttg	aagccgacac	caatttcttc	gtttttcaag	cgctcaacga	tgactgatcc
56401	ttcaagacca	gcgttgtgag	cgatttgacg	aattggctct	tcaagagaac	gtagaacgat
56461	gtttacacct	gtttgaacgt	caccatcagc	ttcaattgaa	gcgactttgt	tgtatacatt

56521	cacaagtgct	gtaccaccac	cggatacgat	accttcttca	actgctgcgc	gagttgagtt
56581	cagtgcatcc	tcgatgcgta	gtttacgctc	ttttagttct	gtttcagttg	cagcaccaac
56641	tttgatgaca	gcgacgccgc	cagctagttt	tgcaagacgt	tcttgtaatt	tttctttatc
56701	gaattcagaa	gttgtttctt	ctacttgtgc	acggatttgg	ttcacacgtg	ctgcgatttg
56761	agcagaatct	cctgaacctt	caacgattgt	tgtgttttct	tttgtcacaa	cgactttaga
56821	cgcacggcca	agctgaccga	tttcagttga	tttcaggtca	agtcctagat	cttctgtgat
56881	taattctccg	ccagttagaa	cagagatgtc	ttcaagcatt	gctttacgac	gatcaccgaa
56941	tccaggtgct	tttactgcta	ctgcgttgaa	tgtaccacga	agtttgttca	caacaagagt
57001	tgcaagtgct	tcgccttcta	catcttcagc	aataagcaat	aatggttttc	cttgttgtac
57061	aacttgctcg	agtacaggaa	ggatttcttg	aatgtttgtg	attttttat	cagtgattaa
57121	gatgtaagga	ttttcaagaa	ctgcttccat	cttatcagaa	tctgtcacca	tgtatggtga
57181	agcatatccg	cggtcaaact	gcataccttc	aaccacttct	agctcagttg	tgaaaccttt
57241	agattcttcg	attgtgataa	ctccgtcgtt	gccaacgcgc	tccatcgctt	cagcgattag
57301	gctgccgact	tcttcatctg	ctgcagaaat	agccgcaact	tgagcaattg	attctttacc
57361	ttcgattggt	ttagaaatct	cgtgcaagcc	ttcaagtgct	actttcactg	cttcttcgat
57421	ccctttacga	acgccaacag	ggtttgcacc	agctgttacg	tttttaagac	cttcacggat
57481	catcgcttga	gctagaactg	ttgcagtcgt	tgtaccgtca	ccagctacgt	cgtttgtttt
57541	gcttgcaact	tcagccacaa	gttttgcacc	catgttttca	aatgcatctt	ctaattcgat
57601	ttcttttgca	atcgttacac	catcatttgt	gataagtgga	gaaccgaatt	ttttctcaag
57661	aaccacgtta	cgtccttttg	gtcctaaagt	tacttttaca	gcatctgcaa	gtgcatctac
57721	accacgtaac	atcgcacgac	gtgcttcttc	actgaactta	atatcttttg	<pre>ccataataac</pre>
57781	gaaacctcct	cagtctttt	aaaaatttat	ctcaatgttt	tttatgtgat	taaccaataa
57841	cagctaaaat	gtcgctctca	cgaaggatta	agtattcttt	tccttcatat	ttcacttcag
57901	tgcctgcata	ttttgagaag	ataatgcggt	cgcctgtgct	tacttctaac	gcaacgcgct
57961	caccactttc	aagtacacgc	cctgaacctg	ctgcaacaat	tttaccttct	tgcggttttt
58021	cttttgcaga	atccggtaaa	acaataccgc	tagcggtttt	ttcctcagat	tcaacgagtt
58081	caatgattac	gcgatcgcct	aatggcttta	acataagaaa	caacctcctc	aatttttata

Figura 37. Secuencia parcial del cóntigo 15 de *B. pumilus* 15.1 desde la posición 55,981 hasta la 58,140. La secuencia del ORF 57, de 1,292 pb, homólogo al gen *eno* de *B. pumilus* 15.1, se muestra en rojo y es reverso-complementaria a la mostrada en la figura.

El potencial gen *groEL* de *B. pumilus* 15.1 fue homólogo a distintos genes *groEL* presentes en bacterias relacionadas (**Tabla 12**), y mostró unos porcentajes de identidad que oscilaron entre el 98.35% y el 86.01%.

	Organismo	Cobertura	Identidad	Número de acceso
1	Bacillus sp WP8	1	98,35%	CP010075.1
2	<i>B. safensis</i> sami	1	97,92%	CP032830.1
3	B. pumilus NCTC10337	1	96,88%	LT906438.1
4	B. altitudinis UKM RB11	1	96,70%	CP094654.1
5	B. xiamenensis VV3	1	95,72%	CP017786.1
6	B. atrophaeus 1492	1	86,75%	CP002207.1
7	7 B. halotolerans		86,27%	CP029364.1
	ZB201702			
8	B. subtilis BEST7003	1	86,20%	AP012496.1
9	B. amyloliquefaciens	1	86,02%	CP082278.1
	35M			
10	B. mojavensis PS17	1	86,02%	CP066516.1

Tabla 12. Principales resultados obtenidos en la comparación del gen *groEL* de *B. pumilus* 15.1 con los existentes en las bases de datos.

El ORF *groEL* codificó una proteína potencial de 544 aminoácidos, con un tamaño previsto de 57.4 KDa, y un pl teórico de 4.71. La secuencia aminoacídica de dicha proteína se recoge en la **Figura 38**.

MAKDIKFSEEARRAMLRGVDALADAVKVTLGPKGRNVVLEKKFGSPLITNDGVTIAKEI
 ELEDAFENMGAKLVAEVASKTNDVAGDGTTTATVLAQAMIREGLKNVTAGANPVGVRKG
 IEEAVKVALEGLHEISKPIEGKESIAQVAAISAADEEVGSLIAEAMERVGNDGVITIEE
 SKGFTTELEVVEGMQFDRGYASPYMVTDSDKMEAVLENPYILITDKKITNIQEILPVLE
 QVVQQGKPLLLIAEDVEGEALATLVVNKLRGTFNAVAVKAPGFGDRRKAMLEDISVLTG
 GELITEDLGLDLKSTEIGQLGRASKVVVTKENTTIVEGSGDSAQIAARVNQIRAQVEET
 TSEFDKEKLQERLAKLAGGVAVIKVGAATETELKERKLRIEDALNSTRAAVEEGIVSGG
 GTALVNVYNKVASIEADGDVQTGVNIVLRSLEEPIRQIAHNAGLEGSVIVERLKNEEIG
 VGFNAATNEWVNMIEKGIVDPTKVTRSALQNAASVAAMLLTTEAVVADKPEEGGSGGGM
 PDMGGMGGMGMM

Figura 38. Secuencia de la potencial proteína GroEL de *B. pumilus* 15.1.

El análisis de la secuencia aminoacídica de la potencial proteína GroEL, usando el algoritmo Signal P 6.0, tampoco predijo la existencia de ningún péptido señal en esta proteína. Sin embargo, al igual que con la proteína Enolasa, no podemos descartar su translocación a través de la membrana plasmática bacteriana, más aún cuando encontramos, en regiones adyacentes, translocasas especializadas en el transporte de grandes complejos proteicos a través de membrana (sistema de transporte tipo Tat).

GroEL pertenece a la familia de las chaperonas, proteínas que promueven el plegamiento de polipéptidos mal plegados en condiciones tanto basales como en situación de estrés para la célula. GroEL forma 2 anillos heptaméricos que se apilan entre sí formando una estructura supramolecular en forma de barril con 14 monómeros. El extremo de esta estructura en barril se encuentra asociado a la proteína GroES, que actúa de tapadera del barril y que se encuentra codificada por un ORF aguas arriba de GroEL (**Figura 36**). Las proteínas mal plegadas se alojan en el interior del barril formado por GroEL y gracias a la hidrólisis de ATP son replegadas en su conformación nativa (Xu et al. 1997; Georgescauld et al. 2014).

En la mayoría de las bacterias existen varias copias de *groEL*, sin embargo, en el caso de *B. pumilus* 15.1 sólo se ha identificado una copia en el cóntigo 15.

Antes de llevar a cabo la clonación del ORF *groEL* identificado en el genoma de *B. pumilus* 15.1, se realizó un análisis de su secuencia nucleotídica mediante la herramienta NEBcutter V2.0, para determinar qué enzimas de restricción comerciales no presentaron ningún sitio de corte. De las 99 enzimas encontradas, se seleccionaron aquellas presentes en el vector de clonación y expresión pET-28a de Novagen (*Not* I, *Eag* I, *Hin*D III, *Sal* I, *Sa c*I y *Bam*H I). Finalmente se decidió usar las enzimas *Bam*H I y *Hin*D III para realizar el clonado del potencial gen *groEL* en pET-28a.

El diseño general del clonaje puede observarse en la **Figura 39** y fue similar al clonaje del gen *eno* pero con el uso de las enzimas de restricción *Bam*H I y *Hin*D III en vez de *Bam*H I y *Xho* I y de los cebadores Gro_F y Gro_R en vez de Enol_F y Enol_R.

El nuevo plásmido, conteniendo el potencial gen *groEL* de *B. pumillus* 15.1, recibió el nombre de pSVC-Gro. En esta construcción, la proteína GroEL, cuyo gen se expresó desde el promotor T7, quedaría fusionada a una cola de His en su extremo N-terminal, lo que permitiría su purificación mediante cromatografía de afinidad, y con un sitio de digestión para la trombina, en caso de que fuera necesario eliminar dicha cola.



Figura 39. Estrategia de cloning del gen *groEL*. El Panel A muestra la secuencia de los cebadores específicos utilizados para la amplificación del gen *groEL*. La región homóloga al gen de cada cebador se encuentra marcada en rojo, mientras que la secuencia de reconocimiento de las enzimas de restricción seleccionadas para llevar a cabo la clonación se marcó de diferentes colores en función de la enzima *HinD* III (amarillo) y *Bam*H I (azul)). A los cebadores se añadieron 5 Adeninas en los extremos 5' (región sin colorear) para asegurar una buena digestión de las enzimas de restricción mediante PCR. El Panel B muestra el esquema general de la estrategia de clonación del

gen *groEL* identificado en el genoma *B. pumilus* 15.1. El primer paso consistió en la amplificación por PCR de un amplicón de 1,739 pb con cebadores específicos Gro_F y Gro_R (i). El siguiente paso en una digestión con las enzimas de restricción cuyas dianas estuvieron incluidas en los cebadores (*Bam*H I y *HinD* III), obteniéndose un inserto de 1,727 pb (ii). Posteriormente, el fragmento digerido se ligó al vector pET28a, digerido a su vez con las mismas enzimas de restricción (iii). Por último, el plásmido pSVC-Gro, de 7,075 pb, que contenía el gen *groEL* se introdujo mediante choque térmico en células de *E. coli* DH5α (iv).

4.2.3. Clonaje de las ORFs eno y groEL en pET-28a

La clonación de los ORFs homologos a los genes *eno* y *groEL* presentes en el genoma de *B. pumilus* 15.1 comenzó por el aislamiento del ADN total de la bacteria, usando la metodología descrita en el apartado 3.5.1 de Materiales y Métodos. Dicho ADN fue usado como molde en dos reacciones de PCR, una con una Tª de anillado de 58°C y con los cebadores Enol_F y Enol_R y otra con una Tª de anillado de 48°C y con los cebadores Gro_F y Gro_R, ambas con una extensión de 2 min (**Tabla 5** de Materiales y Métodos). El resultado de las PCRs fue la amplificación de dos fragmentos de ADN con el tamaño esperado, de 1,739 pb en el caso del gen *groEL* (**Figura 40, calle 1**) y 1,399 pb en el caso del ORF *eno* (**Figura 40, calle 2**).



Figura 40. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de las PCRs realizadas con los cebadores Gro_F y Gro_R (calle 1) y con los cebadores Eno_F y Eno_R (calle 2) usando como molde una extracción de ADN total de *B. pumilus* 15.1 (calle 3). M: Marcador de peso molecular (en Kb).

Los amplicones fueron purificados mediante el kit *Qiaquick PCR Purification* de Qiagen y cuantificados espectrofotométricamente tal y como se detalla en el apartado 3.5.5 de Materiales y Métodos, obteniendo una concentración de ADN de 188.3 ng/µl en el caso de la amplificación de *groEL* y 81.9 ng/µl en el caso de *eno*.

Seguidamente, se extrajo el plásmido pET-28a a partir de un cultivo *overnight* en LB Km⁵⁰ de *E. coli* BL21 DE3 pET-28a, mediante el kit de extracción de ADN plasmídico de Qiagen. La preparación de pET-28a fue cuantificada espectrofotemétricamente y contuvo una concentración de 22.9 ng/µl.

Tanto los amplicones como el plásmido pET-28a fueron digeridos en primer lugar con la enzima *Bam*H I, para luego, en una reacción posterior, digerir con *Hin*D III o *Xho* I, dependiendo del clonaje (**Figura 35** y **Figura 39**).

Para ello, se colocaron en tubos independientes 1 µg de ADN plasmídico (44 µl), 1 µg del amplicón *groEL* (5 µl) y 1 µg del amplicón *eno* (12 µl), se mezclaron con tampón E de Promega hasta un volumen final de 50 µl y se digirieron, usando 10 U (1 µl) de la enzima *Bam*H I. Tras la incubación a 37°C durante 4 h, los fragmentos se purificaron con el kit de purificación de fragmentos de PCR de *Qiagen*, con objeto de eliminar la enzima *Bam*H I y su tampón. Quinientos nanogramos de pET-28a *Bam*H I se digirieron en un volumen final de 30 µl con la enzima *Hin*D III y otros 500 ng con la enzima *Xho* I, usando 10 U de enzima y los tampones adecuados para cada enzima (NEB 2.1 para *Hin*D III y tampón D para *Xho* I). Así mismo, los amplicones *groEL Bam*H I y *eno Bam*H I se digirieron en 50 µl de reacción con las enzimas *Hin*D III y *Xho* I respectivamente. Las tres digestiones se incubaron a 37°C durante 2 h, se calentaron a 80°C durante 20 min para inactivar las enzimas de restricción y se cuantificaron espectrofotométricamente para conocer la concentración de cada uno de los insertos (21.2 ng/µl de *groEL Bam*H I/*Hin*D III y 17 ng/µl *Bam*H I/*Xho* I).

Los fragmentos obtenidos fueron ligados en 10 μ l de reacción, usando una relación vector:inserto de 1:4. En paralelo, a modo de control, se llevaron a cabo reacciones de ligación de la misma cantidad de vector pET-28a (100 ng) digerido con *Bam*H I y *Hin*D III y pET-28a digerido con *Bam*H I y *Xho* I. Tras la incubación *overnight* a 16°C, 2 μ l de cada reacción de ligación se usaron para transformar células competentes comerciales (NEB) de *E. coli* DH5 α por choque térmico, tal y como se detalla en la sección 3.5.12 de Materiales y Métodos.

Algunos de los transformantes obtenidos (910 transformantes/ml en el clonaje del gen *eno* y 180 transformantes/ml en el caso del gen *groEL*) se seleccionaron al azar y se rastrearon mediante PCR de colonia tal y como se indica en el apartado 3.5.13.2 de Materiales y Métodos, usando los cebadores T7 Promotor y T7 terminador, diseñados en el vector pET-28a (**Figura 34**) y usando 2 min de extensión a 72°C y 50°C de Tª de anillado. La **Figura 41** muestra el resultado de dicho rastreo.



Figura 41. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de PCRs de colonia realizadas sobre distintos clones elegidos al azar en el clonaje de *groEL* y *eno*. Las PCRs fueron realizadas con los cebadores T7 Promotor y T7 Terminador, diseñados sobre el vector pET28a, y que flanquean a ambos genes. Las calles 1 a 8 muestran el resultado del rastreo de clones obtenidos en la transformación realizada con el inserto

groEL y las calles de 10 a 26 el rastreo de clones obtenidos con el inserto *eno.* Las calles 9 y 27 (control negativo) muestran el resultado de la PCR de colonia sobre un clon sin inserto (plásmido pET28a vacío). M: Marcador de peso molecular (en Kb).

Los clones de las calles 2 y 19 mostraron amplicones con un tamaño superior al del resto de clones, que poseían un tamaño similar (0.3 Kb) al de los controles negativos (calles 9 y 27). El amplicón de la calle 2 mostró un tamaño aproximado de 1.9 Kb, mientras que el de la calle 19 fue de 1.5 Kb, compatibles con el tamaño esperado. Ambos clones fueron seleccionados, refrescados en placas frescas de LB Km⁵⁰ y conservados para posteriores análisis. El plásmido que portó el clon observado en la calle 2 se denominó pSVC-Gro y el plásmido del clon observado en la calle 19 se denominó pSVC-Eno.

Los plásmidos pSVC-Gro y pSVC-Eno se extrajeron de un cultivo *overnight* en LB Km⁵⁰ de 3 ml, tal y como se describe en la sección 3.5.2 de Materiales y Métodos y se cuantificaron espectrofotométricamente. Las concentraciones de plásmido obtenidas fueron 45.5 ng/µl en el caso de pSVC-Gro y 43.4 ng/µl en el caso de pSVC-Eno, concentraciones esperadas en plásmidos con un número de copias medio. Doscientos cincuenta nanogramos de cada plásmido se enviaron al servicio de secuenciación tal y como se indica en la sección 3.5.11 de Materiales y Métodos. La secuenciación se realizó a partir de los cebadores T7 Promotor y T7 Terminador, situados en el vector pET-28a, flanqueantes a los insertos *groEL* y *eno*, con objeto de confirmar el correcto ensamblaje de cada inserto en el plásmido pET-28a y la secuencia de los genes *groEL* y *eno*.

Tras el análisis de dichas secuencias se determinó que ambos genes se encontraban en fase con la región codificante de la cola de Histidinas, tal y como estaba diseñado. La secuencia del gen *eno* fue exactamente igual que la secuencia alojada en la base de datos del NCBI *GenBank* para la cepa bacteriana *B. pumilus* 15.1 (García-Ramón et al. 2015). Sin embargo, la secuencia del gen *groEL*, presente en pSVC-Gro mostró una variación en el nucleótido 397 de una A por una G, provocando una mutación no silenciosa en el residuo 133 de la proteína. El cambio de residuo 133 consistió en la sustitución de la Ile 133 por una Val. Dado que este fue un cambio conservativo, se decidió proseguir trabajando con el clon pSVC-Gro obtenido.

4.2.4. Expresión de los genes *eno* y *groEL* y producción de las proteínas Enolasa y GroEL de *B. pumilus* 15.1 en un sistema heterólogo

Los plásmidos pSVC-Eno, pSVC-Gro y pET-28a se introdujeron en la cepa *E. coli* BL21 (DE3), tal y como recomienda Novagen para la expresión de proteínas recombinantes en el sistema pET-28. Para ello, 40 ng de cada uno de los plásmidos se introdujo mediante choque térmico en células competentes de *E. coli* BL21 tal y como se describe en la sección 3.5.12 de Materiales y Métodos. Un clon de cada transformación fue
seleccionado al azar, cultivado en LB Km⁵⁰ y conservado a -80°C como describe la sección 3.2.3 de Materiales y Métodos.

Con las cepas resultantes, *E. coli* BL21 pSVC-Eno, *E. coli* BL21 pSVC-Gro y *E. coli* BL21 pET28a, se realizó un ensayo de la expresión de las proteínas Enolasa y GroEL, siguiendo la metodología descrita en la sección 3.9.1 de Materiales y Métodos y utilizando medio LB suplementado con Km⁵⁰. El crecimiento de los cultivos se siguió mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm y los cultivos se indujeron con IPTG 1 mM cuando alcanzaron una densidad óptica aproximada de 0.8. Tras la inducción, los cultivos se mantuvieron en las mismas condiciones de agitación y temperatura durante 3.5 h más. En este momento, las células se recogieron por centrifugación, se conservó el sobrenadante del cultivo a -20°C, y se procedió a realizar una lisis bacteriana con la fracción sedimento, tal y como se describe en el apartado 3.9.2 de Materiales y Métodos. De la fracción celular se obtuvo una fracción soluble (fracción citoplasmática) y una fracción insoluble (membranas y cuerpos de inclusión), que fueron analizadas por separado mediante electroforesis SDS-PAGE, junto con la fracción sobrenadante de los cultivos, con objeto de identificar en qué fracción estaban presentes las proteínas recombinantes. El resultado de estos estudios se puede observar en la **Figura 42**.



Figura 42. Electroforesis SDS-PAGE en acrilamida al 12% de las distintas fracciones de un cultivo bacteriano de *E. coli* BL21 (DE3) (calles 1-3 sobrenadante del cultivo, calles 4-6 fracción intracelular, calles 7-9 fracción insoluble celular) portando los plásmidos pET-28a (calles 1, 4 y 7), pSCV-Eno (calles 2, 5 y 8) y pSVC-Gro (calles 3, 6 y 9). M: marcador de peso molecular *BlueEasy prestained marker* de *Nippon Genetics*.

Como puede observarse en la **Figura 42**, hubo muy poco contenido proteico en la fracción sobrenadante, ya que se analizó sin aplicar ninguna técnica de concentración. En la fracción del contenido celular (fracción soluble) fue donde se observó una sobreexpresión de proteínas, una de 50 KDa aproximadamente (calle 5) correspondiente a la construcción pSVC-Eno y otra de 65 KDa (calle 6) correspondiente a la construcción pSVC-Eno y otra de 65 KDa (calle 6) correspondiente a la construcción pSVC-Gro. Dichas proteínas no estuvieron presentes en las fracciones de los cultivos que portaban el vector vacío pET28a (calles 4 y 7), por lo que parecían ser exclusivos de las cepas que portaban las construcciones pSVC-Eno y pSVC-Eno.

En la fracción sedimento pudo observarse la presencia de estas dos proteínas, pero en cantidades mucho menores (calles 8 y 9). Los tamaños teóricos de las proteínas Enolasa y GroEL recombinantes (teniendo en cuenta la fusión con la cola de His) fueron 49.9 KDa y 60.8 KDa respectivamente. Dada la alta sobreexpresión de las proteínas observadas, la ausencia de dichas proteínas en el vector vacío y la coincidencia con los tamaños observados y teóricos no es arriesgado afirmar que las proteínas sobreproducidas en las calles 5 y 6 corresponden a las proteínas Enolasa y GroEL de *B. pumilus* 15.1 respectivamente.

Las proteínas de la fracción soluble celular, que se encontraban en tampón de lisis, se dializaron frente a PBS y centrifugaron a través de tubos concentradores *Amicon* Ultra-15 *centrifugal-filters* de *Millipore* con un *cut off* de 10,000 Da, con el objeto de eliminar el tampón de lisis y concentrarlas, antes de usarlas en análisis posteriores.

4.2.5. Bioensayo de las proteínas Enolasa y GroEL en larvas de *C. capitata*

Una vez intercambiado el tampón de lisis por PBS y concentradas las muestras mediante concentradores, se llevó a cabo la cuantificación de las proteínas Enolasa y GroEL en un gel de acrilamida. Para ello se incluyó un patrón con 10, 5, 2.5 y 1,25 µg de BSA junto con las muestras a cuantificar, tal y como se especifica en el apartado 3.7.4 de Materiales y Métodos.



El resultado del gel de acrilamida puede observarse en la Figura 43.

Figura 43. Electroforesis SDS-PAGE en acrilamida al 12% de distintas muestras proteicas. La cuantificación de las proteínas Enolasa (Eno) y GroEL (Gro) se realizó mediante comparación con un patrón de BSA de cantidades conocidas (10, 5, 2.5 y 1.25 µg) con el software *ImageLab* de *Biorad*. M muestra el marcador de peso molecular *Precision Plus Protein All Blue* de *Biorad*.

Las concentraciones de proteína estimadas fueron 0.94 μ g/ μ l para la proteína Enolasa y 1.44 μ g/ μ l para la proteína GroEL. En la muestra procedente del vector vacío pET28a, al carecer de la presencia de una banda mayoritaria no se realizó ninguna cuantificación. Una vez realizada la cuantificación de las muestras, las proteínas Enolasa y GroEL se utilizaron para realizar un bioensayo de contaminación de dieta con larvas de primer estadio de C. capitata, tal y como se especifica en el apartado 3.11.2 de Materiales y Métodos. Para ello, se utilizaron 250 µg de cada proteína (266 µl de la muestra de Enolasa y 177 µl de la muestra de GroEL). Cada una de las muestras se completó con PBS hasta un volumen final de 500 μ l y se mezclaron con 2.5 ml de dieta de para larvas estéril, de forma que cada proteína estuvo a una concentración final aproximada de 100 µg/ml de dieta. Una vez atemperado el medio, se colocó en una placa Petri y sobre él se dispusieron 48 larvas de primer estadio de C. capitata. Tras la incubación a 25°C durante 14 días, se llevó a cabo el conteo de las larvas supervivientes. La mortalidad observada con cada uno de los tratamientos se comparó con la observada en los controles negativos (agua miliQ estéril, tampón PBS y el contenido citoplasmático de un cultivo portando el vector vacío pET28a). Los resultados de mortalidad obtenidos se muestran en la Figura 44 y la Tabla 13.



Figura 44. Porcentaje de mortalidad observado en larvas de *C. capitata* sometidas a diferentes tratamientos en un ensayo de contaminación de dieta. El conteo se llevó a cabo a los 14 días del comienzo del bioensayo. El resultado observado es la media realizada a partir de tres replicas independientes.

Como puede observarse en la **Figura 44**, el mayor porcentaje de mortalidad se obtuvo en aquellos tratamientos donde las larvas fueron alimentadas con dieta contaminada con la proteína Enolasa. Sin embargo, la mortalidad observada (24%) fue muy similar a la observada en el control con tampón PBS (20%). La inclusión en la dieta de la proteína GroEL causó solo un 6% de mortalidad en las larvas de *C. capitata*, inferior a la observada en los controles negativos. Estos resultados muestran que ni la proteína Enolasa ni GroEL fueron tóxicas por ingestión para las larvas de *C. capitata* en las condiciones ensayadas.

Tratamiento	Mortalidad (%)		
Agua	10 ± 2.83		
pET28a	0 ± 0.00		
Enolasa	24 ± 5.66		
GROEL	6 ± 2.83		
PBS	20 ± 0.00		

 Tabla 13. Mortalidad media y desviación estándar obtenida en diferentes bioensayos de contaminación de dieta frente a larvas de primer estadio de *C. capitata* tras 14 días.

4.3. Capítulo III. Identificación y análisis bioinformático de una región del genoma de *B. pumilus* 15.1 codificante de proteínas de fagos

Antecedentes

Como se ha descrito con anterioridad en la introducción de esta tesis, la capacidad entomopatógena de la mayoría de las bacterias y hongos está a menudo determinada por una serie de factores de virulencia que actúan conjuntamente para llevar a cabo la acción entomopatógena frente al insecto diana.

El origen de estos mecanismos entomopatógenos puede ser muy variado y no siempre presentan un origen bacteriano. El estudio de cepas entomopatógenas, como las bacterias del género *Photorhabdus*, las cuales viven de manera simbiótica con nematodos entomopatógenos o *S. entomophila*, que son capaces de desplegar un amplio arsenal de mecanismos moleculares para llevar a cabo su actividad entomopatógena, ha permitido identificar sistemas patogénicos codificados por regiones del ADN con un más que probable origen vírico, el cual parece haber sido adaptado por la bacteria para su propio beneficio.

Estos sistemas, conocidos como "*Photorhabdus* virulence factor" o PVC en el caso de la bacteria *Photorhabdus* (N. Waterfield, Hares, et al., 2005) o el "*antifeeding system*" de la bacteria *S. entomophyla* (M. R. H.Hurst et al., 2004) son sistemas homólogos, que están codificados por un *loci* que presenta ORFs codificantes de proteínas de origen vírico. Concretamente, estos sistemas están compuestos por proteínas de la cola y la placa basal de bacteriófagos, y forman estructuras similares a las piocinas tipo R, bacteriocinas con una estructura muy similar a la cola contráctil de los fagos caudados.

Durante la caracterización de la cepa *B. pumilus* 15.1 en trabajos anteriores se ha podido observar cómo cuando se cultiva la cepa a elevada temperatura (por ejemplo 50°C) se produce un crecimiento bacteriano inicial aparentemente normal, medido como incremento de la D.O. _{600 nm}, seguido de un fuerte descenso (lisis) tras 15-20 h de cultivo (**Figura 45**).



Figura 45. Representación semilogarítmica de la evolución de la densidad óptica medida a 600 nm frente al tiempo (h) de cultivos de *B. pumilus* 15.1 incubados a diferentes temperaturas (20-50°C). Extraída de Alarcón 2011.

Este mismo fenómeno de lisis se ha observado también cuando la cepa *B. pumilus* 15.1 se cultiva en condiciones de restricción de oxígeno, es decir cuando no se respeta la relación 5:1 de aire:medio, proporción utilizada normalmente para los cultivos bacterianos. En un principio la densidad óptica del cultivo aumenta de forma normal, pero llega un momento en el que cae drásticamente.

El fenómeno de disminución de la densidad óptica del cultivo una vez alcanzada determinada turbidez recordaba a la lisis observada durante la inducción del ciclo lítico de un bacteriófago o fago, motivo por el cual nuestro grupo comenzó a barajar la posibilidad de la existencia de un fago lisogénico en *B. pumilus* 15.1.

Por esta razón, y debido a la posibilidad de que el posible fago presente en el genoma de la cepa *B. pumilus* 15.1 estuviera relacionado con la toxicidad frente a *C. capitata*, iniciamos su búsqueda y caracterización en el genoma.

4.3.1. Predicción bioinformática e identificación del posible profago en el genoma de *B. pumilus* 15.1

La identificación y localización del posible profago presente en el genoma bacteriano de la cepa *B. pumilus* 15.1 se llevó a cabo con una búsqueda *in silico* de regiones homólogas a proteínas de fagos.

Aprovechando que nuestro grupo de investigación había llevado a cabo la secuenciación del genoma de esta cepa bacteriana mediante la tecnología Illumina HiSeq 2000 (García-Ramón et al. 2015) y que estaba disponible en 63 cóntigos en el Centro Nacional de Datos

Bioinformáticos (NCBI), bajo los números de referencia NZ_LBDK0100001.1 – NZ_LBDK01000063.1, realizamos un análisis bioinformático del genoma de la bacteria. Todos los cóntigos se evaluaron mediante el software bioinformático PHASTER (*PHage Search Tool-Enchanced Realesed*) desarrollado por la Universidad de Alberta (Zhou et al. 2011; Arndt et al. 2016). Esta herramienta bioinformática permite comparar genomas completos, parciales sin anotar o parcialmente anotados, con una base de datos que combina secuencias proteicas del NCBI, bases de datos de fagos y la base de datos de profagos desarrollada por Srividhya (Srividhya et al. 2006), con el fin de buscar regiones con alta similitud. Los genes que presentan similitud con profagos son anotados posteriormente mediante una segunda búsqueda mediante *Blast*+.

El resultado de dicha búsqueda fue la identificación en el genoma de *B. pumilus* 15.1 de una región de 98.1 Kb que potencialmente codificaba un profago. Esta región se encontró en el cóntigo 59 y obtuvo la máxima puntuación (150) según el algoritmo PHASTER, el cual lo calificó como un profago intacto (Fecha de la consulta noviembre de 2018).

La región identificada por PHASTER presentó 127 marcos de lectura abiertos u ORFs con un porcentaje medio de Guanina-Citosina (% GC) del 45.02% (**Figura 46**).

Total: 1 pro	Total: 1 prophage regions have been identified, of which 1 regions are intact, 0 regions are incomplete, and 0 regions are questionable.							
Region	Region Length	Completeness	Score	# Total Proteins	Region Position	Most Common Phage	GC %	Details
1	98.1Kb	intact	150	127	10739-108900 🛈	PHAGE_Paenib_Tripp_NC_028930(28)	45.02%	Show 🛈

Figura 46. Resultado obtenido mediante el software PHASTER tras la búsqueda de regiones similares a fagos utilizando los 63 cóntigos del genoma de *B. pumilus* 15.1 presentes en la base de datos del NCBI.

Además, se llevó a cabo una búsqueda de ARNts en la secuencia identificada por PHASTER, mediante el software tRNA *scan*-SE, la cual permitió identificar un ARNt para Alanina en esta región. Esta secuencia se encontró en el extremo 3' de la secuencia de 98 Kb identificada mediante PHASTER, en la hebra antisentido, entre las bases 94.003 y 93.931 (72 pb). La presencia de ARNt en los genomas de fagos es algo habitual, y se produce en mayor proporción en los fagos virulentos. Probablemente este hecho está relacionado con la optimización de los codones para la síntesis de las proteínas virales, diferentes a los utilizados por el huésped. Esta optimización proporciona una ventaja al permitir una mayor síntesis de las proteínas del fago, traduciéndose en una reducción en el tiempo de latencia del virus y de duplicación (Bailly-Bechet et al. 2007). Además, se ha descrito cómo estas secuencias de ARNt son lugares habituales de inserción de fagos y plásmidos (Canchaya et al. 2004).

4.3.2. Estudio de la organización genética de la región de 98.1 Kb identificada por PHASTER.

4.3.2.1. Búsqueda de homología mediante alineamiento de secuencias

Una vez identificada por PHASTER la posible región codificante de un fago en el genoma de *B. pumilus* 15.1, se llevó a cabo un estudio global de la secuencia. En primer lugar, para comprobar si esta región había sido identificada con anterioridad o presentaba homología con algunos de los fagos ya secuenciados y descritos en la bibliografía, se realizó una comparación con todos los genomas completos de bacteriófagos del género *Bacillus* secuenciados hasta el momento y disponibles en la base de datos *Virus-Host Database*.

La búsqueda se realizó por hospedador. El resultado de la búsqueda permitió recopilar el genoma completo de 142 fagos conocidos por llevar a cabo su ciclo de infección sobre diferentes especies del género *Bacillus*.

La comparación de los genomas de bacteriófagos obtenidos de la base de datos y la secuencia obtenida por PHASTER se llevó a cabo mediante *blastn* y mediante *dotplot*. El resultado de este análisis mostró que no existió similitud relevante entre la organización de la región de 98.1 Kb de *B. pumilus* 15.1 y las registradas con anterioridad en la base de datos de virus.

Sin embargo, el análisis de la secuencia mediante *Blastn* permitió observar cómo la región de 98.1 Kb parecía dividirse en dos regiones con diferente prevalencia en las bases de datos (**Figura 47**). Una región de 28,695 pb en la región 5' (Región I) presentó una elevada prevalencia en las bases de datos mientras que otra de 60,213 pb, en la región 3', fue menos frecuente. La región de 28.7 Kb se identificó en todos los genomas secuenciados de especies del grupo de *B. pumilus*, el cual incluye las especies *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. stratosphericus*, *B. altitudinis* y *B. aerophilus*, con un porcentaje de identidad mayor al 90% y una cobertura por encima del 80%. La región II, de 60.2 Kb, fue mucho menos frecuente y solo apareció en 5 genomas de bacterias pertenecientes al grupo de *B. pumilus*, con un porcentaje de identidad mayor al 90% y una cobertura que osciló entre el 67 y 76%.

Además de la diferencia en la prevalencia de estas dos regiones, un análisis del contenido de Guanina y Citosina (%GC) mostró también una diferencia significativa entre ambas regiones del fragmento de 98.1 Kb. Mientras que la región de 28.7 Kb presentó un contenido de GC del 40.5%, similar al encontrado en el genoma de *B. pumilus* (41.6%), la región de 60.2 Kb presentó un contenido en GC de 47.7%, mucho mayor al esperado para *B. pumilus*.

Un estudio en profundidad de los genomas de estas 5 cepas, en comparación con las que carecían de la región de 60.2 Kb, permitió observar que la región de 60.2 Kb en *B. pumilus* 15.1 estaba flanqueada por una secuencia corta y repetida (*short direct repeat*), que se

encontraba a su vez en el interior de la secuencia del gen responsable de la síntesis del ARNt para Alanina, previamente identificada mediante tRNA scan-SE y descrita arriba.



Figura 47. Representación esquemática de la región de 98.1 Kb detectada por PHASTER (región coloreada) y las regiones adyacentes (Negro) en el cóntigo 59 de *B. pumilus* 15.1 (Número de acceso NZ_LBDK01000059.1). La Región de 28.7 Kb se muestra resaltada en verde, mientras que la región de 60.2 Kb se encuentra marcada en morado. El contenido GC de la región está indicado mediante el gráfico de la parte superior. La línea azul indica el porcentaje de GC medio del fragmento de 98.1 Kb, mientras que la verde marca la concentración media de *B. pumilus*. Todos los datos obtenidos hasta el momento parecían indicar que las regiones de 28.7 y 60.2 Kb encontradas en la región identificada por PHASTER podían tener un origen heterólogo y por tanto decidimos llevar a cabo su estudio de manera independiente.

4.3.2.2. Predicción de la función de los ORFs en la región de 98.1 Kb identificada por PHASTER

Una vez identificada la potencial región codificante de las partículas víricas en el genoma de *B. pumilus* 15.1 se llevó a cabo un estudio bioinformático de cada ORF, para identificar su función mediante análisis comparativo. Para ello, cada ORF identificado, se analizó y se comparó con las bases de datos mediante *Blastp*.

Para llevar a cabo la predicción de la posible función de cada ORF se siguió el siguiente flujo de trabajo:

- En primer lugar, se tuvo en cuenta la presencia/ausencia de motivos conservados relacionados con familias de proteínas conocidas, siempre y cuando el E-valor fuera inferior a 10⁻⁵.
- 2. En ausencia de estos dominios conservados se tuvo en cuenta la anotación de las proteínas con mayor similitud tras el análisis mediante la base de datos del NCBI con *Blastp*.
- 3. Por último, en caso de no poder asignar una función al ORF, se tuvo en cuenta la asignación de la función recibida por PHASTER.

El resultado de la predicción de las funciones a cada uno de los ORFs identificados por PHASTER se recoge en las **Tablas 14** y **16**, correspondientes a la región de 28.7 y 60.2 Kb respectivamente.

4.3.3. Estudio de la región de 28.7 Kb

4.3.3.1. Organización de los ORFs de la región de 28.7 Kb

En la región de 28.7 Kb se identificaron 40 ORFs (**Tabla 14**), con un tamaño medio de 674 pb, siendo el de menor tamaño el ORF 34, con 141 pb, y el de mayor el ORF 21, con 4272 pb. Todos los ORFs, excepto el ORF 1, estuvieron transcritos en la misma dirección, en la cadena directa. El análisis global de las funciones de los genes de la región de 28.7 Kb permitió identificar los 3 clústeres propios de los fagos caudados, esto es, el clúster de expresión temprana, media y tardía (S. Casjens, 2003; Kwan et al., 2005). La predicción de cada módulo también se muestra en la **Tabla 14**.

Mediante estudios comparativos se predijo que el clúster de genes de expresión temprana estaba constituido por el ORF 1, el cual fue homólogo a reguladores transcripcionales de la familia HTH_XRE (con un E-valor de 10^-13) y con el regulador *xre* del fago defectivo PBSX. Este gen, en *B. subtilis*, codifica un represor transcripcional de los genes del profago PBSX.

PBSX es un profago defectivo presente en el genoma de *B. subtilis* 168, ampliamente estudiado, el cual es capaz de producir, mediante la inducción de su ciclo lítico, partículas similares a fagos que son liberadas tras la lisis de las bacterias vegetativas. Estas partículas similares a fagos, PSF a partir de ahora, presentan ciertas características especiales.

Tabla 14. Predicción de los ORFs en la región de 28.7 Kb identificada por PHASTER. Los ORFs se encuentran
ordenados según su posición en el genoma, y se detalla la función propuesta tras el análisis mediante Blastp
(a no ser que se indique lo contrario). El sentido de la transcripción de cada ORF, el tamaño de la proteína
predicha y la pertenencia a un módulo de transcripción u otro también se indican.ORFDirección de la
transcripciónNº de aa
predichosMódulo

ORF	Dirección de la transcripción	Nº de aa predichos	Función predicha	Módulo
1	-	125	Regulador transcripcional de la familia XRE	Temprano
2	+	87	Regulador transcripcional de la familia XRE	
3	+	75	Proteína hipotética	
4	+	133	Resolvasa de estructuras de Holliday	Medio
5	+	68	Proteína hipotética con dominio XtrA	
6	+	172	Regulador positivo sigma	
7	+	214	Subunidad menor de la terminasa*	
8	+	437	Subunidad mayor de la terminasa	
9	+	485	Proteína portal	
10	+	362	Posible serin proteasa de fagos	
11	+	307	Proteína principal de la cápside	
12	+	127	Proteína conectora de la cabeza y cola	
13	+	118	Proteína del eje de la cola	Tardío
14	+	165	Componente de la cola	
15	+	151	Proteína hipotética	
16	+	70	Proteína hipotética	
17	+	448	Proteína de la envuelta de la cola	
18	+	147	Proteína del tubo de la cola	
19	+	73	Proteína hipotética	
20	+	146	Chaperona de ensamblaje de la cola	
21	+	1423	TMP con dominio transglicosilasa	

22	+	222	LysM dominio de unión al		
			peptidoglicano		
23	+	336	Proteína hipotética		
24	+	88	DUF2577 Función		
27	·	00	desconocida		
25	+	140	DUF 2634 Función		
20		1.0	desconocida		
26	+	349	Proteína J de la placa basal		
27	+	307	DUF 2313. Familia de		
			proteínas de la cola		
20		407			
28	+	127	DUF3751 Proteina de las		
			fibras del cuello		
29	+	290	Proteína hipotética		
30	+	109	Proteína XkdW		
31	+	63	Proteína XkdX		
32	+	371	Superfamilia PHA01818		
33	+	106	Proteína hipotética		
34	+	46	Proteína XkdX		
35	+	470	Proteína hipotética		
36	+	115	Posible fibra corta de la cola*		
37	+	48	Proteína XkdX		
38	+	70	Holina BhlA		
39	+	87	Holina		
40	4	267	N-acetilmuramoil-L-alanina		
40	Т	207	amidasa		

*Función predicha por PHASTER.

+/- Indica dirección Sentido/Antisentido de la transcripción respectivamente.

El clúster de genes de expresión media estuvo formado por 5 genes, ORF 2-ORF 6, de los cuales 3 codifican proteínas potenciales relacionadas con la regulación del ADN. El ORF 2 fue homólogo a un regulador transcripcional (dominio conservado HTH_XRE con un E-valor de 10^-09), muy diferente al que existe en el profago PBSX. El ORF 4 presentó un 98,5% de identidad con genes que codifican resolvasas, endonucleasas especializadas en deshacer las llamadas estructuras de *Holliday*, intermediarios que pueden formarse durante la recombinación del ADN. El ORF 6 presentó un dominio conservado del factor sigma 70 (E-valor de 10^-70), un regulador de la ARN polimerasa. El ORF 6 mostró también homología con el gen *xpf*, el regulador transcripcional del profago PBSX. Los otros dos ORFs presentes en el clúster no presentaron dominios conservados ni homología con proteínas de función conocida, por lo que fueron clasificados como proteínas hipotéticas (**Figura 48**).

El clúster de genes de expresión tardía estuvo compuesto por todas las proteínas estructurales que forman parte de las partículas fagos y participan en la lisis de la bacteria. La organización de este clúster fue muy similar a la organización del profago PBSX. Además, esta

región del genoma mostró la organización típica de los fagos caudados (fagos con cola), iniciándose con las proteínas que forman la cabeza y el cuello, continuando con las proteínas de la cola y finalizando con las proteínas que forman la placa basal y las fibras del fago. Por último, se encontraron las proteínas relacionadas con la lisis bacteriana, las cuales permiten a los fagos romper la célula hospedadora y liberarse al medio para poder comenzar con un nuevo ciclo de infección.



Figura 48. Representación esquemática de la región de 28.7 Kb detectada en el cóntigo 59 de *B. pumilus* 15.1 (NZ_LBDK01000059.1). Los ORFs se colorearon basándose en la función predicha mediante los estudios bioinformáticos (Tabla 14). Los diferentes clústeres de genes observados se indicaron mediante números romanos, (I) clúster de expresión temprana, (II) clúster de expresión tardía.

Los ORF 7 y ORF 8 fueron homólogos a la subunidad menor y mayor respectivamente de la terminasa (dominios conservados con E-valor de 10^-32 y 10^-147 respectivamente), proteína encargada del reconocimiento e hidrólisis del ADN que se empaqueta en la cabeza de los fagos. El ORF 9 fue homólogo a proteínas portal (E-valor de 10^-110), que forman parte del poro a través del cual se incorpora el ADN a la cabeza del fago. El ORF 10 presentó homología (E-valor 10^-57) con una proteasa relacionada con la maduración de las proteínas de la cabeza, el ORF 11 (E-valor 10^-19) con chaperonas que ayudan a ensamblar las proteínas de la cabeza, y, por último, el ORF 12 (E-valor 10^-29) con proteínas que forman el conector entre la cabeza del virus y las proteínas que forman la cola.

Además, en este clúster se encontraron ORFs homólogos a los que codifican las proteínas de la cola de los fagos, (ORF 14; E-valor 10^-13), las proteínas de la envuelta (ORF 17; E-valor 10^-43), las del tubo de la cola (ORF 18; E-valor 10^-47), chaperonas (ORF 20; E-valor 10^-43) y la proteína TMP o *Tape Measure Protein* de la cola (ORF 21; E-valor 10^-49), que está relacionada con la longitud de la cola de los fagos (Belcaid et al. 2011). Para terminar, se observaron ORFs homólogos a aquellos que producen proteínas responsables de la formación de la placa basal, (ORF 24-25-26; E-valor 10^-14, 10^-29 y 10^-80 respectivamente), proteínas relacionadas con la lisis bacteriana (ORF 31-34-37) con dos holinas (ORFs 38 y 39; E-valor 10^-21 y 10^-28) y con una transglicosilasa (ORF 40; E-valor 10^-39), responsable de la degradación del peptidoglicano bacteriano.

4.3.3.2. Evaluación de la presencia de la región de 28.7 Kb, similar a PBSX, en otros genomas de bacterias del grupo de B. pumilus.

Una búsqueda de la región de 28.7 Kb en las bases de datos mediante la herramienta *Blastn* permitió observar cómo esta región se encontraba ampliamente conservada en cepas relacionadas con *B. pumilus*. Todas las especies pertenecientes al grupo de *B. pumilus* que han sido secuenciadas presentan una región homóloga y con la misma organización genómica que la encontrada en *B. pumilus* 15.1. En los análisis comparativos se obtuvieron 38 genomas completos de bacterias del grupo de *B. pumilus* que se encontraban secuenciados hasta ese momento (2019) (en la actualidad, abril del 2022, hay 73 genomas), los cuales presentaron una región homóloga a la región de 28.7 Kb, con un porcentaje de identidad entre el 87.16 y el 97.92% y un porcentaje de cobertura que osciló entre el 70 y el 93% (**Tabla 15**).

Table 15. Cepas bacterianas y números de acceso de las principales coincidencias obtenidas durante la comparación de la región de 28.7 Kb de *B. pumilus* 15.1 con las secuencias del *GenBank*. El porcentaje de cobertura y la identidad de los alineamientos se indicaron también en la tabla. En negrita se marcaron las cepas utilizadas para llevar a cabo las Figuras 49 y 50.

	Organismo	Cobertura	Identidad	Número de Acceso
1	Bacillus sp WP8	0,86	98.01%	CP010075.1
2	Bacillus safensis strain U17-1	0,85	97.14%	CP015611.1

3	Bacillus safensis strain U41	0,85	97.14%	CP015610.1
4	Bacillus safensis strain KCTC 12796BP	0,85	95.98%	CP018197.1
5	Bacillus safensis strain U14-5	0,79	95.95%	CP015607.1
6	Bacillus safensis strain FO-36b	0,84	95.93%	CP010405.1
7	Bacillus safensis strain BRM1	0,83	95.58%	CP018100.1
8	<i>Bacillus safensis</i> strain sami	0,85	95.52%	CP032830.1
9	Bacillus safensis strain pgKB20	0,89	95.52%	CP043404.1
10	Bacillus safensis strain IDN1	0,87	94.79%	AP021906.1
11	Bacillus altitudinis strain Cr-1	0,88	87.44%	CP031774.1
12	Bacillus pumilus strain C4	0,87	87.30%	CP011109.1
13	Bacillus pumilus strain SH-B11	0,94	86.86%	CP010997.1
14	Bacillus pumilus strain PDSLzg-1	0,81	92.32%	CP016784.1
15	Bacillus pumilus strain ZB201701	0,83	92.30%	CP029464.1
16	Bacillus pumilus strain MTCC B6033	0,89	87.92%	CP007436.1
17	Bacillus altitudinis strain P-10	0,79	87.91%	CP024204.1
18	Bacillus altitudinis strain GQYP101	0,85	87.84%	CP040514.1
19	Bacillus pumilus strain NCTC10337	0,83	91.72%	LT906438.1
20	Bacillus altitudinis strain W3	0,86	87.80%	CP011150.1
21	Bacillus phage PBP180	0,81	88.05%	KC847113.1
22	Bacillus pumilus strain 145	0,82	91.54%	CP027116.1
23	Bacillus cellulasensis strain ku-bf1	0,77	87.68%	CP014165.1
24	Bacillus cellulasensis strain NJ-V	0,82	87.63%	CP012330.1
25	Bacillus cellulasensis strain NJ-V2	0,82	87.63%	CP012482.1
26	Bacillus cellulasensis strain NJ-M2	0,82	87.63%	CP012329.1
27	Bacillus cellulasensis strain GLB197	0,83	87.61%	CP018574.1
28	Bacillus pumilus strain TUAT1	0,83	87.61%	AP014928.1
29	Bacillus aerophilus strain 232	0,84	87.59%	CP026008.1
30	Bacillus altitudinis strain SGAir0031	0,86	87.58%	CP022319.2
31	Bacillus altitudinis strain GR-8	0,83	87.67%	CP009108.1
32	Bacillus altitudinis strain HQ-51-Ba	0,77	87.56%	CP040747.1
33	Bacillus pumilus strain SH-B9	0,78	91.26%	CP011007.1
34	Bacillus altitudinis strain CHB19	0,77	87.42%	CP043559.1
35	Bacillus pumilus strain SF-4	0,78	91.01%	CP047089.1
36	Bacillus pumilus strain SAFR-032	0,8	90.94%	CP000813.4
37	Bacillus pumilus strain 150a	0,75	90.93%	CP027034.1
38	Bacillus xiamenensis strain VV3	0,77	88.58%	CP017786.1
39	Bacillus altitudinis strain FD48	0,8	87.77%	CP025643.1
40	Bacillus sp ms-22	0,82	88.48%	CP046653.1

Con algunas secuencias seleccionadas (marcadas en negrita) se realizó un análisis de la identidad media de nucleótidos (ANI del inglés <u>Average Nucleotide Identity</u>) mediante el algoritmo JspeciesWS. La sintenia, es decir la co-localización de los genes u organización de los mismos, se llevó a cabo mediante un análisis con *Dotplot* (**Figura 49**).

Como cabría esperar, el porcentaje de identidad entre las secuencias homólogas se redujo a medida que las especies bacterianas se alejaban filogenéticamente entre sí. Sin embargo, la organización genómica de esta región se mantuvo estable a lo largo de las especies de *Bacillus* estudiadas.



Figure 49. Comparación global mediante *Dotplot* de las regiones homólogas a la región de 28.7 Kb encontrada en *B. pumilus* 15.1 similar a PBSX (marcadas en negrita en la Tabla 15). Las comparaciones fueron realizadas mediante le software *Gepard* 1.40 (Krumsiek et al. 2007) con una longitud de 10 nucleótidos. Las regiones de baja identidad se marcaron con flechas en la Figura.

Como se observa en la **Figura 49**, la sintenia de los genes presentes en la región de 28.7 Kb se encuentra altamente conservada en todas las cepas estudiadas. Únicamente se observaron dos regiones donde la identidad se redujo en todos casos (flechas negra y gris de la **Figura 49** y 50). La primera región (flecha negra) se encontró a mitad de la secuencia estudiada, mientras que la segunda región de variabilidad (flecha gris) se observó en la región 3´ de la región de 28.7 Kb. Un análisis de estas dos regiones mostró que las ORF donde se observó esta variabilidad estuvieron asociadas con genes relacionados con la lisis bacteriana.



Figura 50. Análisis comparativo de las regiones similares a la región de 28.7 Kb, similar a PBSX, con regiones homólogas en otras bacterias relacionadas con *B. pumilus*. La potencial función de cada ORF se infirió a partir de *Blastp*. La homología se evaluó mediante *tBlastx* y se graficaron mediante el software *EasyFig.* La

homología se mostró mediante un gradiente morado-rosa en función del porcentaje de homología encontrado en cada región con un mínimo de 50 pb. El color de cada ORF se asignó a partir de la potencial función asignada en la Tabla 14. Los ARNt se marcaron mediante asteriscos. Las regiones de baja afinidad observadas mediante *Dotplot* se marcaron mediante flechas del mismo color que en la Figura 49.

La primera región variable (flecha negra) se encontró dentro del ORF 21, el cual es homólogo al gen *xkdO* del profago PBSX. Este ORF codifica para una posible TMP (*Tape Measure Protein*) la cual se ha demostrado que determina la longitud de la cola de los fagos caudados (Belcaid et al. 2011; Rodríguez-Rubio et al. 2012; Mahony et al. 2016). En el fago T4, la proteína TMP es expulsada una vez se produce la unión irreversible del fago a su receptor bacteriano, antes de producirse la inyección del ADN en la bacteria (Hu et al. 2015). La proteína TMP contiene un dominio transglicosilasa conservado que parece participar en la degradación del peptidoglicano, mediante la hidrólisis del enlace beta 1-4 del mismo, facilitando así la inyección del material genético en la bacteria hospedadora. Se observó que la región variable descrita anteriormente (flecha negra, **Figura 50**), se encontró fuera de este dominio transglicosilasa en el extremo C-terminal, extremo altamente conservado, y que presenta una región variable para el reconocimiento específico de moléculas/receptores en las células huésped.

La segunda región variable (flecha gris) estuvo constituida por una región amplia que incluye desde el ORF 32 hasta el ORF 37 (aproximadamente 3 Kb). Esta región, por su posición relativa en el genoma de los fagos, podrían codificar proteínas para formar las fibras de la cola, las cuales se encuentran cercanas a las proteínas responsables de la lisis bacteriana. Las proteínas de las fibras de la cola son habitualmente las responsables de la alta especificidad que presentan los fagos, ya que se encargan del reconocimiento de los receptores bacterianos, que sirven como diana para la unión primaria (reversible) y secundaria (irreversible) cuando se produce la infección. Este hecho podría explicar la alta variabilidad observada en esta región del genoma. En esta región de alta variabilidad también existieron ORFs (el 31 y el 34) con función desconocida, pero que mostraron un dominio conservado Xkdx, generalmente asociado a proteínas líticas y cercanas a genes que codifican holinas (ORFs 38 y 39) o endolisinas (ORF 40).

4.3.4. Estudio de la región de 60.2 Kb

En la región de 60.2 Kb se encontraron 86 ORFs, con un tamaño medio de 617 pb, siendo el menor el ORF 77, con 141 pb, y el mayor, el ORF 71, con 2805 pb. La gran mayoría de los ORFs encontrados en esta región se transcribieron en la misma dirección (directa), con la excepción de 10 ORFs (53, 54, 83, 88, 89, 97, 123, 124, 125 y 127), que se transcribieron en la cadena reversa. De estos 10 ORFs, 4 presentaron homología con genes relacionados con la regulación transcripcional de otros genes (ORF 53, 54, 123 y 125) y 2 fueron homólogos a genes

relacionados con el ADN y con funciones como la integración/recombinación del ADN (ORF 97 y 127).

Cuando se llevó a cabo el estudio de la posible función de los ORFs codificados en la región de 60.2 Kb de *B. pumilus* 15.1 no se observó una organización similar a ninguna región descrita con anterioridad, como ocurrió con la región de 28.7 Kb. Sin embargo, sí que se observó una clara diferencia en funciones de la región 5'y la 3'del fragmento de 60.2 Kb. Por ello, la región de 60.2 Kb se dividió en dos subregiones (**Tabla 16**). Mientras que la subregión 1 presentó principalmente ORFs con una función reguladora del ADN y relacionada con el metabolismo de este, la subregión 2 estuvo constituida por ORFs que codifican proteínas estructurales de bacteriófagos. Aunque estas dos subregiones presentaron un porcentaje similar de GC (47.84% para la subregión 1 y 47.54% la subregión 2) y no se predijeron diferencias en el origen filogenético de ambas, aun así, se llevó a cabo la separación de estas dos subregiones solamente con fines descriptivos.

Tabla 16. Predicción de los ORFs de la región de 60 Kb identificada mediante PHASTER. Los ORFs pertenecientes a las diferentes subregiones propuestas se encuentran sombreados en gris (subregión 1) o sin sombrear (subregión 2). Cada ORF se encuentra ordenado según su posición en el genoma. La predicción de la función se llevó a cabo mediante Blastp, a no ser que se indique lo contrario. El sentido de la transcripción de cada ORF y el tamaño de la proteína predicha también se indican.

OPE	Direcció	Nº de aa	Eunción predicha		
	n	predichos			
42	+	150	Proteína hipotética		
43	+	138	Regulador transcripcional con dominio Helix-turn-helix		
44	+	121	Proteína hipotética		
45	+	75	Proteína hipotética		
46	+	125	Proteína hipotética		
47	+	122	Proteína hipotética		
48	+	269	Proteína hipotética		
49	+	253	Proteína de replicación del ADN con dominio de unión a ATP		
50	+	216	Proteína hipotética		
51	+	463	ADN helicasa		
52	+	333	ADN primasa		
53	-	104	Regulador transcripcional XRE		
54	-	68	Regulador transcripcional XRE		
55	+	388	Proteína hipotética		
56	+	176	Proteína hipotética		
57	+	167	Proteína hipotética		
58	+	257	Proteína hipotética		
59	+	83	Proteína hipotética		
60	+	144	Proteína hipotética		
61	+	237	Proteína hipotética		
62	+	759	ADN Polimerasa I		
63	+	349	Proteína hipotética		

64	+	84	Proteína hipotética		
65	+	65	Proteína hipotética		
66	+	184	Resolvasa de estructuras de Holliday		
67	+	164	Proteína hipotética		
68	+	87	Proteína hipotética		
69	+	121	Proteína hipotética		
70	+	67	Proteína hipotética		
71	+	64	Proteína hipotética		
			Clase 1b ribonucleosido-difosfato reductasa flavoproteína de		
72	+	118	ensamblaje Nrdl		
73	+	695	Clase 1b ribonucleosido-difosfato reductasa subunidad alpha		
74	+	324	Class 1b ribonucleosido-difosfato reductasa subunidad beta		
75	+	64	Proteína hipotética		
76	+	70	Proteína hipotética		
77	+	108	Deoxiuridina 5'-trifosfato nucleotido hidrolasa		
78	+	166	Proteína hipotética		
79	+	264	Timidilato sintasa dependiente de FAD		
80	+	164	transglicosilasas líticas mltA-like con sitio activo aspartato		
81	+	283	Proteína hipotética		
82	+	186	Defosfo-CoA quinasa		
83	-	124	Proteína hipotética		
84	+	124	Dominio DUF134		
85	+	68	Proteína hipotética		
86	+	162	Proteína hipotética		
87	+	278	Regulador transcripcional de la familia MarR		
88	-	61	Proteína hipotética		
89	-	127	Proteína hipotética		
90	+	70	Regulador transcripcional de la familia XRE		
91	+	93	Proteína hipotética		
92	+	93	Proteína hipotética		
93	+	95	Proteína hipotética		
94	+	73	Proteína hipotética		
95	+	94	Proteína hipotética		
96	+	100	Proteína hipotética		
97	-	181	Familia de integrasas de fagos		
98	+	588	Subunidad mayor de la terminasa		
99	+	141	Proteína hipotética con dominio HTH TNP		
100	+	533	Proteína portal		
101	+	276	Proteína menor de la cápside*		
102	+	227	Proteína andamio*		
103	+	363	Proteína principal de la cápside*		
104	+	73	Proteína hipotética		
105	+	128	Proteína hipotética		
106	+	112	Proteína hipotética		
107	+	136	Posible componente de la cola		
108	+	124	Proteína hipotética		

109	+	180	Proteína hipotética		
110	+	126	Proteína hipotética		
111	+	71	Proteína hipotética		
112	+	934	TMP de la cola		
113	+	475	Proteína de la cola		
114	+	463	Endopeptidasa de la cola		
115	+	626	right-handed parallel beta-helix repeat-containing protein		
116	+	483	Proteína superior de la placa basal		
117	+	95	Proteína hipotética		
118	+	46	Proteína XkdX		
119	+	103	Proteína hipotética		
120	+	277	N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa		
121	+	79	Holina		
122	+	183	Proteína hipotética		
123	-	114	Proteína similar a la familia YOID		
124	-	76	Proteína hipotética		
125	-	71	Regulador transcripcional HTH		
126	+	263	Proteína de fago con dominio HTH		
127	-	353	Recombinasa/integrasa específica de sitio XerD		

*Función predicha por PHASTER.

+/- Indica dirección Sentido/Antisentido de la transcripción respectivamente.

4.3.4.1. Organización genómica de la región de 60.2 Kb

La subregión 1, de una extensión de 30.5 Kb aproximadamente, contuvo 48 ORFs, mayoritariamente relacionados con la regulación y el metabolismo del ADN. Entre ellos destacaron, una ADN polimerasa I (ORF 62, E-valor 10^-102), una helicasa (ORF 51, E-valor 10^-14), una DNA primasa (ORF 52, E-valor 10^-05), una resolvasa de estructuras de *Holliday* (ORF 66, E-valor 10^-21) y otros ORFs relacionados con el metabolismo del ADN (ORF 72-74, ORF 77, ORF 79) y la regulación transcripcional (ORF 43, 53, 54 y ORF 87) (**Figura 51**).

La subregión 2, de una extensión aproximada de 28.7 Kb, presentó 38 ORFs (ORF 90-127), algunos de ellos homólogos a genes que codifican proteínas víricas estructurales (**Figura 51**). La subregión 2 de la región de 60.2 Kb volvió a presentar, como la región de 28.7 Kb similar a PBSX, la organización típica de los fagos caudados, encontrándose un clúster de transcripción temprana que contuvo, al menos, un regulador transcripcional (ORF 90) y una región de transcripción tardía, donde se encontraron ORFs que codifican las proteínas víricas estructurales (ORF 98-121). Entre estas dos regiones existió una región con 7 ORFs, 6 de ellas sin función conocida, pero que por la localización podría constituir el clúster de expresión media (ORF 91-96). En esta región, el único ORF con homología a proteínas conocidas fue el ORF 97, el cual codifica una proteína putativa con un dominio conservado en la familia de proteínas relacionadas con la integración/recombinación del ADN (E-valor 10^-47).

Curiosamente se observó que en la subregión 2 existe otro ORF con homología a otra integrasa (ORF 127) (Figura 51).



Figura 51. Representación esquemática de la región de 60.2 Kb detectada en el cóntigo 59 de *B. pumilus* 15.1 (NZ_LBDK01000059.1). La región de 60.2 Kb se muestra dividida en la subregión I (rosada) y la subregión II (azulada) para facilitar el estudio. El ARNt para Ala se marcó mediante una flecha negra. Los ORFs fueron coloreados basándose en la función predicha mediante los estudios bioinformáticos (Tabla 16).

La región de transcripción tardía comenzó con la ORF 98, homóloga a la subunidad mayor de la terminasa (E-valor de 10^-14), seguida de un ORF que presentó un dominio conservado HTH (E-valor 10^-22), posiblemente relacionado con el elemento de inserción de una transposasa. Curiosamente no se observó la presencia de la unidad menor de la terminasa, que frecuentemente se encuentra junto con la subunidad mayor. El ORF 100 presentó un dominio conservado (E-valor 10^-13) en la familia de proteínas portales del fago SPP1, seguida del ORF 101, el cual presentó un dominio conservado en proteínas menores de la cápside en fagos caudados (E-valor 10^-16).

El ORF 102 no presentó dominios conservados en su secuencia, sin embargo, fue homologo a proteínas anotadas como proteasas de tipo CLP, una familia de serin-proteasas dependiente de ATP. Probablemente esta proteína putativa esté relacionada con la maduración de las proteínas de la cabeza del virus, hipótesis que se ve reforzada por su posición, entre las dos proteínas de la cabeza (ORF 101 y 103). Aunque *Blastp* identificó el ORF 103 como una proteína putativa con un dominio conservado de función desconocida (E-valor 10^-50), PHASTER la identificó como la subunidad principal de la cápside, por su similitud a la proteína de la cápside del siphovirus atemperado de *Mycobacterium* Bernal13 (Pope 2015).

Tras estos ORFs, que codificaron para las proteínas de la cabeza, se encontraron las proteínas de la cola. El primer ORF que presenta relación con esta parte estructural fue el ORF 107, que, aunque no presentó dominios conservados, si homología con la proteína HK97 de *B. subtilis*, la cual ha sido anotada como una posible proteína de la cola de fago. El ORF 112 contuvo un dominio conservado en proteínas TMP (E-valor 10^-37).

Por último, se encontraron ORFs homólogos a proteínas relacionadas con la lisis bacteriana y proteínas capaces de degradar el peptidoglicano, las cuales están relacionadas con la entrada o la salida del fago a través de la pared bacteriana. Entre las proteínas relacionadas con esta función se encontraron el ORF 113, que codifica una proteína de la cola. Esta proteína presentó dos dominios conservados diferentes, uno en la región 5', similar a la familia de lisozimas específicas del flagelo (E-valor 10^-37), capaces de llevar a cabo la degradación del peptidoglicano, y otro en la región 3', con un dominio conservado en proteínas de la cola de diferentes bacteriófagos (E-valor 10^-58). El ORF 114 también presentó un dominio conservado en proteínas de la cola de fagos (E-valor de 10^-37), con una posible función endopeptidasa (E-valor de 10^-9).

El ORF 115 presentó un dominio conservado que comparte ciertas similitudes con las pectato liasas, enzimas encargadas de la degradación de la pectina de las paredes vegetales, aunque el E-valor fue bajo (10^-06). Según PHASTER, este ORF codifica una proteína de las fibras de la cola, similar a la encontrada en el fago de *Bacillus* CampHawk (Ritz 2013).

El ORF 116 presentó dos dominios conservados, uno en el extremo 5', presente en proteínas de función desconocida, posiblemente relacionadas con fibras de la cola de fagos, aunque no

ha podido ser comprobada su función (E-valor 10^-24), y otro en la región 3', conservado en proteínas de la familia de las piocinas tipo R, que en *Pseudomonas aeruginosa* producen la muerte de otras cepas de la misma especie (E-valor de 10^-16).

El ORF 118 codificó una proteína putativa de pequeño tamaño, 46 aa, que contuvo un dominio conservado en la familia de proteínas Xkdx (E-valor 10^-12), proteínas frecuentes en fagos de bacterias Gram positivas que se encuentran generalmente asociadas a la región de proteínas con función lítica, holinas y endolisinas. El ORF 120 precisamente codificó una proteína con un dominio conservado de unión (región 3') y lisis del peptidoglicano (región 5'), mientras que el ORF 121 fue homologo a una proteína con un dominio conservado en la familia de holinas (E-valor 10^-24), encargadas de permeabilizar la membrana plasmática permitiendo la acción de la endolisinas.

Por último, la subregión II finalizó con ORFs homólogas a proteínas reguladoras. El ORF 123 codificó, en sentido reverso, una proteína con un dominio conservado YoID, de función desconocida pero aparentemente equivalente a la subunidad UmuD de la Polimerasa V de bacterias Gram negativas, relacionada con la unión al ADN, la regulación de la transcripción, así como la reparación y la respuesta al daño del ADN (sistema SOS). Los ORFs 125 y 126, también parecieron estar relacionados con la regulación transcripcional de genes, ya que ambos presentaron dominios conservados HTH, aunque con E-valores por debajo de 10^-10. Para finalizar, el último ORF encontrado en la región de 60.2 Kb fue el ORF 127, el cual presentó un dominio de la familia de las recombinasas específicas XerD, con un E-valor de 10^-46.

4.3.4.2. Evaluación de la presencia de la región de 60.2 Kb en las bases de datos/genomas secuenciados

Al igual que con la región de 28.7 Kb, similar a PBSX, se llevó a cabo una búsqueda de regiones homólogas a la región de 60.2 Kb en las bases de datos de genomas bacterianos secuenciados hasta el momento, mediante la herramienta bioinformática *Blastn*.

La búsqueda permitió observar cómo esta región se encontraba menos conservada que la región de 28.7 Kb estudiada con anterioridad. Solamente 8 cepas bacterianas (en junio del 2022), cuyos genomas habían sido secuenciados hasta el momento, presentaban una región homóloga en su genoma. Estas cepas, pertenecientes al grupo de *B. pumilus*, presentaron regiones del genoma con una cobertura entre 71-80 % y un porcentaje de identidad entre 87.10 y 92.64% y pueden encontrarse en la **Tabla 17** junto a su información básica.

Tabla 17. Cepas bacterianas y números de acceso de las principales coincidencias obtenidas tras la comparación de la región de 60.2 Kb de *B. pumilus* 15.1 con las existentes en la base de datos GenBank. El porcentaje de cobertura y la identidad de los alineamientos se encuentran indicados en la Tabla. En negrita

	Organismo	Cobertura	Identidad	Número de
	organismo	cobertara	lacintiada	acceso
1	Bacillus sp PAMC22265	0,78	91,55	<u>CP060290.1</u>
2	Bacillus sp PAMC28571	0,78	91,55	<u>CP060191.1</u>
3	B. altitudinis GLB197	0,69	89	<u>CP018574.1</u>
4	Bacillus phage	0.7	87,63	OM65/270 1
4	vB_BauS_KLEB21-1 *	0,7		010034379.1
5	B. altitudinis P-10	0,74	87,1	<u>CP024204.1</u>
6	B. aerophilus 232	0,67	87,44	<u>CP026008.1</u>
7	B. pumilus UAMX	0,69	84,93	<u>CP058951.1</u>
8	B. pumilus NCTC10337	0,76	84,56	LT906438.1
9	B. pumilus PDSLzg-1	0,68	82,17	<u>CP016784.1</u>

se indican las cepas utilizadas para llevar a cabo la Figuras 52 y 53. Con un asterisco se marca la secuencia utilizada para la realización de la Figura 54.

Un estudio comparativo de la organización genómica de algunas de estas cepas puede observarse en la **figura 52**.



Figura 52. Análisis comparativo de las regiones similares a la región de 60.2 Kb, con regiones homólogas en especies relacionadas con *B. pumilus*. La potencial función de cada ORF se determinó con *Blastp*. La homología se evaluó mediante *tBlastx* y se graficaron mediante el software *EasyFig*. La homología se mostró mediante un gradiente morado-rosa, en función del porcentaje de homología encontrado en cada región, con un mínimo de 50 pb. El color de cada ORF se asignó a partir de la potencial función asignada en la Tabla 16. Los ARNt se marcaron mediante asteriscos.

La región de 60.2 Kb de *B. pumilus* 15.1 fue homóloga a un fago recientemente anotado. El fago vB_BauS_KLEB27-1, aislado a partir de la cepa KR4M-2 de *Bacillus australimaris*, mostró un 87.63% de identidad y una cobertura del 61% con la región de 60.2 Kb, indicando que esta región podría ser un fago insertado en el cromosoma de *B. pumilus* 15.1.

La secuencia de todas estas regiones homólogas y la de la región de 60.2 Kb de *B. pumilus* 15.1 se compararon mediante un análisis de la identidad media de nucleótidos usando el algoritmo de JspeciesWS. El estudio de la sintenia de estas regiones se llevó a cabo mediante un análisis *Dotplot* (**Figura 53**).



Figura 53. Comparación global mediante *Dot-plot* de secuencias similares a la región de 60.2 Kb de *B. pumilus* 15.1 (marcadas en negrita en la Tabla 17). Las comparaciones fueron realizadas mediante el software Gepard 1.40 (Krumsiek et al. 2007) con una longitud de 10 nucleótidos.

Todas las secuencias utilizadas en el estudio comparativo presentaron una elevada sintenia, sin llegar a observarse ninguna región de alta variabilidad como la observada en la región de 28.7 Kb. La excepción la marcó el fago de *Bacillus* vB_BauS_KLEB21-1 (**Figura 54**), en el que existió: i) una región de aproximadamente 4 Kb no presente en la región de 60.2 Kb de *B. pumilus* 15.1 (marcada con una flecha negra), ii) pequeñas regiones con deleciones en la secuencia del fago vB_BauS_KLEB21-1, observadas como pequeños escalones en la gráfica (marcadas con flechas rojas) y iii) mutaciones, representadas por huecos entre las líneas diagonales (marcadas con flechas azules). El diagrama *Dot-plot* resultante, con dos líneas, coincidió con el típico diagrama que resulta cuando se comparan dos secuencias, que tienen sintenia, pero que presentan intercambiadas de orden, dos regiones del ADN.



Figura 54. Detalle de la comparación realizada mediante *Dot-plot* de la secuencia de 60.2 Kb de *B. pumilus* 15.1 y la secuencia del fago de *Bacillus* vB_BauS_KLEB21-1. La comparación fue realizada mediante el software Gepard 1.40 (Krumsiek et al., 2007), con una longitud de 10 nucleótidos. Se indicó mediante una flecha negra las regiones sin identidad, mediante flechas azules las mutaciones y mediante flechas rojas las regiones que sufrieron deleciones.

En otras palabras, en la secuencia del fago vB_BauS_KLEB21-1 se encuentra primero la región con homología a proteínas estructurales víricas (subregión 2 en *B. pumilus* 15.1) y después la región con ORFs con función reguladora del ADN (subregión 1 en *B. pumilus* 15.1).

4.3.4.3. Estudio la posición relativa de la región II de 60.2 Kb con respecto a la región I similar a PBSX en diferentes cepas bacterianas

Tal y como hemos descrito en este capítulo, la región I de 28.7 Kb y la región II de 60.2 Kb se encontraron una a continuación de la otra en el genoma de *B. pumilus* 15.1, ambas cerca de un ARNt para Alanina (ARNt-Ala).

Con objeto de determinar si estas dos regiones se encuentran asociadas de igual forma en todas las cepas de *Bacillus* recogidas en la **Tabla 17**, se realizó un análisis bioinformático para determinar la posición relativa de las mismas. Con los resultados obtenidos del estudio se construyó el mapa representado en la **Figura 55**, que muestra la posición relativa de ambas regiones en todas las cepas, comparándose con la cepa modelo *B. pumilus* SARF 032 (panel 1), que carece de región homóloga a la región II de 60.2 Kb.



Figura 55. Representación esquemática de la posición de varios ARNt en 9 cepas relacionadas con *B. pumilus* 15.1 y posición relativa de la región II de 60.2 Kb con respecto a la región I, homóloga a PBSX. El gen ARNt para Valina (ARNt-Val) se muestra en marrón, el gen ARNt para Arginina (ARNt-Arg) se muestra en azul, y el gen ARNt para Alanina (ARNt-Ala) se muestra en rosa. En todas las especies de *Bacillus* analizadas, representada por la cepa modelo *B. pumilus* SAFR 032 (panel 1), la partícula similar a PBSX se encuentra adyacente al gen ARNt-Ala. En *B. pumilus* 15.1 y NTCT10337 (panel 2), la región II de 60.2 Kb de *B. pumilus* se encontró también en el ARNt-Ala, adyacente a la región de 28.7 Kb, sin embargo, en *B. cellulasensis* GLB197, *B. pumilus* PDSLzg-1, *B. altitudinis* P-10 y *B. aerophilus* 232, la región II homóloga a la de 60.2 Kb se encontró en el gen ARNt-Arg, aproximadamente 300 Kb aguas arriba de la región de 28.7 Kb (panel 3). Por último, en las cepas *Bacillus sp* PAMC22265 y 28571 (panel 4) la región homóloga a la región II de 60.2 Kb se encontró en el ARNt-Val, a unas 2,100 Kb aguas arriba de donde se sitúa la región de 28.7 Kb.

En las cepas *B. pumilus* 15.1 y en *B. pumilus* NCTC1033, la región II de 60.2 Kb se encontró próxima y aguas abajo a la región de 28 Kb, en el ARNt-Ala (**Figura 55, panel 2**). En las cepas *B. cellulasensis* GLB197, *B. pumilus* PDSLzg-1, *B. altitudinis* P-10 and *B. aerophilus* 232, la región homóloga a la región II se encontró insertada en un ARNt-Arg, por lo que, la región de 28.7 Kb y la región de 60 Kb estuvieron distanciadas aproximadamente 300 Kb, que es la distancia que hay entre los dos genes de ARNt en el genoma de la cepa modelo, *B. pumilus* SAFR 032 (**Figura 55, panel 3**). En las cepas *Bacillus sp* PAMC22265 y 28571, la inserción de la región II se observó en el ARNt-Val, y distó de la región I de 28.7 Kb unos 2,100-2,200 pb.

Este análisis parece corroborar la independencia de la región de 28.7 Kb y la región de 60.2 Kb, que, aunque en el caso de *B. pumilus* 15.1 estaban cercanas (y por eso PHASTER la identificó como un único fago de 98.1 Kb), en otras cepas ambas regiones se encontraron muy distantes.

Cuando llevamos a cabo el estudio detallado del genoma de la cepa NCTC10037 se observó que en ella existía un segundo inserto en el mismo ARNt-Ala, lo que parece apoyar que las regiones de ARNt suelen ser puntos calientes para la inserción de fragmentos de ADN de otros orígenes.

4.3.4.4. Estudio de los extremos de las regiones homólogas a la región II de 60.2 Kb de B. pumilus 15.1

El análisis bioinformático en detalle de la región II de 60.2 Kb del genoma de *B. pumilus* 15.1 permitió determinar que dicha región se encontraba flanqueada por secuencias cortas repetidas o *short direct* repeats. Estas repeticiones directas recuerdan a aquellas formadas durante la integración de algunos virus, transposones o retrotransposones en el genoma de una bacteria. La inserción de estos elementos puede producir la aparición de repeticiones directas o invertidas (*Directs Repeats* o *Inverted Repeats*) formadas por secuencias idénticas de ADN, que generalmente flanquean una transposasa o una integrasa, las cuales participan en el salto o la integración del elemento en otra región del genoma mediante el reconocimiento de secuencias específicas denominadas attB en el ADN receptor (Groth et al. 2000; Groth and Calos 2004; Blundell-Hunter et al. 2018).

Una de las secuencias directas repetidas encontradas en *B. pumilus* 15.1 se localizó en el interior de un ARNt. Los ARNt han demostrado ser importantes puntos de integración tanto para bacteriófagos como para plásmidos e islas de patogenicidad, por lo que la caracterización de esta región nos pareció interesante (**Figura 56**).

Para caracterizar el lugar de inserción de la región II de 60.2 Kb y regiones homólogas, se compararon las regiones flanqueantes encontradas en todas las cepas bacterianas (señaladas en negrita en la **Tabla 17**).

En *B. pumilus* 15.1, *B. pumilus* NCTC1033 y *B. pumilus* UAMX, la región homóloga a la región II de 60.2 Kb estuvo flanqueada por una secuencia repetida directa de 45 pb, de secuencia <u>TATGGAGCATAGCGGGATCGAACCGCTGACCTCTACGCTGCCAGC</u>. En los tres casos una de estas repeticiones directas se encontró ocupando parcialmente un ORF codificante para el ARNt-Ala, aguas abajo a la región I de 28.7 Kb.

En el caso de las cepas *B. altitudinis* P10, *B. aerophilus* 232, *B. cellulasensis* GLB197 y *B. pumilus* PDSLzg-1, la región homóloga a la región II de 60.2 Kb se encontró flanqueada por repeticiones directas de 48 pb, de secuencia <u>GGTTTCCGGTACCACGTCTGCCGGGG</u> <u>GTTCGAATCCCTCCGAGCGCGT</u>. En estas cepas una de las repeticiones directas se encontró ocupando parcialmente un ORF codificante para el ARNt de Arginina (ARNt-Arg).

Por último, en el caso de las cepas *Bacillus sp* PAMC22265 y *Bacillus sp* PAMC28571, la región homóloga a la región II de 60.2 Kb se encontró flanqueada por repeticiones directas de 48 pb, de secuencia <u>CTACCTTGACAGGGTAGAGGTCGCTGGTTCGAGCCCAGTCGGAATCAT</u>. En estas cepas una de las repeticiones directas se encontró ocupando parcialmente un ORF codificante para el ARNt de Valina (ARNt-Val).

En la cepa de referencia *B. pumilus* SAFR 032, que carece de la región II de 60.2 Kb, los ARNt-Arg y ARNt-Val no mostraron inserciones, y tampoco se observó ninguna de las secuencias cortas directas identificadas en el resto de las cepas, lo que apoya la hipótesis de que estas repeticiones son provocadas por la inserción de las regiones homólogas a la región II de 60.2 Kb.



Figura 56. Representación esquemática de la región de inserción de la región II de 60.2 Kb en diferentes cepas bacterianas. En la parte superior (Panel A) se representa la región de inserción de la cepa *Bacillus sp* PAMC22265 (1), la cual se produjo en el ARNt para Valina (marrón). En la región central (Panel B) se representa la región de inserción en las cepas *B. cellulasensis* GLB197 (2) *y B. altitudinis* P-10 (3) la cual se produjo en el ARNt para Arginina (azul), por último, en la región inferior (Panel C) se representa la región de inserción en las cepas *B. pumilus* 15.1 (4) *y B. pumilus* NCTC10337 (5), el cual se produjo en el ARNt para Alanina (rosa). En la zona inferior se representa la organización de la región completa observada en la cepa de referencia SAFR032, la cual no presenta la inserción de 60.2 Kb y por tanto representa la situación original. Las secuencias flanqueantes directas encontradas a ambos lados de la inserción de 60.2 Kb se encuentran marcadas mediante un subrayado amarillo y su dirección se encuentra marcada mediante flechas. Las regiones aguas arriba y aguas debajo de cada una de los ARNt se marcan en función de la posición relativa de estos en el genoma de la cepa de referencia.

4.3.4.5. Comparación de las secuencias repetidas directas flanqueantes a las regiones homólogas a la región II de 60.2 Kb

La presencia de secuencias repetidas directas en ambos extremos de la región II de 60.2 Kb, junto con la diferencia en el porcentaje de GC de esta región con respecto al genoma de *B. pumilus* 15.1, nos hizo realizar la hipótesis de que la región II podría ser una inserción de un fragmento de ADN exógeno en el genoma de *B. pumilus* 15.1, producido mediante un proceso de recombinación. Con objeto de evaluar si este proceso hipotético de recombinación fue específico o aleatorio, se aprovechó la información obtenida en el resto de las regiones homólogas a la región II y llevó a cabo el estudio de las secuencias repetidas directas observadas en todas las cepas que presentaron esta región.

El estudio de las regiones flanqueantes a esta posible inserción permitió identificar tres secuencias directas repetidas diferentes en los 8 genomas evaluados, descritas en el apartado anterior. Un alineamiento de estas tres secuencias directas permitió observar la existencia de regiones conservadas dentro de las mismas (**Figura 57**), y pudo calcularse una secuencia consenso.





Las recombinasas generalmente reconocen una secuencia específica denominada sitio de unión o *attachment site* en el virus (*attP*) y en el huésped (*attB*) antes de producir la inserción de un ADN exógeno en una región específica del ADN (Gregory et al. 2003; Pham et al. 2007). Durante la integración, la recombinasa se une a *attP* y *attB* como dímeros, mediando la asociación de ambos sitios para formar un complejo tetramérico, y cataliza el intercambio de cadenas para generar la integración del elemento extracromosómico en el genoma, mediante la formación de nuevos sitios de reconocimiento *attL* y *attR* a ambos lados de la inserción (Rutherford et al. 2013).
Podríamos hipotetizar que, las regiones conservadas dentro de las repeticiones directas estudiadas, podrían actuar como sitio específico de reconocimiento de las recombinasas, para producir la inserción en el genoma de fragmentos de ADN de origen exógeno.

4.3.5. Estudio filogenético de las regiones I y II detectadas en la región de 98.1 Kb

En la bibliografía existen descritas diferentes aproximaciones para llevar a cabo los estudios de las relaciones filogenéticas entre fagos. En ocasiones estas relaciones se llevan a cabo mediante la comparación de todo el genoma (Pope et al. 2015) y en otras mediante el análisis de genes concretos de los fagos, como la proteína principal de la cápside (Zhan et al. 2016), la integrasa (Bobay et al. 2013) o la subunidad mayor de la terminasa (Merrill et al. 2014) entre otros.

Ambas aproximaciones fueron emprendidas en nuestro estudio para determinar las relaciones filogenéticas de las dos regiones encontradas en la región de 98.1 Kb del genoma de *B. pumilus* 15.1. La comparación completa del genoma no dio ningún resultado coherente, por lo que se emprendió el estudio filogenético con genes específicos, en concreto con la subunidad mayor de la terminasa. En la región de 98.1 Kb se encontraron dos terminasas, la presente en la región 28.7 kb similar a PBSX (ORF 8) y la presente en la región de 60.2 Kb (ORF 98). Es interesante mencionar que el estudio filogenético de las terminasas es además útil para determinar el sistema de empaquetado y el tipo de extremos de ADN que posee un fago. Existen estudios que han relacionado secuencias de determinadas terminasas con los sistemas de empaquetado de ADN que presentan los fagos que portan estas terminasas. Se ha visto que las terminasas que utilizan los mismos sistemas de empaquetado suelen formar clústeres cuando se analizan sus relaciones filogenéticas (Casjens et al. 2005; Merrill et al. 2014).

Para el análisis filogenético de las terminasas presentes en *B. pumilus* 15.1 se seleccionaron 99 secuencias de la subunidad mayor de la terminasa de diferentes fagos y fagos defectivos (Casjens et al. 2005; Merrill et al. 2014) y se realizó un árbol filogenético mediante su alineamiento y graficado tal y como se indica en el apartado 3.12.8 de Materiales y Métodos. Algunas de las teminasas seleccionadas procedían de fagos, con un sistema de empaquetado bien caracterizado (marcadas con un asterisco en la **Figura 58**).

Como se observa en la **Figura 58**, la mayor parte de las terminasas parecen agruparse en cuatro grandes clados, exceptuando las terminasas procedentes de los fagos B054 de *Listeria*, Emery de *Paenibacillus*, SPBeta de *Bacillus*, 0305phi8-36 de *Bacillus*, Nigel, de *Mycobacterium*, phBC6A52 de *Bacillus* y la terminasa codificada por la región de 60.2 Kb de *B. pumilus* 15.1, las cuales quedaron fuera de los clústeres de función conocida, por lo que su sistema de empaquetado no pudo ser inferido a partir de este estudio.

Además, se observó cómo los 7 sistemas de empaquetado se agruparon conjuntamente en 8 clados, ya que el sistema de empaquetado de *Headfull* forma dos *clusters* independientes, el que presenta el fago T4 (amarillo), y el que presenta el fago P22 (azul). Sorprendentemente, las terminasas de los fagos de *Streptococcus* O1205 y sfi11 no se agruparon en el *clúster* del sistema de P22 *HeadFull* aunque es el sistema de empaquetamiento que se ha descrito para ellos (Lucchini et al. 1999; Lavelle et al. 2018).

La terminasa de la región de 28.7 Kb (ORF 8) formó parte claramente del clúster de terminasas con sistema de empaquetado *HeadFull*, con el fago P22 como organismo modelo. Sin embargo, la terminasa de la región de 60.2 Kb (ORF 98) no formó parte de ningún clúster, por lo que no pudo realizarse ninguna hipótesis sobre el sistema de empaquetado de su ADN. Esta diferencia refuerza una vez más la hipótesis de que ambas regiones presentan un origen independiente.

Además, la terminasa de la región de 28.7 Kb agrupó junto con las terminasas del fago defectivo PBSX de *B. subtilis* y del fago defectivo PBP180 de *B. pumilus*, ambos conocidos por ser profagos con un sistema de empaquetado de ADN mediante un sistema *Headfull*.



Direct Terminal Repeats T7-like 5' Extended COS ends P2-like HeadFul T4-like

5' Extended COS ends Lambda-like

Figura 58. Árbol filogenético realizado con la metodología Neighbor-joining usando las secuencias de la subunidad mayor de la terminasa de diferentes fagos y fagos defectivos. Las secuencias aminoacídicas de 99 subunidades mayores de la terminasa fueron alineadas mediante ClustalW y se creó un árbol mediante neighbor-joining con el uso del software MEGA X con 1000 repeticiones. Las relaciones filogenéticas se infirieron mediante el modelo de Poisson. Los números cerca de las bifurcaciones representan los porcentajes de las 1000 repeticiones y todas las ramas con un porcentaje menor al 30% se agruparon. Los fagos cuyo sistema de empaquetado del ADN es conocido se marcaron con un asterisco (*) (Casjens et al. 2005; Merrill et al. 2014) y los clústeres de los mecanismos de empaquetado similares fueron remarcados con diferentes colores. Las terminasas que no fueron asignadas a ningún clúster con un sistema de empaquetado definido no se marcaron de ninguna forma. Las terminasas pertenecientes a fagos de *B. pumilus* se marcaron con una línea negra vertical. Las terminasas presentes en el genoma de *B. pumilus* 15.1 bajo estudio se marcaron con una caja roja. Los fagos fueron nombrados según la base de datos del EBI y la base de datos virushostdb.

4.4. Capítulo IV. Inducción de la producción de partículas relacionadas con fagos a partir de la cepa *B. pumilus* 15.1 y su caracterización

Antecedentes

El análisis bioinformático del genoma de *B. pumilus* 15.1 mostró que esta cepa contenía dos regiones independientes con un alto contenido de ORFs homólogos a proteínas relacionadas con fagos. Una región de 28.7 Kb, similar al fago defectivo PBSX de *B. subtilis,* muy frecuentemente encontrada en el genoma de cepas de *B. pumilus* y una región de 60.2 Kb, muy poco conocida y escasamente representada en el genoma de bacterias (solo 8 genomas) presentes en las bases de datos. Sin embargo, la presencia de regiones con homología a fagos en los genomas no implica que los fagos sean viables ni que la cepa sea capaz de producir partículas víricas.

Al comienzo de esta tesis doctoral, las únicas observaciones experimentales con la que contábamos de la posible existencia de fagos en la cepa *B. pumilus* 15.1 era que i) un cultivo bacteriano de esta cepa incubado a 50°C, tras un crecimiento normal, perdía drásticamente densidad óptica tras 12 h de incubación (**Figura 45**), y ii) cuando un cultivo de *B. pumilus* 15.1 se encontraba en condiciones de restricción de oxígeno, tras un crecimiento normal, se producía una lisis del cultivo (datos no publicados). La primera observación fue realizada tras una caracterización del crecimiento de la cepa *B. pumilus* 15.1 a distintas temperaturas (Alarcón 2012) y la segunda fue realizada de forma accidental. Estas dos observaciones nos plantearon la posibilidad de realizar una caracterización formal de la posible inducción del ciclo lítico de un fago en *B. pumilus* 15.1 mediante diferentes metodologías.

4.4.1. Inducción y aislamiento la partícula Bp15.1PLP

4.4.1.1. Obtención de lisados bacterianos a partir de cultivos en condiciones de restricción de oxígeno

Como primera aproximación, partimos de las condiciones en las que nuestro grupo de investigación había observado que los cultivos de *B. pumilus* 15.1 se lisaban. Cuando un preinóculo de *B. pumilus* 15.1 se establecía en condiciones de restricción de oxígeno, esto es, no respetando la relación 1:5 de medio de cultivo:volumen de aire, se observaba un crecimiento aparentemente normal hasta las 8-10 h de incubación, pero al día siguiente su turbidez era muy escasa (D.O._{600nm} <0.3).

Se determinó que la proporción de medio de cultivo:volumen de aire idóneo para observar el fenómeno de lisis era 1:1 (15 ml de cultivo en un frasco de 30 ml). Tras obtener un cultivo *over nigth* en estas condiciones, los lisados fueron centrifugados para

retirar los restos bacterianos y visualizados mediante MET para observar la posible presencia de partículas víricas en el sobrenadante del cultivo bacteriano.

En la **Figura 59**, aunque las muestras presentaban una gran cantidad de restos celulares y eran de mala calidad, se pudieron observar estructuras que se asemejaron a partículas de fagos.

Estas partículas, que se encontraron en muy baja concentración, recibieron el nombre de Bp15.1PLP. Bp15.1PLP presentó una estructura similar a la de un fago caudado, con una cabeza icosaédrica de pequeño tamaño (flecha sólida de color negro), y una cola larga (flecha hueca).



Figura 59. Imagen tomada mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) del sobrenadante de un cultivo de *B. pumilus* 15.1 incubado durante toda la noche en condiciones de restricción de oxígeno. En las micrografías se observaron estructuras similares a fagos, aunque a una concentración muy baja. La partícula similar a fagos presentó una cabeza icosaédrica de pequeño tamaño (flecha negra) y una cola larga (flecha vacía).

4.4.1.2. Escalado del cultivo en condiciones de restricción de oxígeno

Debido a la baja cantidad de partículas observadas en los sobrenadantes de los cultivos de *B. pumilus* 15.1 incubados en condiciones de restricción de oxígeno, llevamos a cabo un escalado de las condiciones en las que se realizaron las observaciones anteriores, con objeto de obtener una cantidad suficiente de partículas víricas que nos permitiera su caracterización por diferentes técnicas moleculares.

Para llevar a cabo el escalado del cultivo se utilizó una botella de Pyrex de 200 ml, en la que se colocaron 100 ml de medio LB, obteniendo una relación 1:1 medio de cultivo:volumen de aire, equivalente a las condiciones usadas en el cultivo de la bacteria en tubos Falcon. La densidad óptica del cultivo se determinó a lo largo del tiempo y se

comprobó que bajo estas condiciones efectivamente el cultivo se lisaba tras tener un crecimiento inicial normal.

Como puede observarse en la **Figura 60**, el cultivo de *B. pumilus* 15.1 aumentó su turbidez hasta las 12 h aproximadamente, momento en que comenzó a observarse un descenso en la D.O. 600 nm. El cultivo fue seguido durante 72 h.



Figura 60. Representación semilogarítmica de la evolución de la densidad óptica medida a 600 nm (D.O. 600 nm) de un cultivo de *B. pumilus* 15.1 en condiciones de restricción de oxígeno a lo largo del tiempo.

El lisado obtenido mediante esta metodología fue observado mediante MET. Para ello, se centrifugaron los lisados a 4.000x g para retirar los restos bacterianos y el sobrenadante se observó bajo Microscopio Electrónico de Transmisión. Los resultados que se obtuvieron fueron idénticos a los observados anteriormente (**Figura 59**) y la partícula Bp15.1PLP pudo observarse de nuevo (datos no mostrados).

Sin embargo, tanto el bajo rendimiento de la producción de partículas, como la gran cantidad de tiempo de incubación necesaria para la obtención completa de la lisis del cultivo hicieron necesaria la búsqueda de una metodología más eficiente para la producción de la partícula Bp15.1PLP.

4.4.1.3. Inducción de la lisis de un cultivo de B. pumilus 15.1 con Mitomicina C

Como se ha descrito con anterioridad, determinados agentes que causan daños en el ADN bacteriano, como puede ser la radiación ultravioleta, agentes químicos o fármacos como la Mitomicina C son capaces de inducir el ciclo lítico en determinados bacteriófagos lisogénicos. Esta activación parece estar mediada por el sistema de respuesta SOS, el cual se induce en bacterias tras producirse un daño en el ADN (Cohen et al. 2008).

Por estas razones, decidimos evaluar la capacidad de la Mitomicina C para inducir la producción de la partícula Bp15.1PLP, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.4.1 de Materiales y Métodos. Con objeto de monitorizar el proceso de inducción con esta sustancia, se llevó a cabo un seguimiento de la D.O. 600 nm a lo largo del tiempo. El resultado puede observarse en la **Figura 61**.

Tras la adición de la Mitomicina C al cultivo en fase exponencial se pudo observar un descenso brusco de la densidad óptica 2-3 h después de la adición, llegando a valores de D.O. 600 nm por debajo de 0.3 tras 6-7 h de incubación (**Figura 61**). Un cultivo al que no se le adicionó Mitomicina C, prosiguió con el aumento de la D.O. 600 nm.



Figura 61. Representación semilogarítmica de la evolución de la D.O. $_{600 nm}$ de cultivos de *B. pumilus* 15.1 frente al tiempo sin adición de Mitomicina C (círculos grises cerrados) o tras la adición de Mitomicina C a 0.5 µg/ml (círculos cerrados negros). El tiempo 0 corresponde al momento en el que la Mitomicina C fue añadida al cultivo.

El descenso de la D.O. _{600 nm} se obtuvo en un periodo de tiempo mucho menor al obtenido en el cultivo con restricción de oxígeno, reduciéndose en 48 h el tiempo de incubación necesario para obtener un lisado completo del cultivo (D.O. _{600 nm} < 0.1) y, por lo tanto, el tiempo de obtención de las partículas víricas. Esta metodología fue la utilizada a partir de este momento para obtener los lisados bacterianos.

4.4.1.4. Caracterización morfológica de las partículas Bp15.1PLP

Tras comprobar que la Mitomicina C provocaba un descenso de la D.O. _{600 nm} en cultivos de *B. pumilus* 15.1, decidimos observar los sobrenadantes de estos lisados bacterianos

para comprobar si mediante este procedimiento se producía un aumento en la cantidad de partículas Bp15.1PLP liberadas. Para ello, el sobrenadante de un lisado bacteriano obtenido mediante Mitomicina C se filtró a través de filtros de nitrocelulosa de un tamaño de poro de 0.22 µm y se procesó para tinción negativa tal y como describe el apartado 3.4.9 de Materiales y Métodos. El resultado, como puede observarse en la **Figura 62**, Panel A, donde se muestra un aumento significativo del número de partículas Bp15.1PLP.

La abundancia de partículas, su integridad y la calidad de las imágenes en esta ocasión permitieron llevar a cabo medidas de las estructuras observadas. Las medidas se realizaron a partir de al menos 3 partículas independientes, determinándose la media y una desviación estándar. Las partículas observadas presentaron una cabeza icosaédrica o cápside con un tamaño medio de 39.53 ± 2.85 nm de ancho y una cola de 227.34 ± 3.99 nm de largo y 22.66 ± 1.81 nm de ancho (**Figura 62**). La cola pareció ser una estructura contráctil, ya que se observaron partículas con dos conformaciones diferentes, una forma contraída (**Figura 62, Panel B**, flecha blanca) y otra relajada o extendida (**Figura 62, Panel B**, flecha negra).



Figura 62. Panel A. Campo general observado mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) del sobrenadante de un cultivo de *B. pumilus* 15.1 inducido con Mitomicina C. Las flechas negras indican las estructuras intactas y la flecha blanca una estructura que careció de cabeza. Panel B. Detalle de dos partículas Bp15.1PLP, similares a fagos caudados, mostrando las dos posibles conformaciones observadas, una conformación relajada o extendida (flecha negra) y una conformación contraída (cabeza de flecha blanca).

Las colas parecieron estar compuestas por una estructura tubular interna más estrecha (11.53 \pm 1.01 nm de ancho) y una cubierta exterior más ancha (24.19 \pm 2.76 nm de ancho), estructuras que se observan únicamente cuando la partícula Bp15.1PLP se encontraba en su conformación contraída (**Figura 62, Panel B**). Además, el aspecto superficial de la cola presentó diferencias dependiendo de si estaba en una conformación u otra (**Figura 63**). Así, en la conformación relajada se observaron

estriaciones transversales en las colas, mientras que fueron axiales cuando la cola se encontraba contraída.



Figura 63. Detalle de la estructura de la partícula Bp15.1PLP en la que puede observarse la diferente distribución de las estriaciones de la cola en función de si la partícula se encuentra en su conformación relajada o extendida (panel A) o contraída (panel B).

La definición de la imagen permitió observar como la cola de la partícula Bp15.1PLP posee 50-52 estriaciones transversales en su conformación relajada, las cuales desaparecen cuando la cola se contrae, formando estriaciones longitudinales.

La contracción de Bp15.1PLP parece provocar una reducción del tamaño de la envuelta, quedando el tubo de la cola expuesto en su región distal y aumentando el tamaño del cuello (**Figura 63 y 64**).



Figura 64. Representación esquemática de las partículas observadas mediante TEM en lisados de cultivos de *B. pumilus* 15.1 incubados con Mitomicina C. Se representan las dos conformaciones observadas, la conformación extendida (izquierda) y la contraída (derecha) junto a la media y desviación estándar (en nm) de cada una de las partes observadas. Las medidas fueron realizadas con al menos 3 partículas independientes de cada tipo.

El hecho de que la partícula Bp15.1PLP posea una cola contráctil podría significar que se encuentra relacionada con fagos de la familia *Myoviridae*, que incluye a todos los virus bacterianos que presentan una cola de este tipo.

Un hecho que sorprendió de la partícula Bp15.1PLP fue que el tamaño de la cabeza fue inferior a la que presentan generalmente los fagos de esta familia, las cuales suelen presentar un tamaño entre 50 y 145 nm. Este hecho es también observado en la partícula PBSX, producida por *B. subtilis* 168 (Okamoto et al. 1968). Debido a la similitud observada entre estas partículas y las observadas con el fago defectivo PBSX, podríamos realizar la hipótesis de que las partículas Bp15.1PLP podrían estar codificadas por la región de 28.7 Kb encontrada en el genoma de *B. pumilus* 15.1 y caracterizada en el capítulo anterior.

4.4.2. Concentración y purificación de las partículas Bp15.1PLP obtenidas a partir de *B. pumilus* 15.1

Una vez comprobado que la producción de partículas Bp15.1PLP mejoró con la utilización de la Mitomicina C, se realizó un esfuerzo para aplicar y comparar algunas técnicas comunes usadas en la concentración y purificación de fagos, con objeto de determinar si eran útiles para la partícula Bp15.1PLP. La descripción de estas técnicas y los resultados obtenidos con ellas se detallan en los siguientes apartados.

4.4.2.1. Concentración mediante centrifugación y ultracentrifugación

En primer lugar, se llevó a cabo la precipitación de las partículas Bp15.1PLP directamente por centrifugación, tal y como se especifica en el apartado 3.4.3 de Materiales y Métodos. Para ello, se estudiaron diferentes velocidades y tiempos de centrifugación sobre lisados bacterianos, previamente filtrados a través de membranas de nitrocelulosa, con un tamaño de poro de 0.22 μ m. La precipitación de las partículas víricas se realizó a 100.000x g durante 90 min, y a 10.000x g durante 16 h. Los *pellets* obtenidos fueron resuspendidos en un volumen de tampón SM tal que la suspensión de partículas estuvo 250x concentrada con respecto al volumen del lisado antes de ser observados al Microscopio Electrónico.

4.4.2.2. Concentración mediante precipitación con polietilenglicol (PEG)

La concentración de las partículas Bp15.1PLP también se llevó a cabo mediante una precipitación con PEG, una metodología utilizada con anterioridad en nuestro grupo para la concentración del fago lambda (Dominguez-Flores et al 2017). Esta metodología está basada en que el PEG reduce la cantidad de solvente disponible, por lo que la concentración efectiva de las partículas de gran tamaño aumenta por encima de la solubilidad, produciéndose la precipitación de estas (Fahie-Wilson and Halsall 2008). Tras su precipitación con PEG, tal y como se detalla en el apartado 3.4.2 de Materiales y Métodos, las partículas se recogieron mediante centrifugación a 12.000x g durante 30 min. El pellet se resuspendió en un volumen de tampón SM tal que las partículas estuvieran 250x concentradas con respecto al volumen inicial del lisado.

4.4.2.3. Concentración mediante gradiente de sacarosa

Cuando fue necesario llevar a cabo una concentración adicional y purificación de las partículas Bp15.1PLP, el precipitado obtenido mediante PEG se dispuso sobre un gradiente preformado de sacarosa, tal y como se especifica en el apartado 3.4.4 de Materiales y Métodos. Esta metodología permitió no solo una purificación extra de las partículas al separarlas de otros contaminantes de distinta densidad, sino que permitió realizar una concentración adicional de las mismas.

4.4.2.4. Comparación de los métodos de concentración utilizados

Para comprobar la capacidad de concentración y la integridad de las partículas Bp15.1PLP tras aplicar cada uno de los procedimientos utilizados, se llevó a cabo una visualización mediante Microscopía Electrónica de Transmisión de partículas obtenidas. Como puede observarse en la **Figura 65**, en todas las metodologías utilizadas se producía una concentración de las partículas. Se observó también, que, pese a que el lisado bacteriano fue filtrado antes de llevar a cabo la concentración mediante centrifugación,

tanto a 10.000x g (**Figura 65 B**) como a 100.000x g (**Figura 65 C**), existía una gran cantidad de restos bacterianos, especialmente flagelos, que precipitaron junto a las partículas Bp15.1PLP. Esta contaminación por flagelos no se observó en las muestras obtenidas mediante la precipitación con PEG y posterior purificación en gradiente de sacarosa (**Figura 65 D**).



Figura 65. Micrografías obtenidas por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) del sobrenadante de un cultivo de *B. pumilus* 15.1 inducido mediante Mitomicina C sin concentrar (A), concentrado mediante centrifugación a 10.000x g durante 16 h (B), concentrado mediante ultracentrifugación a 100.000x g (C) y concentrado mediante PEG y purificado mediante gradiente de sacarosa (D). Se observaron de nuevo la conformación extendida (flechas negras) y la conformación contraída (cabezas de flecha negras) de la partícula Bp15.1PLP. Además, pudieron observarse colas que carecían de cabeza (flechas blancas).

En cuanto a la integridad de las partículas Bp15.1PLP, un análisis detallado de las micrografías mostró una presencia mayor de colas sin cabeza cuando se llevó a cabo la centrifugación a 100.000x g (Panel C), con respecto a la muestra preparada con la centrifugación a 10.000x g durante 16 h (Panel B) o cuando las muestras no se

concentraron (Panel A). Esto podría significar que la centrifugación a alta velocidad puede tener un efecto adverso en la obtención de la partícula Bp15.1PLP intacta. La alta pureza obtenida en las muestras precipitadas con PEG y purificadas en un gradiente de sacarosa permitieron incluso identificar una serie de fibras en la región distal de la cola de la partícula Bp15.1PLP (**Figura 66**).



Figura 66. Microscopía electrónica de transmisión (MET) de las partículas Bp15.1PLP parcialmente purificadas mediante gradiente de sacarosa. Se observaron las conformaciones extendidas (flechas blancas) y contraída (flecha negra). En la forma contraída pudieron diferenciarse el tubo de la cola (cabeza de flecha negra), la envuelta de la cola (cabeza de flecha blanca) y las fibras de la cola (flechas vacías). Algunas partículas aparecieron también sin cabeza (cabezas de flechas vacías).

La puesta a punto de metodologías para la obtención en gran cantidad de las partículas Bp15.1PLP, y con un alto grado de pureza, permitió emprender otros trabajos para la caracterización de dichas partículas.

4.4.3. Contenido de ADN en la cápside de Bp15.1PLP

El siguiente paso en la caracterización de la partícula Bp15.1PLP fue el estudio del ADN contenido en las cápsides de la partícula. La evaluación del contenido de ADN se realizó con partículas obtenidas mediante la metodología de precipitación con PEG y posterior purificación por gradiente de sacarosa, a partir de un cultivo inducido con Mitomicina C. En la obtención de las partículas se hizo un especial hincapié en la digestión del ADN procedente de la bacteria, liberado en el proceso de lisis, para evitar ser confundido con el existente en el interior de la cabeza de la partícula Bp15.1PLP. Para ello, se utilizaron 10 veces más DNAsa y RNAsa que la que indicaba el protocolo estándar de precipitación mediante PEG, además de llevarse a cabo una digestión adicional antes de realizar el

gradiente de sacarosa para su purificación final. El ADN presente en las cápsides de las partículas Bp15.1PLP fue aislado a través de *kits* comerciales y visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. El resultado de este análisis fue la observación de una banda única de aproximadamente 9 Kb de tamaño (**Figura 67**).

El tamaño del ADN observado fue muy inferior al tamaño teórico de cualquiera de las dos regiones encontradas en el genoma que codificaban proteínas homólogas a fagos (28.7 Kb y 60.2 Kb).



Figura 67. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del ADN contenido en el interior de la partícula Bp15.1PLP, obtenida mediante inducción de un cultivo de *B. pumilus* 15.1 con Mitomicina C y concentrada mediante PEG y gradiente de sacarosa. La extracción del ADN se llevó a cabo mediante el *kit* de extracción de sangre y tejidos de Qiagen, tal y como se detalla en el apartado 3.5.4 de materiales y métodos. Como marcador de peso molecular (M) se utilizó *HyperLadder*[™] 1 kb.

Dado que nuestra hipótesis era que la región de 28.7 Kb es la responsable de la producción de la partícula Bp15.1PLP, se decidió realizar un mapa de restricción del contenido de ADN y compararlo con el mapa de restricción realizado *in silico* de la región de 28.7 Kb. Para ello, el ADN extraído de la partícula Bp15.1PLP fue digerido con diferentes enzimas de restricción (*Bam*H I, *HinD* III, *Sal* I, *Eco*R I y *Bgl* II). El producto de las digestiones fue visualizado en geles de agarosa al 0.8% (**Figura 68, Panel A**) y el patrón de bandas fue comparado con el hipotético patrón de bandas realizado *in silico* (**Figura 68, Panel B**).

Se observó que la digestión del ADN contenido en Bp15.1PLP produjo en la mayoría de los casos multitud de bandas, de tamaño no definido, y sobre todo muy diferentes al patrón que se esperaba (**Figura 68. Panel B**). La gran cantidad de bandas obtenidas no pareció corresponderse con lo esperado en la digestión de un fragmento de 9 Kb de ADN con una secuencia específica. Por el contrario, se obtuvo un *smear* similar al que se obtiene cuando el ADN que se digiere es heterogéneo, como por ejemplo ADN genómico, formado por multitud de bandas muy tenues. Estos datos indicaron que el contenido de ADN en la partícula Bp15.1PLP no es homogéneo y no corresponde al ADN que codifica la partícula.



Figura 68. Panel A. Electroforesis en gel de agarosa del ADN contenido en el interior de las partículas Bp15.1PLP antes y después de su digestión con enzimas de restricción. El ADN fue extraído de las partículas parcialmente purificadas tras una inducción con Mitomicina C y tratamiento con ADNasa. El ADN fue digerido con, *HinD* III (H), *Bam*H I (B), *Sal* I (S), *Eco*R I (E) y comparado con respecto al control sin digerir (C). Como marcador de peso molecular se utilizó *HyperLadder*[™] 1 kb. Panel B. Mapa de restricción *in silico* predicho de la región de 28.7 Kb encontrada en el genoma de *B. pumilus* 15.1 con idénticas enzimas de restricción.

4.4.3.1. Identificación del ADN empaquetado en la partícula Bp15.1PLP mediante clonaje y secuenciación

Debido a estos resultados inesperados y para intentar identificar la naturaleza del ADN del interior de la partícula Bp15.1PLP, se llevó a cabo la clonación de los fragmentos obtenidos en las digestiones realizadas con *HinD* III y *Eco*R I en el vector pUC19, digerido previamente con las mismas enzimas de restricción. Los productos de ligación se usaron para transformar *E. coli* DH5 α tal y como se detalla en el apartado 3.5.12 de Materiales y Métodos. Seis clones seleccionados al azar fueron utilizados para extraer el ADN plasmídico y proceder a la secuenciación de sus insertos, haciendo uso de los cebadores M13F y M13R, diseñados en el vector pUC19 pertenecía a regiones distantes del genoma de *B. pumilus* 15.1 (**Tabla 18**), sin ninguna relación con la región de 28.7 Kb identificada en el genoma de esta bacteria. Ningún fragmento secuenciado fue homólogo a ORFs que codifican proteínas de bacteriófagos.

Tabla 18. Tamaño del inserto, ORFs encontrados y localización en el genoma de *B. pumilus* 15.1 de los fragmentos de ADN clonados en pUC19 a partir de la digestión del ADN total obtenido de las partículas Bp15.1PLP. Tras la secuenciación del ADN en los diferentes clones, los resultados fueron analizados mediante el software FinchTV 1.4. La identificación de los cóntigos donde se localizan las regiones de ADN clonadas se realizó mediante la comparación con el genoma parcialmente anotado de la bacteria *B. pumilus* 15.1 mediante Blastn.

Clon	Tamaño (bn)	Nº de	Nº de ORFs encontrados en los fragmentos
		Cóntigo	clonados y predicción de su función
			1- Función desconocida
	3,924		2- Proteína hipotética
E2		61	3- Proteína hipotética
	- , -	-	4- Proteína hipotética
			5- Transaminasa-6-fosfato
			1- UDP Glucosiltransferasa
			2- Arilamina N acetiltransferasa
E18	3,516	8	3- Transportador MFS
			4- Proteína hipotética
			1- Proteína hipotética
			2- Regulador transcripcional
		61	3- Permeasa transportador ABC
	4,574		4- Proteína de unión a ATP de
			transportador ABC
H5			5- Regulador transcripcional GntR
			6- Función desconocida Dominio
			DUF418
			7- Proteína hipotética
			8- Proteína con dominio HEAT
			1- Endonucleasa MutS2
H6	2,524	10	2- DNA polimerasa
			3- DNA polimerasa truncada
			1- Proteína de germinación de la
			espora
			2- Proteína de germinación de la
H9	2,906	2	espora
			3- Proteína de germinación de la
			espora de la familia Ger(x)C
			1- Proteína hipotética
H18	5,290	21 y 37	2- Sensor histidina quinasa de la pared
			celular

Regulador de respuesta a unión del
ADN
ARNt Alanina

Este resultado indicó que la partícula Bp15.1PLP no empaqueta en su cápside el genoma responsable de su producción, sino por el contrario empaqueta el ADN genómico procedente de la bacteria que lo produce. El contenido de las cápsides de la partícula Bp15.1PLP pertenece a diferentes regiones del genoma de *B. pumilus* 15.1 y contiene ORFs codificantes de proteínas con una amplia variedad de funciones fisiológicas. (**Tabla 18**). Este hecho tiene una clara consecuencia, que la partícula Bp15.1PLP es incapaz de transmitir a otra célula huésped la información necesaria para su propagación.

Dado lo sorprendente del hallazgo y para comprobar que el resultado no se debiera a la contaminación de ADN del huésped co-purificado junto a las partículas del fago, el experimento se repitió en tres ocasiones, utilizando concentraciones crecientes de ADNasa, 1, 10 y 20 μ g/ml, tanto después de la lisis bacteriana, como antes de llevar a cabo la extracción del ADN viral. Los resultados obtenidos fueron repetitivos y se obtuvieron secuencias aparentemente al azar del genoma bacteriano. Por tanto, se tuvo que concluir que la observación realizada, aunque sorprendente, era cierta.

4.4.3.2. Estudio del contenido genético en la cápside de la partícula Bp15.1PLP mediante PCR.

Para comprobar mediante otra metodología que el contenido de ADN de la partícula Bp15.1PLP procedía del empaquetamiento al azar del genoma bacteriano, se realizó un análisis mediante PCR de la presencia de determinados genes en el ADN obtenido a partir de un *pool* de partículas Bp15.1PLP. Para realizar este análisis se diseñaron cebadores en la región de 28.7 Kb, en la región de 60.2 Kb y en las regiones flanqueantes a estas regiones. Además, se utilizaron cebadores específicos para diferentes genes de *B. pumilus* 15.1 que habían sido diseñados con anterioridad en nuestro grupo de investigación (*smc, oxdD, 16SRNA...*). La secuencia de los cebadores específicos utilizados en este análisis, así como la información básica de cada pareja de cebadores puede consultarse en la **Tabla 5** de Materiales y Métodos.

Para este análisis, se obtuvieron las partículas Bp15.1PLP por precipitación con PEG, previa adición de ADNasa, desde un cultivo lisado. La partícula BP15.1PLP se sometió nuevamente a un tratamiento con ADNasa y ARNasa, a una concentración de 10 µg/ml a 37°C durante 1 h. Posteriormente, el precipitado se dispuso sobre un gradiente preformado de sacarosa con objeto de eliminar cualquier resto de ADN bacteriano exógeno que pudiera estar contaminando la partícula Bp15.1PLP.

El ADN obtenido en la partícula Bp15.1PLP se usó como ADN molde para llevar a cabo PCRs usando las parejas de cebadores OUT5', Reg 1, Reg 2, Reg 3, OUT3', Smc, Orf 7, 16S RNA y OxdD diseñados en diferentes cóntigos del genoma de *B. pumilus* 15.1 (**Tabla 19**). Como controles, se realizaron PCRs con los mismos cebadores usando como molde ADN total de *B. pumilus* 15.1 (control positivo, (15.1), y agua miliQ estéril (control negativo, (-)).

Tabla 19. Cebadores utilizados durante el estudio del contenido de ADN en el interior de las partículas de *B. pumilus* 15.1. El nombre de cada cebador se indicó junto a su localización en el genoma bacteriano y a la función del gen amplificado.

			Función de la
Cebadores	Nº de Cóntigo	Región	región de ADN
			amplificada
OUT 5'	59	ADN bacteriano	-
Reg 1	50	Región 28 7 Kh	Espícula de la cola
Keg I	55	Region 28.7 Kb	de Bp15.1PLP
Pog 2	50	Insorto 60.2 Kb	ADN polimerasa del
neg z	55		inserto de 60.2 Kb
			Regulador
Reg 3	59	Inserto 60.2 Kb	transcripcional del
			inserto de 60.2 Kb
OUT 3'	59	ADN bacteriano	-
Smc	6	ADN bacteriano	Proteína Smc
			Proteína hipotética
Orf 7	38 (pBp 15.1s)	ADN plasmídico	del plásmido de <i>B.</i>
			pumilus 15.1
165 ARN	51	ADN bacteriano	Subunidad 16S del
105 ANN	51	ADN Dacteriano	ARN ribosomico
			Oxalato
OxdD	4	ADN bacteriano	decarboxilasa de <i>B</i> .
			pumilus 15.1

El resultado de las PCRs realizadas con todas estas parejas de cebadores fue analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% (**Figura 69**). Como puede observarse, se produjo amplificación de fragmentos de ADN con todos los cebadores utilizados cuando se usó ADN de la partícula Bp15.1PLP como molde, al igual que el control positivo. Estos resultados apoyaron la hipótesis de que el ADN de 9 Kb, obtenido a partir de la partícula Bp15.1PLP, procede del genoma bacteriano. El hecho de que todas las parejas de cebadores usados amplificaron (diseñados en 5 cóntigos distintos), pareció

indicar que el genoma de *B. pumilus* 15.1 se encuentra muy representado en la cápside de la partícula Bp15.1PLP. Una revisión bibliográfica de este fenómeno halló que el fago defectivo PBSX de *B. subtilis* presenta el mismo comportamiento, pero en esta ocasión, el ADN bacteriano que empaqueta tiene un tamaño de 13 Kb en vez de 9 Kb.



Figura 69. Resultado de la amplificación mediante PCR de diferentes regiones del genoma de *B. pumilus* 15.1. Los cebadores Reg 1, Reg 2 y Reg 3 se diseñaron en el interior de la región de 98 Kb identificada por PHASTER (uno en la región de 28.7 Kb, Reg 1 y dos en la región de 60.2 Kb Reg 2 y Reg 3). Los cebadores Reg OUT 5' y Reg OUT 3' se diseñaron en las regiones flanqueantes a la región de 98 Kb (Reg OUT 5', Reg OUT 3'). Los cebadores smc, orf 7, 16s y Oxd identificaron los genes *smc, orf 7, 16S rRNA* y *oxdD* respectivamente. Los ADN molde usados en la PCRs fueron una extracción de ADN total de *B. pumilus* 15.1 (15.1), y una extracción de ADN a partir de partículas Bp15.1PLP (PLP). Con todas las parejas de cebadores se usó un control negativo, sin ADN molde (-). Se observó amplificación tanto en las reacciones realizadas con el ADN total de *B. pumilus* 15.1 como en las reacciones con el ADN extraído de Bp15.1PLP. Como marcador de peso molecular (M) se utilizó el marcador 50-1,000 pb DNA Ladder (*Canvax*).

4.4.4. Caracterización proteica de la partícula Bp15.1PLP

Para llevar a cabo la caracterización de las principales proteínas presentes en la partícula Bp15.1PLP, un concentrado de partículas obtenido mediante precipitación con PEG y purificación en gradiente de sacarosa se analizó en una electroforesis en gel de acrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes, tal y como se describe en el apartado 3.7.2 de Materiales y Métodos. El resultado de este análisis se muestra en la **Figura 70**. Al menos 15 proteínas, con un tamaño comprendido entre 110 a 17 KDa se pudieron observar con claridad tras la tinción del gel en una solución de azul de Coomassie.



Figura 70. Electroforesis SDS-PAGE de partículas Bp15.1PLP obtenidas mediante inducción con Mitomicina C de un cultivo de *B. pumilus* 15.1, concentradas mediante precipitación con PEG y parcialmente purificadas mediante gradiente preformado de sacarosa. Como marcador de peso molecular se utilizó *Precision Plus Protein™ All Blue* (BioRad) (M). Las proteínas mayoritarias, señaladas con flechas (1-4), fueron escindidas del gel y utilizadas para llevar a cabo su identificación mediante MALDI-TOF.

Las bandas de mayor intensidad fueron escindidas y enviadas al Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Madrid) para ser identificadas mediante huella peptídica, usando la tecnología MALDI-TOF. El resultado del análisis puede observarse en la **Tabla 20**. Todas las proteínas identificadas fueron homólogas a proteínas estructurales de bacteriófagos (proteínas de la envuelta de la cola, proteínas de la cápside y proteínas portal). La búsqueda del ADN codificante de estas proteínas en el genoma de *B. pumilus* 15.1 mostró que todas ellas estaban codificadas por ORFs presentes en la región de 98 Kb identificada por PHASTER.

Las bandas 1, 3 y 4 estuvieron codificadas por ORFs presentes en la región de 28.7 Kb, mientras que la banda 2 fue codificada por una ORF presente en la región de 60.2 Kb.

Específicamente, la proteína de la banda 1 fue codificada por el ORF 17, y su función propuesta fue la de una proteína de la cubierta de la cola. La proteína de la banda 3 fue codificada por el ORF 11, y se relacionó con la proteína principal de la cápside. Por último, la proteína de la banda 4 fue codificada por el ORF 18, y su función asignada, mediante el análisis de su secuencia, fue la de proteína de la cola.

						Predicción	de la función
						pro	teica
Nº do	Masa	Identificación	Región y		N⁰		
Randa	(KDa)	MASCOT	ORF de	Punt.	coincid	Por Phaster	Por Blastp
Banaa	(NBa)	MASCOT	codificación		encias		
		Proteína				Proteína	Proteína
		nortal	Región de			similar a	similar a
1	49.06	[Pacillus	28.7 Kb	86	9	xkdK de la	XkdK de la
			ORF 17			envuelta	envuelta de
		punnusj				de la cola	la cola
		Proteína	Región de			Proteína	Drotoína
2	2 40.12	hipotética	60.2 Kb ORF	91	9	9 principal	hipotótica
		[Bacillus sp]	103			cápside	mpotetica
		Proteína					
		principal de	Región de			Proteína	Proteína
3	34.14	la cápside	28.7 Kb	95	10	de la	principal
		[Bacillus	ORF 11			cápside	cápside
		pumilus]					
		Proteína	Región de			Drotoína	Drataína da
4	16.45	portal	28.7 Kb	115	12	Proteina	
		[Bacillus sp]	ORF 18			μοιται	

Tabla 20. Tamaño, identificación y localización en el genoma de las proteínas identificadas por MALDI-TOF.

La proteína de la banda 2, proteína con una menor abundancia de las seleccionadas para la identificación mediante MALDI-TOF, no estuvo codificada en la región de 28.7 Kb, sino por un ORF presente en la región de 60.2 Kb. Concretamente, el ORF 103, el cual fue identificado como una posible proteína principal de la cápside y que se encuentra a 41 Kb de la región de 28.7 Kb donde se codifican el resto de las proteínas identificadas.

Este resultado fue algo sorprendente ya que en principio se espera que los genes implicados en la producción de cualquier estructura molecular en la célula se encuentren cercanos en el genoma y regulados de forma conjunta. Aunque bien es cierto que el genoma de los fagos presenta una alta plasticidad y hay antecedentes de que algunas estructuras similares a fagos, como son los GTAs, tienen una codificación de sus proteínas en diferentes lugares del genoma, esta posibilidad era muy poco probable.

En primer lugar, no tenía mucho sentido pensar que la producción de la partícula Bp15.1PLP, codificada en la región de 28.7 Kb, dependiera de la expresión de una ORF muy poco representada en el genoma de bacterias del género *Bacillus*, ya que hay que recordar que la región de 60.2 Kb se encontró en muy pocas cepas, mientras que la de 28.7 Kb estuvo presente en todos los *B. pumilus* evaluados. En segundo lugar, el hecho de que la partícula Bp15.1PLP presentara dos proteínas de la cápside principales, una codificada por la ORF 11 y otra por la ORF 103, no tenía tampoco mucho sentido. Una hipótesis más plausible para interpretar los resultados de proteómica fue asumir que en la preparación de las partículas purificadas mediante gradiente de sacarosa existía una segunda partícula vírica, copurificada con Bp15.1PLP, pero mucho menos abundante. Esta segunda partícula estaría codificada por todas las ORFs relacionadas con fagos, encontradas en la región de 60.2 Kb. Para probar nuestra hipótesis, se realizaron una serie de ensayos.

4.4.4.1. Comparación de los métodos de concentración mediante geles de acrilamida

El primer paso para evaluar la nueva hipótesis fue realizar un estudio comparativo de las diferentes metodologías que habían sido utilizadas para la concentración y purificación de partículas Bp15.1PLP hasta el momento, con objeto de determinar si alguna de ellas permitía la separación de la hipotética segunda partícula vírica. Esto se realizó analizando el perfil proteico de distintas preparaciones en un gel de poliacrilamida, una preparada con la precipitación con PEG, otra obtenida mediante centrifugación a baja velocidad (10.000 g), otra obtenida a alta velocidad (100.000 g).

Como muestra la **Figura 71**, las preparaciones tienen un patrón proteico similar, aunque se observaron pequeñas diferencias en la cantidad relativa de las proteínas en función de la metodología utilizada. En todos los casos la proteína más abundante fue la proteína de 50 KDa, identificada mediante huella peptídica como una proteína de la envuelta de la cola. Sin embargo, cuando la concentración de las partículas se llevó a cabo mediante centrifugación, independientemente de la velocidad usada, se observó una mayor cantidad relativa de una proteína de 37 KDa (proteína marcada con la flecha B), en comparación con las muestras concentradas mediante PEG y gradiente de sacarosa.



Figura 71. Electroforesis SDS-PAGE de las partículas obtenidas mediante Mitomicina C de un cultivo de *B. pumilus* 15.1 concentradas mediante diferentes procedimientos. Se observa el perfil proteico de partículas concentradas mediante precipitación con polietilenglicol (PEG), mediante centrifugación a 10.000x g durante 16 h (10K), mediante centrifugación a 100.000x g durante 90 min (100K) y mediante gradiente de sacarosa tras precipitación con PEG (Sacarosa). Se indica la proteína de 40 kDa codificada por la región de 60.2 Kb (flecha A) y una proteína de 37 kDa que desaparece cuando la suspensión de partículas se purifica en un gradiente de sacarosa (flecha B). Como marcador de peso molecular (M) se utilizó *Precision Plus Protein™ All Blue* (BioRad).

En todas las preparaciones, sin embargo, se observa la presencia de la proteína 40 KDa (flecha A) identificada como la proteína de la cápside codificada fuera de la región de 28.7 Kb. Estos resultados indican que la hipotética segunda partícula vírica se co-purifica con todas las metodologías empleadas hasta el momento.

4.4.4.2. Reevaluación de los estudios de microscopía electrónica en busca de otra partícula diferente a Bp15.1PLP

Para confirmar la hipótesis de la existencia de una segunda partícula co-purificada junto a las partículas Bp15.1PLP se llevó a cabo una inspección detenida de todas las imágenes de microscopía realizadas en el pasado en nuestros estudios, con objeto de encontrar algún indicio de alguna estructura que pudiera ser compatible con la hipótesis realizada. La revisión de las micrografías permitió observar la presencia de una partícula con una morfología diferente a la partícula Bp15.1PLP, mucho menos abundante que ella. Esta nueva partícula, denominada Bp15.1Hope (**Figura 72**), presentó una cabeza (H) de mayor tamaño (73.41 \pm 0.15 nm) que la de la partícula Bp15.1PLP, con morfología hexagonal y altamente electrodensa tras la tinción negativa, y una cola (T), aparentemente no contráctil, corta, fina y ligeramente curvada, de 155.03 \pm 4.6 nm de largo y 12.01 \pm 04 nm de ancho. Además, la cola mostró una estriación transversal y un ligero ensanchamiento en la región distal.



Figura 72. Diferentes micrografías obtenidas por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) de un lisado obtenido a partir de inducción mediante Mitomicina C de un cultivo de *B. pumilus* 15.1, precipitado con PEG y purificado parcialmente mediante gradiente de sacarosa. Además de las partículas Bp15.1PLP, se pudo observar una partícula mucho menos abundante similar a un fago, cuya cabeza (H) y cola (T) se marcan con flechas.

La morfología de Bp15.1Hope observada fue similar a la que presentan los fagos de la familia *Siphoviridae* del orden de los *Caudovirales*, caracterizados por la presencia de colas no contráctiles y cabezas sin envuelta.

La baja abundancia de esta nueva partícula con respecto a Bp15.1PLP fue compatible con la baja cantidad de proteína de la cápside observada los geles de poliacrilamida (**Figura 71**, flecha A, **Figura 70**, banda 2).

El hecho de que la ORF 103 se encuentre codificada en la región de 60.2 Kb, rodeada de ORFs que codifican otras proteínas estructurales de fagos tales como, las dos subunidades de la terminasa (ORF 98 y ORF 99), una proteína portal (ORF 100), dos proteínas de la cápside, (ORF 101 y ORF 103), 4 ORFs de la cola (107, 112-114) y otros ORFs que codifican para proteínas relacionadas con la lisis bacteriana (ORF 118, ORF 120-121), parece indicar que Bp15.1Hope es una partícula completamente independiente a la partícula Bp15.1PLP y que esté codificada en la región de 60.2 Kb del genoma.

4.4.4.3. Estudio comparativo de la región de 60.2 Kb con las secuencias presentes en la base de datos de virus del NCBI

Con objeto de encontrar fagos previamente descritos y similares a Bp15.1Hope se realizó una búsqueda en la base de datos *Viral Genome Database* del NCBI. En esta base de datos se encontraron 143 genomas de fagos completamente secuenciados (más dos incompletos) que utilizaban bacterias de género *Bacillus* como hospedadores. Las especies de *Bacillus* que presentaron un mayor número de fagos secuenciados fueron *B. thuringiensis* (44 fagos), *B. cereus* (31 fagos), *B. subtilis* (21 fagos), *B. megaterium* (actualmente Priestia megaterium) (17 fagos) y *B. pumilus* (14 fagos) (**Tabla 21**).

Especie <i>Bacillus</i>	Nº Fagos	Especie <i>Bacillus</i>	Nº Fagos
B. alcalophilus	1	B. pumilus	14
B. anthracis	3	B. safensis	1
B. bogoriensis 1		B. subtilis	21
B. cereus 31		B. thuringiensis	44
B. clarkii	1	B. velezensis	1
B. halmapalus	1	B. weihenstephanensis	1
B. licheniformis	1	Bacillus sp.	7
P. megaterium	17		

Tabla 21. Número de fagos en bacterias del género *Bacillus* cuyo genoma se encuentra disponible en la base de datos del NCBI* (ordenados alfabéticamente).

*NCBI: <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/viruses/</u>

El tamaño del genoma de los fagos que utilizan *Bacillus* como huésped osciló entre las 18.37 Kb del fago BsuP-Goel de *B. subtilis* hasta los 497.5 Kb del fago G de *P. megaterium*, por lo que el tamaño de la región de 60.2 Kb se encontraría dentro de este rango de tamaños.

Los genomas de los fagos de *B. pumilus* recuperados de la base de datos (**Tabla 22**) fueron utilizados para llevar a cabo un análisis de homología y sintenia con la región de 60.2 Kb mediante *Blastx* y *EasyFig.* Este análisis demostró la falta de homología de esta región con todos los genomas analizados, lo que parece indicar que esta región de 60.2 Kb codifica un nuevo fago de *B. pumilus.*

	Cepa de <i>B.</i>		Tamaño del
Nombre del fago	<i>pumilus</i> (B. p)	Número de acceso	genoma (pb)
Bobb	<i>B. p</i> SAFR32	NC_024792	160,281
Вр8р-С	<i>B. p</i> GR8	NC_029121	151,417
Вр8р-Т	<i>B. p</i> GR8	NC_047744	151,419
phiGATE	<i>B. p</i> GL1	NC_020081	149,844
Bpu_PumA	В. р	NC_049971	18,466
Bpu_PumB	В. р	NC_049972	18,932
Andromeda	<i>B. p</i> BL8	NC_020478	49,259
Blastoid	<i>B. p</i> BL8	NC_022773	50,354
Curly	<i>B. p</i> BL8	NC 020479	49,425

Tabla 22. Fagos de *B. pumilus* encontrados en las bases de datos de ADN genómico viral del NCBI*. Se muestra el nombre de los fagos, la cepa utilizada para su multiplicación, el número de acceso y el tamaño del genoma viral.

Eoghan	<i>B. p</i> BL8	NC_020477	49,458
Finn	<i>B. p</i> BL8	NC_020480	50,161
Glittering	<i>B. p</i> BL8	NC_022766	49,246
Riggi	<i>B. p</i> BL8	NC_022765	49,836
Taylor	<i>B. p</i> BL8	NC_041858	49,492

*NCBI: <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/viruses/</u>

Desafortunadamente, los intentos de buscar un hospedador para Bp15.1Hope y producir la amplificación del fago en gran cantidad han sido infructuosos hasta el momento. Debido a la baja producción de Bp15.1Hope con la inducción con Mitomicina C, hace que su estudio y caracterización molecular sea imposible por el momento.

4.4.5. La partícula Bp15.1PLP presenta una actividad similar a bacteriocinas. Caracterización de dicha actividad.

Otra característica curiosa de la partícula PBSX producida por *B. subtilis*, es que presenta una actividad bacteriocina hacia cepas relacionadas con su huésped (Longchamp et al. 1994). Se ha propuesto que esta actividad podría tener un papel importante en la competencia entre cepas cuando estas conviven en un mismo ambiente, permitiendo reducir la competencia de otras bacterias cuando están un mismo nicho ecológico.

Para determinar si la partícula Bp15.1PLP poseía una actividad bacteriocina similar, se realizó un ensayo de la actividad inhibitoria del crecimiento tal y como se describe en el apartado 3.4.5 de Materiales y Métodos con 18 cepas bacterianas de nuestra colección bacteriana.

En este ensayo se observó que una preparación de Bp15.1PLP, obtenida mediante la precipitación con PEG (suspensión de la partícula Bp15.1PLP y el fago BP15.1Hope en baja proporción), produjo la inhibición del crecimiento de algunas de las cepas ensayadas, formándose un halo de aclaramiento bien definido en el lugar donde se dispuso la gota (**Figura 73**).

<i>Bp</i> 15.1	<i>Bp</i> 15.1_C
15-1	15.1
<i>Bp</i> M1	<i>Bp</i> M2
.s.e	15.0

Figura 73. Resultado del ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano realizado mediante *spot test* sobre el césped de diferentes cepas de *B. pumilus* enfrentadas a lisados de *B. pumilus* 15.1 inducidos mediante Mitomicina C y concentrados mediante PEG. El nombre de las cepas de *B. pumilus* utilizadas como indicadoras se muestra en la parte superior de la imagen. La gota, con la suspensión de partículas víricas y PLPs, se dispuso sobre el punto una vez solidificada la sobrecapa de la cepa indicadora. El resultado del ensayo se observó a la mañana siguiente tras una incubación de 16 h a 30°C.

Como se observa en la **Tabla 23**, todas las cepas que mostraron ser susceptibles a la suspensión de partículas similares a fagos fueron cepas de *B. pumilus*, mientras que cepas relacionadas (*B. subtilis*), otros *Bacillus* (*B. thuringiensis*, *B. cereus*) u otras cepas más alejadas filogenéticamente (*Lactococcus*, *Esherichia coli*, *Arthrobacter*, *Listeria*, o *Micrococcus*) no fueron susceptibles.

	Aspecto del halo de
Actividad lítica	inhibición
-	-
+++	Translúcido
-	-
-	-
-	-
-	-
-	-
-	-
-	-
-	-
-	-
-	-
	Actividad lítica - ++++ ++++ ++++

Tabla 23. Susceptibilidad de algunas cepas bacterianas de nuestra colección utilizadas en el ensayo de inhibición de crecimiento mediante *spot test* o ensayo en gota.

El resultado obtenido pareció indicar que Bp15.1PLP posee una actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano muy específica, ya que solamente las cepas de *B. pumilus* mostraron ser sensibles a la suspensión de partículas víricas. No se observó actividad de Bp15.1PLP frente a *B. pumilus* 15.1, la cepa productora de las partículas, siendo esto una característica habitual en las cepas productoras de bacteriófagos y bacteriocinas (Abee 1995).

Sorprendentemente, si se observó una elevada inhibición del crecimiento sobre la cepa de *B. pumilus* 15.1C, una cepa idéntica a *B. pumilus* 15.1 pero curada de elementos

extracromosómicos, obtenida por nuestro grupo de investigación con anterioridad (Garcia-Ramon et al. 2018).

4.4.5.1. Estudio de la especificidad de la partícula Bp15.1PLP entre la comunidad de microorganismos esporulantes

La actividad bacteriocina de la partícula Bp15.1PLP pareció ser muy específica, afectando a un reducido número de especies bacterianas, todas ellas *B. pumilus*. Sin embargo, estos ensayos se realizaron con un número muy reducido de microorganismos, los que disponíamos en nuestra colección de laboratorio. Además, el número de esporulantes ensayados, aparte de las especies de *B. pumilus*, fue solo de tres (*B. thuringiensis*, *B. cereus*, y *B. subtilis*). Con objeto de realizar el estudio de especificidad de la partícula Bp15.1PLP con una muestra mayor y más diversa de microorganismos esporulantes se decidió obtener una nueva colección bacteriana a partir de muestras de campo.

El aislamiento de bacterias esporulantes procedentes de muestras de suelo, obtenidas de tres localizaciones diferentes de las provincias de Granada, Almería y Málaga, se realizó utilizando la metodología descrita en el apartado 3.2.4 de Materiales y Métodos. La colección de bacterias esporulantes contuvo un número de 1100 cepas, que fueron rastreadas para determinar su susceptibilidad a las partículas Bp15.1PLP, obtenidas mediante concentración con PEG. Para el rastreo, las bacterias aisladas del suelo se repicaron en dos placas, una que tenía una sobrecapa de agarosa conteniendo partículas Bp15.1PLP sobre una placa de LB y otra placa de LB normal. La primera placa tenía como objetivo comprobar si existía alguna alteración del crecimiento y la segunda era para recuperar la cepa en caso de que fuera susceptible a la partícula Bp15.1PLP.

Aquellas bacterias en las que la presencia de las partículas en la sobrecapa afectó de alguna forma a su crecimiento, fueron seleccionadas (80) y utilizadas para confirmar que existía inhibición del crecimiento en ensayos en gota. En estos ensayos, cada cepa se repicó en forma de estría en una placa de LB y en un extremo de la estría se colocó una gota de suspensión de partículas Bp15.1PLP. Tras la incubación durante toda la noche, para permitir el crecimiento bacteriano de la estría, se determinó qué bacterias presentaban un efecto de inhibición (**Figura 74**).



Figura 74. Resultados de los ensayos de inhibición de crecimiento mediante la metodología de ensayo en gota sobre estría. La metodología se puso a punto con cepas cuya susceptibilidad a las partículas Bp15.1PLP era conocida (*B. pumilus* 15.1_C, *B. pumilus* M1 y *B. pumilus* M2 sensibles y *B. cereus* y *B. thuringiensis* subs kurstaki resistentes) (Panel A). En el Panel B se muestra un ensayo en gota realizado con bacterias aisladas de suelo. Como se observa, la mayoría de las bacterias fueron resistentes a la acción de la partícula Bp15.1PLP, pero aquellas susceptibles se identificaron fácilmente por la inhibición del crecimiento de la estría. La cepa marcada con el número (6), fue susceptible y corresponde a la cepa 1.1.2.

De estos ensayos se seleccionaron un total de 13 cepas que parecían presentar una fuerte inhibición del crecimiento en estas condiciones. Con ellas se realizó un nuevo ensayo de inhibición del crecimiento, esta vez utilizando la metodología del ensayo en gota sobre una sobrecapa de bacterias preparadas tal y como se detalla en el apartado 3.4.5 de Materiales y Métodos.

Todas las bacterias seleccionadas presentaron una inhibición del crecimiento cuando Bp15.1PLP estuvo presente en la gota (**Figura 75**). Puede observarse que la morfología de los halos de inhibición obtenidos fue distinta dependiendo de la cepa. Así, mientras las cepas 1.1.2, MBS2 y 1.1.4 presentaron un halo claro, sus bordes fueron muy diferentes. Por el contrario, las cepas 1.1.1, MBS1 y 1.2.3 presentaron un halo opaco, y con cierta turbidez.



Figura 75. Detalle de los halos de inhibición observados en ensayos en gota sobre las cepas susceptibles aisladas a partir de muestras de suelo. Los halos fueron obtenidos mediante la incubación de un precipitado de partículas Bp15.1PLP en una sobrecapa de diferentes cepas bacterianas usadas como indicadoras y seleccionadas mediante ensayos en estría. Se observaron diferentes morfologías, halos claros o translúcidos con bordes definidos (1.1.2), halos concierta opacidad y bordes bien definidos (1.1.1), halos opacos sin bordes definidos (1.2.3), halos translúcidos sin bordes definidos (1.1.4) halos opacos granulados (MBS1) y halos translúcidos granulados (MBS2).

Los resultados obtenidos indicaron que la partícula Bp15.1PLP es extremadamente específica ya que únicamente 13 cepas esporulantes, de las 1100 ensayadas, fueron susceptibles. Esto implica una susceptibilidad del 1.18% mediante la aplicación de esta metodología.

Las características del halo observado en estos ensayos en gota sirvieron para seleccionar 5 de las 13 cepas para estudios posteriores.

4.4.5.1.1. Identificación de los aislados sensibles a las partículas Bp15.1PLP mediante secuenciación parcial del gen bacteriano ARNr 16S

Con objeto de determinar si las cepas sensibles a la partícula Bp15.1PLP seleccionadas estaban relacionadas o no con la cepa productora de las mismas (*B. pumilus* 15.1) y obtener una visión más clara del rango de acción de estas partículas, se procedió a la identificación de la especie de cada cepa. La identificación se realizó mediante amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr y comparación de su secuencia con las presentes en las bases de datos con la herramienta Blastn.

Junto a las 5 cepas esporulantes seleccionadas por ser sensibles a Bp15.1PLP, se seleccionó al azar una resistente, como control negativo (cepa I). El nombre de dichas cepas, el origen y las características del halo de inhibición, se muestran en la **Tabla 24**.

sometido a la acción de una gota de Bp15.1PLP.							
Aislado	Origen	Aspecto del halo de inhibición producido por Bp15.1PLP					
1.1.1.	Almería	Opaco/Bordes definidos					
1.1.2.	Granada	Translúcido/Bordes definidos					
1.1.3.	Almería	Translúcido/Bordes grumosos					
1.1.4.	Málaga	Translúcido/Bordes difusos					
1.2.3	Málaga	Opaco/Bordes difusos					
Cepa I	Granada	-					

Tabla 24. Cepas de suelo seleccionadas para los estudios de identificación bacteriana. El nombre del aislado, así como su origen se detallan, junto al aspecto del halo de inhibición observado cuando es sometido a la acción de una gota de Bp15.1PLP.

Tras la extracción del ADN total de 5 cepas sensibles (1.1.1, 1.1.2, 1.1.3, 1.1.4 y 1.2.3) y la resistente (cepa I), se realizó una amplificación por PCR de los genes 16S ARNr con los cebadores 533F y 16SB1. Tras la amplificación los fragmentos que se secuenciaron con el cebador 16SB1.

El gen 16S ARNr tiene aproximadamente 1.600 pb e incluye 9 regiones hipervariables, con diferentes niveles de conservación. El uso del cebador específico 16SB1 permitió secuenciar una región de 600-800 pb que incluyeron las regiones hipervariables V5-V8 del gen 16S ARNr bacteriano. Los 58 nucleótidos de la región hipervariable 6 (V6) permiten diferenciar entre la mayor parte de las bacterias, excepto aquellas pertenecientes a la familia *enterobacteriaceae*, incluso especies tan similares como *Bacillus anthracis* y *B.* cereus, que difieren en un único polimorfismo o SNP en esta región. Mediante esta estrategia se puede llevar a cabo una identificación bacteriana a nivel de especie (Chakravorty et al. 2007; Bukin et al. 2019).

Las secuencias de los genes 16S ARNr de las 6 cepas se compararon a nivel nucleotídico con los genes de las bases de datos del NCBI. El resultado de los porcentajes de identidad más relevantes obtenidos se recoge en la **Tabla 25**.

	Aislado	% Idon	tidad	Evalor		Idontifi	cación		-
geı	n 16S ARNr	· con las s	ecuenci	as depositad	las en las bases d	e datos del	NCBI en cada	a cepa.	
la	bia 25. Pore	centajes d	de Identi	idad (y valore	es E) obtenidos m	lediante la c	comparación	de la secuencia	aei

- . .

. .

. .

Aislado	% Identidad	E-valor	Identificación
1.1.1	100	0.00	Grupo B. subtilis (B. subtilis/B. velezensis)
1.1.2	100	0.00	Grupo B. subtilis (B. subtilis/B. velezensis)
1.1.3	100	0.00	Grupo B. subtilis (B. subtilis/B. velezensis)
1.1.4	99.82	0.00	Paenibacillus sp. (P. lautus)
1.2.3	100	0.00	Priestia megaterium
Cepa I*	100	0.00	B. oceanisediminis / B. firmus

Las cepas identificadas mediante la amplificación parcial del gen 16S ARNr pertenecieron en todos los casos a géneros de bacterias esporulantes, principalmente del género *Bacillus*. La cepa 1.2.3 fue identificada como perteneciente género *Priestia*,

(*P. megatrerium*), anteriormente conocida como *Bacillus megaterium*, y cuya nomenclatura ha sido modificada recientemente (Gupta et al. 2020). La cepa 1.1.4, identificada como una cepa del género *Paenibacillus* (identidad del 99.82%) fue la única no perteneciente al grupo de *B. subtilis*, grupo al cual pertenece *B. pumilus*.

Tras conocer las secuencias de los genes 16S ARNr de cada cepa se realizó un análisis filogenético de las mismas para determinar la cercanía de las especies identificadas con la cepa *B. pumilus* 15.1. El resultado de este análisis se muestra en la **Figura 76**.

Las cepas 1.1.1, 1.1.2 y 1.1.3, pertenecientes al grupo de *B. subtilis* formaron un clado independiente, muy relacionado con *B. pumilus* 15.1, hecho lógico ya que *B. pumilus* pertenece al grupo de *B. subtilis.* El resto de las cepas estuvieron más alejadas filogenéticamente, ya que formaron parte de clados diferentes, siendo la cepa 1.1.4 más distante a *B. pumilus* 15.1. Este resultado sorprendió un poco, ya que la cepa I, no susceptible a la actividad bacteriocina de Bp15.1PLP, estuvo más relacionada filogenéticamente que la cepa 1.1.4, que si fue sensible.

Los resultados de este análisis mostraron que, aunque la actividad bactericida de Bp15.1PLP parece ser bastante específica, existe la posibilidad de que afecte a especies de bacterias distantes evolutivamente.



Figura 76. Árbol filogenético realizado mediante el método *Neighbor-joining* con las secuencias de los genes 16S ARNr de las cepas seleccionadas y de organismos que mostraron una alta identidad en los estudios comparativos con *Blastn* (Tabla 25).

Se hizo además la observación de que el tipo de halo producido por Bp15.1PLP podría estar relacionado con la distancia filogenética. Así, las cepas que presentaron una relación filogenética más cercana con *B. pumilus*, (1.1.1, 1.1.2 y 1.1.3) mostraron una inhibición del crecimiento elevada, formándose en ellas halos translúcidos y bordes bien definidos en los ensayos en gota. Sin embargo, la partícula Bp15.1PLP formó halos menos definidos y turbios en cepas que se encontraron más alejadas filogenéticamente de *B. pumilus* 15.1, como fue el caso de la cepa 1.2.3 (*P. megaterium*). La cepa 1.1.4 volvió a ser una excepción a esta observación, ya que presentó un halo completamente translucido, pese a ser la cepa más distante filogenéticamente a *B. pumilus*.

4.4.5.1.2. Efecto de la dilución de la suspensión de partículas Bp15.1PLP sobre la actividad inhibitoria del crecimiento

El ensayo en gota usado hasta el momento para determinar el efecto inhibitorio del crecimiento de las partículas Bp15.1PLP, aunque muy cómodo metodológicamente, presenta el inconveniente de que es un ensayo en el que no se puede diferenciar la actividad lítica de una bacteriocina de la actividad lítica de un fago. Estas dos actividades líticas pueden diferenciarse solo si se realizan diluciones seriadas de la suspensión original. En el caso de un fago, si la suspensión se diluye varios ordenes de magnitud y se realiza un ensayo en gota con cada dilución, se observará cómo el halo de lisis provocado por las soluciones más concentradas se irá transformando en placas de lisis independientes conforme lo vamos diluyendo. Por el contrario, si se trata de una bacteriocina, el lisado observado se irá haciendo cada vez más tenue a causa de la dilución de ésta.

El ensayo del efecto de la dilución de las partículas Bp15.1PLP se realizó sobre dos cepas, *B. pumilus* 15.1C, susceptible y *B. pumilus* 15.1, resistente a la acción de estas (**Figura 77**).



Figura 77. Ensayo en gota o *spot test* realizado en sobrecapas conteniendo *B. pumilus* 15.1 (Panel A) y *B. pumilus* 15.1C, una cepa curada de elementos extracromosómicos (Panel B). Una vez solidificada la sobrecapa con la cepa indicadora se dispusieron 2 µl de diferentes diluciones de la partícula Bp15.1PLP obtenida de un lisado de *B. pumilus* 15.1, y concentrada mediante precipitación por PEG. Las soluciones ensayadas fueron, i), el precipitado sin diluir (0), ii) medio SM (C), y iii) diluciones seriadas realizadas a partir del stock original (-1 a -6). Además, se analizó el efecto del tiempo de almacenaje de la partícula Bp15.1PLP en la actividad bactericida, utilizándose 2 µl de preparación almacenada a 4°C durante 2 meses (V).

Como puede observarse en la **Figura 77**, no hubo efecto alguno de las partículas Bp15.1PLP sobre la cepa resistente (Panel A). Se observó una reducción gradual de la actividad inhibitoria en la cepa sensible *B. pumilus* 15.1C a medida que se diluyó la suspensión original. El efecto inhibitorio sobre la cepa *B. pumilus* 15.1C se observó hasta la dilución 10⁻⁵. El resultado observado apoya la hipótesis de que Bp15.1PLP no es una partícula replicativa y el comportamiento corresponde con lo esperado para una bacteriocina.

4.4.5.2. Estudio de la velocidad de acción de la partícula Bp15.1PLP

Otro parámetro de la actividad bactericida de la partícula Bp15.1PLP que se quiso caracterizar fue la velocidad a la que se producía la lisis de cepas susceptibles. Dicho de otro modo, se decidió evaluar cuánto tiempo era necesario para que Bp15.1PLP produjera la lisis en bacterias susceptibles.

Para ello, las cepas sensibles a la acción de la partícula Bp15.1PLP, *B. pumilus* 15.1C, *B. pumilus* M1 y *B. pumilus* M2 se prepararon tal y como se describe en el apartado 3.2.6 de Materiales y Métodos. Una vez las células fueron obtenidas, se tomó una fracción alícuota de 100 μ l para realizar un conteo del número de células existentes y otra fracción del mismo volumen que se mezcló con 5 μ l de una preparación de partículas Bp15.1PLP, obtenidas mediante inducción con Mitomicina C y precipitadas mediante PEG.

El efecto lítico de la partícula Bp15.1PLP se midió mediante la cuantificación del número de bacterias totales supervivientes tras 5 y 120 min de incubación (a 30°C) con las células sensibles, comparadas con el número de células a tiempo 0 y el número de células cuando la incubación se realizó con una cepa resistente. En la **Tabla 26** se muestran los resultados del conteo celular a distintos tiempos y en distintas cepas.

		Número de bacterias		
Сера	Susceptibilidad a Bp15.1PLP	To	T5′	T ₁₂₀ ′
B. pumilus 15.1	Resistente	9x10 ⁸	8x10 ⁸	9x10 ⁸
B. pumilus 15.1C	Sensible	9x10 ⁸	1.5x10 ⁵	6x10 ⁴
B. pumilus M1	Sensible	4x10 ⁸	2x10 ³	1.5x10 ²
B. pumilus M2	Sensible	6x10 ⁸	6.3x10 ⁵	2.6x10 ⁵

Tabla 26. Conteo del número de células de *B. pumilus* 15.1, *B. pumilus* 15.1C, *B. pumilus* M1 y *B. pumilus* M2 supervivientes tras la incubación con la partícula Bp15.1PLP a distintos tiempos (0 min, 5 min y 120 min).

Como puede observarse en la **Tabla 26**, tras 5 min de incubación con la partícula Bp15.1PLP, el número de células sensibles vivas se redujo drásticamente en 3-5 órdenes de magnitud, dependiendo de la cepa ensayada. En la cepa resistente no se observó descenso del número de células viables. Dos horas después de la puesta en contacto de la partícula con las cepas sensibles, la supervivencia llegó a niveles que oscilaron entre 10^5 cfu/ml y 10^2 cfu/ml, lo que significó un descenso de la población bacteriana entre 3 y 6 órdenes de magnitud, dependiendo de la célula con la que se realizó la incubación.

La variación del número de células entre los tiempos 5 min y 120 min solo fue de un orden de magnitud. Los resultados obtenidos parecen indicar que la actividad bacteriocina de la partícula Bp15.1PLP es un proceso altamente eficiente y rápido, que ocurre en los primeros minutos de la puesta en contacto de la partícula con la célula susceptible.

4.4.5.3. Efecto de la temperatura en la actividad bacteriocina de Bp15.1PLP

La partícula Bp15.1PLP es un complejo proteico de gran tamaño, cuya estructura posiblemente sea susceptible a los aumentos de temperatura, debido a la pérdida de la conformación estructural de la misma. La tolerancia a la temperatura de la partícula Bp15.1PLP se evaluó mediante la actividad bacteriocina de la misma, tras incubar una suspensión de partículas a temperaturas crecientes. Para la evaluación de esta característica se usó la cepa *B. pumilus* 15.1C (susceptible a la acción de Bp15.1PLP), preparada tal y como se describe en el apartado 3.2.6 de Materiales y Métodos. Fracciones alícuotas de una suspensión de Bp15.1PLP (5 µl) fueron calentadas a 45°C, 60°C, 80°C y 100°C durante 10 min y luego incubadas con 100 µl de células susceptibles a la acción bacteriocina. La **Tabla 27** recoge los datos de supervivencia de la cepa *B.*
pumilus 15.1C tras la incubación de 5 min con las partículas Bp15.1PLP calentadas a distintas temperaturas y sin calentar.

Tratamiento	№ de células (cfu/ml)		
	To	T ₅	
Sin tratamiento	2.5x10 ⁸	1.5x10 ⁵	
45°C	2.5x10 ⁸	2.5x10 ⁵	
60°C	2.5x10 ⁸	4x10 ⁸	
80°C	2.5x10 ⁸	4x10 ⁸	
100°C	2.5x10 ⁸	6x10 ⁸	

Tabla 27. Efecto de la temperatura sobre la actividad de las partículas Bp15.1PLP, medido mediante el número de células viables de *B. pumilus* 15.1C tratadas con partículas calentadas a diferentes temperaturas.

Como puede observarse en la **Tabla 27**, el calentamiento de Bp15.1PLP a 45°C provocó el mismo descenso en el número de células vivas que el que obtuvo la partícula no tratada a ninguna T^a, por lo que parece que esta temperatura no es suficiente para abolir la actividad bacteriocina. Sin embargo, las partículas de Bp15.1PLP calentadas a una T^a igual o superior a 60°C no provocaron el descenso del número de células, lo que implica que la actividad bacteriocina es eliminada a una T^a entre 45 y 60°C. Estos resultados parecen indicar que la partícula Bp15.1PLP es susceptible a la T^a.

4.4.6. Ensayos de adhesión

La actividad bactericida de las bacteriocinas, al igual que ocurre en los fagos, suele presentar un rango de acción muy estrecho de acción, que se observa solo en cepas cercanas y altamente relacionadas filogenéticamente con la cepa que las produce. Este hecho ha sido observado y demostrado también en la partícula Bp15.1PLP. La alta especificidad de las bacteriocinas se consigue generalmente gracias al reconocimiento y a la unión de la bacteriocina a un receptor específico (o varios) presente en la membrana de las células susceptibles (Baptista et al. 2008; Trojet et al. 2011; McCabe et al. 2015; Dunne et al. 2018). Con objeto de comprobar que la especificidad de la partícula Bp15.1PLP se encuentra mediada por el reconocimiento de receptores específicos, se diseñó un ensayo de adhesión entre la partícula Bp15.1PLP y cepas susceptibles y cepas resistentes a la acción de esta partícula.

Para ello se llevó a cabo una incubación de Bp15.1PLP con las cepas *B. pumilus* 15.1C y *B. pumilus* M1, como representantes de cepas sensibles, y con las cepas *B. pumilus* 15.1, *B. subtilis* y *E. coli*, como representantes de cepas resistentes a la acción bactericida. El ensayo de adhesión se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado 3.4.7 de Materiales y Métodos.

Tras la incubación de la bacteria con la suspensión de partículas Bp15.1PLP, las muestras se centrifugaron para sedimentar y retirar las bacterias, y en caso de que existiese una unión irreversible entre las partículas Bp15.1PLP y la célula, también retirarlas. Posteriormente, los sobrenadantes resultantes se analizaron en geles de poliacrilamida (**Figura 78**), para cuantificar la cantidad de partículas Bp15.1PLP que aún permanecían en el sobrenadante y no se habían unido a las células.

La cantidad de partículas Bp15.1PLP se estimó mediante cuantificación de las proteínas de 49 y 34 kDa, ya que fueron las más abundantes y habían sido identificadas como integrantes de la partícula Bp15.1PLP (proteína de la envuelta de la cola y cápside respectivamente). La cantidad de proteínas de 49 y 34 kDa en cada sobrenadante se comparó con la existente en un ensayo donde se llevó a cabo una incubación de partículas Bp15.1PLP sin bacterias, tomándose estas como valor de referencia. Tras el análisis de los geles de acrilamida (**Figura 78**) y cuantificación de las bandas de 49 y 34 kDa presentes en cada ensayo de adhesión, se determinó el porcentaje de adhesión de la partícula Bp15.PLP a cada cepa (**Tabla 28**).



Figura 78. Electroforesis SDS-PAGE de los sobrenadantes resultantes del ensayo de adhesión. Las partículas Bp15.1PLP concentradas y purificadas, se incubaron durante 10 min con cepas bacterianas sensibles (*B. pumilus* 15.1C (2) *B. pumilus* M1 (3)) o resistentes (*B. pumilus* 15.1 (1), *B. subtilis* 168 (4) o *E. coli* DH5α (5)) a la acción bactericida. La capacidad de unión de las partículas a la superficie bacteriana se estimó mediante la diferencia de la concentración de las bandas proteicas de Bp15.1PLP identificadas como las proteínas de la envuelta de la cola (A), de 49 KDa y de la cápside (B), de 34 KDa, con respecto a un control que se incubó sin células (C). Como marcador de peso molecular se utilizó Precision Plus Protein[™] All Blue (BioRad) (M).

Como puede observarse en la **Figura 78** y en la **Tabla 28**, se produjo un descenso del número de partículas Bp15.1PLP en los sobrenadantes de aquellos ensayos en los que se habían utilizado cepas bacterianas sensibles a la acción bactericida. Sin embargo, el número de partículas Bp15.1PLP pareció inalterado, y muy similar al control, en aquellas cepas que no fueron susceptibles a la acción de la bacteriocina (**Figura 79**). Estos resultados indicaron que en las cepas susceptibles había existido una unión entre la cepa

y la partícula, pero que dicha unión no se produjo en el caso de células resistentes a la acción de Bp15.1PLP.

	49 kDa		34 kDa	
Сера	Concentración relativa	Desviación estándar	Concentración relativa	Desviación estándar
Control (sin				cotandar
células)	1,00	0	1,00	0,00
B. pumilus		0.02		
15.1	0,74	0.02	0,72	0,03
B. pumilus		0 10		
15.1C	0,31	0.10	0,60	0,12
B. pumilus		0.05		
M1	0,36	0.05	0,48	0,11
B. subtilis		0.03		
168	0,79	0.05	0,82	0,05
<i>Ε. coli</i> DH5α	0,82	0.07	0,84	0,15

Tabla 28. Concentración relativa de la banda 49 y 34 KDa con respecto al control en los ensayos de adhesión realizados bacterias sensibles (*B. pumilus* 15.1C y *B. pumilus* M1) y bacterias resistentes (*B. pumilus* 15.1, *B. subtilis* 168 y *E. coli* DH5α) a la acción bactericida de la partícula Bp15.1PLP.

Los resultados obtenidos fueron compatibles con la hipótesis de que la partícula Bp15.1PLP reconoce y se une, de forma irreversible, a receptores específicos presentes en la superficie de las cepas sensibles a la actividad bacteriocina. Sin embargo, aquellas cepas no susceptibles, parecen carecer de estos receptores, o se encuentran bloqueados, de forma que no existe interacción entre la partícula y la cepa.



Figura 79. Concentración relativa de la proteína de 34 kDa y 49 kDa de la partícula Bp15.1PLP que queda en los sobrenadantes de un ensayo de adhesión tras ser incubada en presencia de cepas bacterianas sensibles (*B. pumilus* 15.1C y *B. pumilus* M1) o resistentes (*B. pumilus* 15.1, *B. subtilis* y *E. coli* DH5 α) a la acción bacteriocina. Para llevar a cabo la cuantificación relativa de las partículas presentes en los sobrenadantes se determinó la concentración de las proteínas más abundantes (proteína de 34 kDa, y

49 KDa) en la partícula Bp15.1PLP y se refirió al control incubado sin bacterias, al que se le asignó un valor de 1.

4.4.7. Estudio de la capacidad de otras cepas de *B. pumilus* de producir partículas similares a BpB15.1PLP

Los estudios bioinformáticos realizados en el capítulo anterior sirvieron para poner de manifiesto que existían muchas regiones homólogas a la región de 28.7 Kb en los genomas de bacterias de la especie *B. pumilus* y bacterias relacionadas. Debido a que esta región es responsable de la producción de la partícula Bp15.1PLP, se consideró que era bastante posible que otras cepas de *B. pumilus* produjeran partículas similares a Bp15.1PLP cuando se inducían en las mismas condiciones. Para demostrar esto, varias cepas de nuestra colección, *B. pumilus* 15.1C, *B. pumilus* M1, *B. pumilus* M2 y la cepa de referencia *B. pumilus* 8A3, fueron estudiadas.

4.4.7.1. Estudio de la Inducción de la lisis mediante con Mitomicina C en otras cepas de B. pumilus

La inducción del fenómeno de lisis con Mitomicina C observado en *B. pumilus* 15.1 fue estudiado en otras cepas de *B. pumilus* en cultivos líquidos. Para ello, a cultivos de las cepas *B. pumilus* 15.1C, M1, M2 y 8A3 se les añadió Mitomicina C a una D.O. _{600 nm} de 0.3-0.4 y se llevó a cabo un seguimiento de la misma a lo largo del tiempo (**Figura 80**).

Como puede observarse, todas las cepas bajo estudio mostraron un descenso en D.O. _{600 nm} tras la adición de Mitomicina C, llegando a un valor de 0.2 tras 22 h. De todas las cepas ensayadas, la cepa *B. pumilus* 15.1 mostró la velocidad de lisis más rápida, mientras que la velocidad de lisis en la cepa *B. pumilus* 8A3 y la cepa *B. pumilus* 15.1C fueron las más bajas.



Figura 80. Representación semilogarítmica de la evolución de la D.O. 600 nm frente al tiempo de cultivos de las cepas *B. pumilus* 15.1 (círculos azules), *B. pumilus* 15.1C (círculos naranjas) *B. pumilus* M1 (cuadrados grises), *B. pumilus* M2 (cuadrados amarillos) y *B. pumilus* 8A3 (cruces azules) a 30°C y 240 rpm. El tiempo 0 se corresponde al momento en el que la mitomicina C fue añadida al cultivo. Cada uno de los puntos mostrados corresponde a la media de tres medidas independientes y se representan junto a su desviación estándar (SD).

Cada uno de los lisados obtenidos fue procesado para la obtención de PLPs mediante precipitación con PEG, tal y como se describe en el apartado 3.4.2 de Materiales y Métodos.

4.4.7.2. Observación bajo Microscopía Electrónica de Transmisión de PLPs obtenidos de distintas cepas

Los lisados de los cultivos de *B. pumilus* 15.1, M1 y M2 obtenidos tras la inducción con Mitomicina C, fueron teñidos para llevar a cabo una observación por Microscopía Electrónica de Transmisión. Los resultados de este análisis se muestran en la **Figura 81**.



Figura 81. Detalle de las partículas similares a fagos (PLPs) observadas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) en sobrenadantes de cultivos de *B. pumilus* 15.1, *B. pumilus* M1, *B. pumilus* M2 y *B. pumilus* 8A3 inducidos con Mitomicina C. Las dimensiones de la cabeza y cola de todas las partículas fueron muy similares entre sí.

Como puede observarse, todas las cepas de *B. pumilus* analizadas presentaron partículas similares a Bp15.1PLP. Las medidas de las cabezas y colas en todos los PLPs observados fueron muy similares entre sí y similares a las medidas de Bp15.1PLP (datos no mostrados).

4.4.7.3. Estudio de la capacidad de lisis de diferentes PLPs sobre cepas de B. pumilus mediante ensayo en gota

Los PLPs obtenidos de las cepas *B. pumilus* 15.1C, M1, M2 y 8A3 mediante precipitación con PEG fueron utilizados para llevar a cabo ensayos en gota junto con Bp15.1PLP, para poder así describir su capacidad para inhibir el crecimiento de otras cepas y sobre sí mismas. Los resultados de estos ensayos se muestran en la **Figura 82**.



Figura 82. Ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano de diferentes cepas de *B. pumilus* enfrentadas a diferentes PLPs. El nombre de las cepas de *B. pumilus* utilizadas como indicadoras y contenidas en las sobrecapas de Top Agarosa se encuentran en la parte superior de cada figura. Los nombres de las cepas de las que proceden los PLPs ensayados se encuentran marcados en marrón sobre las placas.

Como puede observarse en la **Figura 82**, Bp15.1PLP fue el PLP que presentó una actividad bactericida más amplia, ya que inhibió el crecimiento de todas las cepas de *B. pumilus* utilizadas en el ensayo, excepto el suyo propio. La cepa *B. pumilus* 8A3 fue la cepa más susceptible a los PLPs, ya que su crecimiento fue inhibido por todos los PLPs ensayados. Curiosamente el PLP obtenido de esta cepa (Bp8A3PLP) fue el único que presentó actividad hacia *B. pumilus* 15.1 pero no presentó actividad frente a *B. pumilus* 15.1C. También se observó que el PLP obtenido de la cepa *B. pumilus* 15.1C (Bp15.1CPLP) no tuvo la misma actividad que su cepa parental *B. pumilus* 15.1, ya que no fue activa hacia M1 y M2.

Estos resultados parecen indicar que la producción de PLPs por parte de las cepas de *B. pumilus* es un fenómeno generalizado, que dichos PLPs presentan también actividad bacteriocina y que cada uno de ellos posee un perfil de acción diferente, dependiendo de la cepa a la que se enfrente.

4.4.8. Evaluación de la actividad de la partícula Bp15.1PLP frente a larvas de primer estadio de *C. capitata*.

En la bibliografía existen descritos algunos ejemplos de factores de virulencia de insectos sintetizados o transportados por fagos o partículas similares a fagos. Este es el caso del *casette* de virulencia de *Photorhabdus* (PVC) (Yang et al. 2006) o el sistema *anti-feeding*

prophage (AFP) de Serratia (Hurst et al. 2007a). Tras la caracterización de la partícula Bp15.1PLP ha quedado establecido que i) no es exclusiva de la cepa *B. pumilus* 15.1, y que partículas similares son sintetizadas por otras cepas no entomopatógenas (M1 y M2), y ii) que el genoma que codifica la partícula Bp15.1PLP no presentó identidad con ningún factor de virulencia conocido. La probabilidad de que Bp15.1PLP estuviera relacionada con la actividad entomopatógena observada en la cepa *B. pumilus* 15.1 fue extremadamente baja, aun así, se evaluó su efecto tóxico sobre larvas de *C. capitata*, solo y exclusivamente porque este fue nuestro objetivo al iniciar la caracterización de la región del genoma relacionada con fagos.

Para estudiar el posible efecto de la partícula Bp15.1PLP sobre larvas de primer estadio de *C. capitata*, se llevó a cabo un bioensayo de contaminación de dieta, tal y como se describe en la sección 3.11.2 de Materiales y Métodos. En este bioensayo se intentó evaluar el posible efecto sinérgico entre la partícula Bp15.1PLP y un cultivo esporulado de *B. pumilus* 15.1, en condiciones subletales de la bacteria (20% de mortalidad). Además, como control se ensayó la partícula Bp15.1PLP sola, tanto concentrada mediante precipitación con PEG como sin concentrar (cultivo lisado) y el tampón SM, donde se resuspendió la partícula Bp15.1PLP. Los resultados de mortalidad obtenidos en este bioensayo se muestran en la **Tabla 29**.

Table 29. Porcentaje de mortalidad obtenida tras 10 días en los bioensayos realizados con larvas de *C. capitata.* En los bioensayos se usaron cultivos esporulados de *B. pumilus* 15.1 y diferentes concentraciones de partícula Bp15.1PLP, en combinación o no con la cepa *B. pumilus* 15.1. En la tabla también se muestra el incremento de la toxicidad de cada bioensayo con respecto al control (agua estéril).

Bioensayo	% Mortalidad	Incremento toxicidad con respecto al control
H ₂ O	6	1,0
Tampón SM	12	2,0
Cultivo esporulado	20	3,3
Cultivo esporulado + Bp15.1PLP (Lisado)	14	2,3
Bp15.1PLP (Lisado)	0	0,0
Bp15.1PLP (Concentrado 200x)	12	2,0

Como puede observarse en la **Tabla 29**, los lisados bacterianos, en los que se encuentran las partículas Bp15.1PLP no presentaron mortalidad en las larvas de primer estadio, e incluso cuando fueron concentradas 200 veces, presentaron la misma mortalidad que los controles (SM y H₂O). Por tanto, las partículas por sí mismas no tienen ningún efecto sobre las larvas de *C. capitata* en las condiciones ensayadas. Además, tampoco se observó ningún efecto sinérgico entre los lisados bacterianos y el cultivo esporulado, siendo la mortalidad obtenida en ambos casos similar.

Estos resultados sugieren que la partícula Bp15.1PLP no parece presentar ninguna relación con la toxicidad de la cepa *B. pumilus* 15.1 frente a *C. capitata*

Discusión

.

5. Discusión

El estudio y caracterización de los factores de virulencia que un microorganismo patógeno necesita sintetizar para invadir, evadir las estrategias de defensa y colonizar a otro organismo no es una tarea trivial, sobre todo si se necesita describir a nivel molecular. La elucidación del mecanismo de virulencia no es fácil porque por lo general los factores de virulencia son múltiples, las estrategias adoptadas son muy variadas y los mecanismos muy complejos. Las bacterias entomopatógenas, aunque colonizan organismos relativamente sencillos, los insectos, cumplen esta regla general. Si nos centramos por ejemplo en el entomopatógeno mejor caracterizado, *B. thuringiensis*, observamos como posee multitud de factores de virulencia que le ayudan al objetivo final de alcanzar el hemocele del insecto diana y reproducirse a expensas de él.

Debido a que las toxinas proteicas constituyentes de los cristales paraesporales (proteínas Cry y Cyt) son las principales responsables de la toxicidad y especificidad de *B. thuringiensis* han recibido la atención de los investigadores a lo largo de muchos años (Ge et al. 1991; Schnepf et al. 1998; Wei et al. 2003; Bravo et al. 2007; Swiecicka et al. 2008; Xu et al. 2014; Palma et al. 2014b). Sin embargo, muchos otros factores intervienen en el desarrollo de la patogenicidad. Las toxinas Vip y Sip, secretadas por *B. thuringiensis* también son una parte importante de la toxicidad de esta bacteria frente a multitud de insectos (Palma et al. 2014a; Belousova et al. 2021), así como la síntesis de fosfolipasas, quitinasas y metaloproteasas (Guillemet et al. 2010; Peng et al. 2016; Martínez-Zavala et al. 2020). Estos últimos tipos de enzimas, pese a no presentar un efecto citotóxico por sí mismas, participan en la degradación de los componentes de la membrana peritrófica o la membrana basal, lo que facilita la infección del epitelio intestinal del insecto por parte de la bacteria y por tanto su acceso al hemocele, incrementando así la capacidad patógena de esta.

Por último, otras moléculas que sintetiza *B. thuringiensis* y que afectan a su patogenicidad son las β exotoxinas, que producen la inhibición de la ARN polimerasa (Kim and Huang 1970; Šebesta and Horská 1970; Liu et al. 2014), los inhibidores del ciclo del ácido tricarboxílico, como el ácido transaconítico (Du et al. 2017) o moléculas antibióticas, homólogos de la zwittermicina A u otras bacteriocinas, que producen la desregulación de la flora intestinal del insecto facilitando el crecimiento de *B. thuringiensis* a expensas de su insecto diana.

B. thuringiensis se describió por primera vez en 1901 (Ishiwata 1901), y no fue hasta 1953 que se identificaron los cristales paraeporales (Hannay 1953) y se relacionaron con la toxicidad (Angus 1954). Hasta 1991 no se elucidó la estructura tridimensional del principal factor de virulencia (Li et al. 1991) y pudo proponerse el primer mecanismo de

acción. Desde que se identificó el primer receptor de una toxina Cry (Knight et al. 1994), otros muchos receptores como proteínas similares a las cadherinas (Vadlamudi et al. 1993; Nagamatsu et al. 1998), fosfatasas alcalinas (ALP) (Jurat-Fuentes and Adang 2004), glucolipidos (Griffitts et al. 2005), el glicoconjugado BTR-270 (Valaitis et al. 2001), la proteína P252 (Hossain et al. 2004) y el transportador ABCC2 (Gahan et al. 2010; Atsumi et al. 2012) se han descrito gracias al esfuerzo conjunto de muchos investigadores a nivel mundial. A día de hoy, y después de 121 años de investigación sobre esta bacteria, aún no existe un consenso entre la comunidad científica sobre el mecanismo de acción de uno de los factores de virulencia (toxinas Cry) que *B. thuringiensis* sintetiza, coexistiendo el modelo de formación de poro (Knowles and Ellar 1987) y el de activación de una cascada de señalización para inducir apoptosis (Zhang et al. 2005; Zhang et al. 2006). El caso de *B. thuringiensis* y las toxinas Cry es un buen ejemplo de la dificultad y el esfuerzo necesario para caracterizar un mecanismo de patogénesis a nivel molecular.

Pese a ser conscientes de estas dificultades, iniciamos esta tesis doctoral con la idea de comenzar con la búsqueda de moléculas que pudieran explicar la actividad que *B. pumilus* 15.1 presenta sobre las larvas de *C. capitata.* Tomamos como base de partida factores de virulencia descritos en la bibliografía en otras bacterias entomopatógenas (Enolasa y GroEL), proteínas sobreexpresadas por la bacteria durante la fase de esporulación (oxalato descarboxilasa) y caracterizamos regiones del genoma con un alto contenido de proteínas de fago, por ser elementos que también se han asociado con la patogenicidad. Pese a que no hemos podido concluir inequívocamente que alguno de los factores evaluados está relacionado con la toxicidad, este estudio nos ha permitido avanzar en la caracterización de la cepa *B. pumilus* 15.1 y de algunas de sus proteínas y elementos génicos, que sin duda nos servirá para estudios futuros.

El hecho de que rara vez la virulencia observada en un organismo entomopatógeno se deba a factores aislados y que lo habitual es que el efecto se produzca mediante la acción conjunta de varios factores, puede ser la razón de que no hayamos podido concluir que ninguno de los factores de virulencia evaluados sea responsable de la actividad frente a *C. capitata*.

En otras palabras, la aproximación de evaluar el efecto de una única proteína individualmente puede ser infructuosa, al necesitarse otros factores de virulencia que actúen conjuntamente. Sin embargo, esta fue la aproximación llevada a cabo por ser la más sencilla y lógica.

5.1. Evaluación de la influencia de la enzima oxalato descarboxilasa en la virulencia de *B. pumilus* 15.1

En estudios anteriores, al realizar un análisis morfológico de la cepa *B. pumilus* 15.1 mediante microscopía electrónica se observó que la bacteria producía cristales paraesporales de formas y tamaños variados (Garcia-Ramon et al. 2016), los cuales recordaban a los observados en otras cepas entomopatógenas Gram positivas (Barth et al. 2004; Soberón et al. 2013; Xu et al. 2014; Nascimento et al. 2020). La caracterización de estos cristales permitió describir dos hechos sorprendentes, su composición y su comportamiento anómalo cuando fueron incubados a bajas temperaturas (García-Ramón 2016).

Los cristales producidos por *B. pumilus* 15.1 estuvieron principalmente compuestos por la enzima oxalato descarboxilasa, proteína que no presentó ninguna homología con ninguno de los factores de virulencia descritos hasta el momento. Sin embargo, el hecho de que la enzima se produjera en forma de cristales, como ocurre con algunos factores de virulencia de bacterias entomopatógenas (Barloy et al. 1996; Yokoyama et al. 2004; Xu et al. 2014; Ebeling et al. 2021), que se sobreexpresara durante la esporulación y que fuera resistente al tratamiento con tripsina (Garcia-Ramon et al. 2018), al igual que ocurre con las toxinas Cry (Hofmann et al. 1988), recordaba mucho al comportamiento de factores de virulencia de bacterias entomopatógenos, especialmente a las toxinas Cry. Todo esto, unido al sorprendente comportamiento de que los cristales se solubilizan al incubarlos a bajas temperaturas, similar a la necesidad de someter a un cultivo de B. pumilus 15.1 para mostrar toxicidad frente a las larvas de C. capitata (Molina et al. 2010), parecía indicar que la oxalato descarboxilasa podría estar implicada en la toxicidad de la bacteria hacia larvas de este insecto. Esto nos animó a realizar un estudio en profundidad de la enzima. Este estudio consistió en el clonaje del gen que la codifica y la expresión heteróloga, la determinación de la actividad enzimática, y la evaluación de la toxicidad cuando se incrementaba su concentración en un bioensayo.

La expresión heteróloga de la enzima oxalato descarboxilasa fue adecuada, observándose la expresión de una proteína del mismo tamaño que la proteína nativa (**Figura 25**), aunque comparado con otros sistemas de expresión no se produjo en una elevada cantidad. Ahora en retrospectiva, y después de explorar otros sistemas de expresión como el pET-28, quizás el vector pUC19 no fuera la mejor elección para sobreexpresar la enzima oxalato descarboxilasa. A diferencia de otras oxalato descarboxilasas recombinantes (Tanner et al. 2001; Just et al. 2004; Kolandaswamy et al. 2009; Anbazhagan et al. 2013), la oxalato descarboxilasa de *B. pumillus* 15.1 expresada en un sistema heterólogo se obtuvo en forma insoluble, en la fracción *pellet* del lisado celular, es decir, formando cuerpos de inclusión. Una observación sorprendente fue que la enzima recombinante mantuvo la misma característica que la enzima silvestre y se solubilizó cuando se incubó a bajas temperaturas. Este es un hecho

curioso que se investigará en un futuro cercano, ya que no es un comportamiento normal de las proteínas. En general, las proteínas sometidas a bajas temperaturas suelen formar agregados y precipitar (Hashizume et al. 1971; Carpenter and Crowe 1988), no solubilizarse. La precipitación de proteínas por frío presenta un gran inconveniente para la industria, ya que las proteínas pueden sufrir daños irreversibles en su estructura, conformación y función (Chang et al. 1996; Cao et al. 2003; Bhatnagar et al. 2007). Para evitar estos problemas, es habitual el uso de sustancias crioprotectoras en la industria, que permiten la conservación de las proteínas sin que se produzca su degradación y precipitación (Tamiya et al. 1985; Chang et al. 1996). El estudio de por qué la enzima oxalato descarboxilasa se solubiliza con el frío, podría tener relevancia en biotecnología y en el sector industrial.

La enzima oxalato descarboxilasa, tanto en su forma nativa como en su forma recombinante, fue activa, y fue capaz de transformar el oxalato hasta formiato. La actividad se determinó mediante dos ensayos enzimáticos, uno espectrofotométrico indirecto, con una reacción acoplada y otro discontinuo directo, basado en la detección del producto de reacción mediante H-RMN. Estos resultados parecen indicar que, aunque la actividad observada fue muy baja, la enzima es funcional.

En comparación con la actividad descrita para otras oxalato descarboxilasas producidas en organismos cercanos como *B. subtilis*, (75-166 µmol/min) (Mehta and Datta 1991; Tanner et al. 2001), la actividad de la oxalato descarboxilasa de *B. pumilus* 15.1 fue muy baja. Posiblemente este hecho se deba a que las condiciones usadas en nuestros ensayos no fueron las óptimas para esta enzima. Las condiciones utilizadas se extrajeron de la bibliografía (Tanner et al. 2001) pero no se hizo un esfuerzo por caracterizar y determinar las condiciones óptimas de la enzima la oxalato descarboxilasa de *B. pumilus* 15.1. La optimización de las condiciones del ensayo, así como la determinación de los parámetros cinéticos de la enzima son actividades programadas en trabajos futuros. Así, por ejemplo, en la bibliografía se ha descrito que esta enzima presenta inhibición por sustrato (Anand et al. 2002), por lo que quizás la concentración de oxalato utilizada en nuestro ensayo fuera demasiado alta para observar una actividad importante. Reducir la concentración del sustrato en el ensayo enzimático podría suponer estar trabajando en unas condiciones de no inhibición y mejorar la actividad de la enzima.

Pese a que la actividad observada de la enzima oxalato descarboxilasa de *B. pumilus* 15.1 fue muy baja, el ensayo enzimático cumplió su función. Se demostró que la primera enzima que se ha descrito ser sintetizada por una bacteria en forma de cristales paraesporales (Garcia-Ramon et al. 2018) tiene actividad enzimática y es funcional. El que esté relacionada con la virulencia observada en *C. capitata* o no, es otra cuestión.

El único sustrato que se conoce para esta enzima es el oxalato (Tanner and Bornemann 2000) y hasta dónde llega nuestro conocimiento el único producto que se obtiene de esta actividad es el formiato y el CO₂. El formiato es conocido por ser un compuesto tóxico para insectos, artrópodos y organismos superiores (Elzen et al. 2004; Chaskopoulou et al. 2009; Underwood and Currie 2009; Chen et al. 2012; Chen et al. 2013) , por lo que la producción de formiato, gracias a la actividad de la oxalato descarboxilasa, podría explicar la toxicidad observada por esta cepa hacia *C. capitata*.

Los compuestos volátiles como el etil formiato son insecticidas ampliamente utilizados en instalaciones de almacenaje post-cosecha como el almacenaje de cereales (Haritos and Dojchinov 2003; Xin et al. 2008). Ensayos *in vitro* han demostrado como el etil formiato es rápidamente degradado hasta acido fórmico en los tejidos del insecto, presumiblemente debido a la acción de esterasas. El formiato producido parece ser el responsable de la actividad frente a insectos, provocando la inhibición del citocromo C oxidasa y, por tanto, reduciendo el aporte energético celular, provocando finalmente la muerte (Haritos and Dojchinov 2003). Este efecto se observa exclusivamente cuando el formiato se produce a pHs bajos, ya que a pHs neutros el ácido fórmico se encuentra disociado y no presenta actividad frente a la citocromo C oxidasa (Haritos and Dojchinov 2003).

La tolerancia de los organismos al formiato es variable. En mamíferos se ha demostrado que el formiato puede oxidarse hasta CO₂ y H₂O mediante la acción de las 10 formil tetrahidrofolato deshidrogenasas, además de que puede ser excretado o incluso incorporado al metabolismo proteico o lipídico. Los roedores, por ejemplo, muestran un elevado metabolismo del formiato que los hacen bastante resistentes a su toxicidad (Eells et al. 1982; Wallace et al. 1997), sin embargo, los insectos han mostrado presentar niveles más bajos de tolerancia al formiato (Haritos and Dojchinov 2003).

En los resultados obtenidos en nuestros bioensayos, fue patente el efecto tóxico del formiato sobre las larvas de *C. capitata*. Cuando la dieta fue mezclada con formiato de amonio a una concentración 100 mM, se observó un claro retraso en el desarrollo de las larvas, aunque a esa concentración no se registró una mortalidad relevante.

La inclusión de la enzima oxalato descarboxilasa en la dieta de larvas para ver su relación con la toxicidad siguió el siguiente razonamiento: si se aumenta la concentración del potencial factor de virulencia, debe aumentar la mortalidad del insecto. Desafortunadamente, la inclusión de la enzima en la dieta artificial en presencia o en ausencia de oxalato, no produjo mortalidad relevante, ni cuando se utilizó la enzima nativa ni cuando se usó la enzima recombinante. La adición de oxalato, sustrato de la enzima, a un cultivo esporulado de *B. pumilus* 15.1 bioensayado en condiciones subletales, tampoco pareció modificar su toxicidad con respecto al cultivo control. Estos

resultados indicaron que no tenemos evidencia por el momento para relacionar la actividad de la enzima con la toxicidad de larvas, al menos en las condiciones ensayadas. No se descarta que otras condiciones de bioensayo quizás rindan otros resultados y se pueda demostrar la relación de la enzima con la toxicidad. Así, por ejemplo, dado que describimos con anterioridad que era necesario el cultivo completo de *B. pumilus* 15.1 para observar toxicidad frente a las larvas, nos planteamos en un futuro cercano bioensayar el cultivo de *B. pumilus* 15.1 en condiciones subletales y suministrar la enzima oxalato descarboxilasa solubilizada, para determinar si existe un aumento de la mortalidad. Otra alternativa programada es analizar los sobrenadantes de un cultivo de *B. pumilus* 15.1 para evaluar qué moléculas puede estar excretando la bacteria que pudieran actuar conjuntamente con la enzima oxalato descarboxilasa en el mecanismo de patogénesis.

En la actualidad carecemos de mucha información básica sobre la enzima. No sabemos las condiciones de sustrato, Tª o fuerza iónica óptimas, no conocemos la dependencia de la actividad de la enzima con el pH y si la enzima puede ser activa al pH de la dieta de la larva o la del intestino, ni conocemos si la enzima actúa en conjunción con otros factores que pudieran estar en el sobrenadante de los cultivos de *B. pumilus* 15.1 como ocurre en otros casos (Liu et al. 1998; Ruiu et al. 2015) o como indican resultados anteriores (Molina et al. 2010). Por esta razón seguiremos con el trabajo de esta enzima y su caracterización en un futuro próximo.

5.2. Evaluación de la influencia de la Enolasa y GroEL en la virulencia de *B. pumilus* 15.1

El análisis del genoma de *B. pumilus* 15.1 realizado en nuestro grupo de investigación ha permitido identificar ciertas proteínas que podrían estar relacionadas con la actividad de la bacteria frente a las larvas de *C. capitata*, tal y como se ha demostrado en otras bacterias entompatógenas. La presencia por ejemplo de una quitinasa en el genoma de *B. pumilus* 15.1, podría indicar la capacidad de esta bacteria con la degradación de la matriz peritrófica de las larvas, facilitando el acceso de esta bacteria o de otros factores de virulencia a través del intestino del insecto (García-González and Genersch 2013; Hernández-Santana et al. 2016; Singh et al. 2016).

La presencia de citolisinas y metaloproteasas en el genoma de *B. pumilus* 15.1 podría estar relacionada con la capacidad de degradación de los tejidos del insecto, o permitir la evasión del sistema inmune como ocurre con la metaloproteasa serralisina de *S. marcenscens* (Duchaud 2003 Vodovar 2006 Ishii 2014b).

Aunque en el genoma de *B. pumilus* 15.1 no se identificó ningún gen homólogo a los genes que codifican las principales toxinas entomopatógenas conocidas (Cry, Cyt, Bin) sí que se identificaron genes homólogos a proteínas que en algunas bacterias poseen un efecto tóxico a determinados insectos. De todo el conjunto de genes identificados, se seleccionaron las dos más prometedoras (GroEL y Enolasa) para su estudio en detalle, que consistió en la expresión heteróloga e inclusión de las proteínas recombinantes en la dieta de larvas.

La clonación de los genes *groEL y eno* en vectores de expresión permitió la producción en gran cantidad de las proteínas Enolasa y GroEL necesaria para realizar bioensayos. Ambas proteínas recombinantes se localizaron en la fracción citosólica de la bacteria y se expresaron como enzimas solubles. Este hecho facilitó en gran medida su aislamiento y purificación, al no encontrarse formando cuerpos de inclusión, y evitando el uso de agentes caotrópicos como la urea o la guanidina, detergentes, como el SDS o el lauroil sarcosinato de sodio (sarkosyl), o el uso de pHs extremos, que son prácticas habituales para tratar de solubilizar las proteínas que forman los cuerpos de inclusión (Burgess 1996; Jevševar et al. 2005; Singh and Panda 2005).

La solubilización de los cuerpos de inclusión puede llegar a ser compleja y siempre conlleva el riesgo de que un porcentaje de proteína no sea capaz de recuperar la funcionalidad (Arakawa and Tsumoto 2003; Vallejo and Rinas 2004; Eiberle and Jungbauer 2010).

El hecho de que tanto la enzima Enolasa como la proteína GroEL se encontraran de forma soluble, podría indicar que la expresión heteróloga en *E. coli* fue adecuada y que la bacteria pudo realizar un correcto plegamiento de las mismas.

El análisis de la secuencia del gen *groEL* clonado reveló una modificación en el nucleótido 397 con respecto al gen original, lo que supuso una mutación en la proteína en el residuo 133 (Val 133 Ile). Aunque este cambio es conservativo, ya que ambos aminoácidos presentan cadenas laterales no polares, y tamaños muy similares, la modificación podría afectar a la actividad de esta proteína. Para evaluar esta posibilidad, se llevó a cabo una revisión bibliográfica de la estructura y función de los residuos tanto de la proteína GroEL de *E. coli* como de los homólogos con actividad entomopatógena en las bacterias *E. aerogenes* (Yoshida et al. 2001) y *X. nematophila* (Joshi et al. 2008).

El estudio de la estructura de GroEL de *E. coli* ha permitido saber que los residuos Leu 234, Leu 237 y Val 264 son los que interaccionan con la proteína GroES, mientras que los residuos que forman parte de las hélices H (234-243) e I (257-268) son necesarios para la unión a su sustrato polipéptidico. En otras palabras, estos residuos son

imprescindibles para que la proteína GroEL lleve a cabo su función de chaperona (Xu et al. 1997).

Sin embargo, la actividad entomopatógena identificada en los homólogos a GroEL parece residir en otros aminoácidos. Así, la Val 100, el Asn 101, el Asp 338 y la Ala 471 son los residuos esenciales para la acción tóxica en *E. aerogenes* (Yoshida et al. 2001), mientras que la actividad entomopatógena de la chaperona GroEL en *X. nematophila*, ha sido asociada a los residuos Tyr 219, Ser 244, Asn 297, Thr 347 y Ser 356 de la superficie externa de la región apical (Joshi et al. 2008). Tanto en *E. aerogenes*, como en *X. nematophila*, los residuos indispensables para la toxicidad de estas proteínas son diferentes a los necesarios para llevar a cabo la actividad chaperona.

Por lo tanto, la mutación Val 133 lle presente en la proteína GroEL recombinante de *B. pumilus* 15.1 parece no desempeñar a priori ningún papel relevante. El residuo 133 es el último aminoácido que conforma la hélice E de la estructura de GroEL, y no está relacionado con que la proteína mantenga su función ni como chaperona molecular, ni como factor de virulencia (Xu et al. 1997; Yoshida et al. 2001; Joshi et al. 2008).

Se ha sugerido en la bibliografía que la actividad entomopatogénica de GroEL está relacionada con la capacidad que tiene esta proteína de unirse a la quitina. GroEL no parece presentar ninguna acción catalítica, pero se ha propuesto que al unirse a la quitina de la membrana peritrófica evita el buen mantenimiento de la misma, afectando al desarrollo de los insectos (Joshi et al. 2008). Teniendo en cuenta este mecanismo, nos pareció lógico evaluar si la proteína GroEL de *B. pumilus* 15.1 poseía algún efecto sobre las larvas de *C. capitata* cuando se incluía en un ensayo de contaminación de la dieta. Desafortunadamente, no se observó ninguna diferencia de mortalidad con respecto al control negativo ni se observó ningún retraso en el desarrollo de las larvas de *C. capitata*, por lo que en la actualidad no podemos relacionar la proteína GroEL de *B. pumilus* 15.1 con la virulencia de la cepa.

En el caso de los bioensayos realizados con la enzima Enolasa, pese a observarse un porcentaje de mortalidad superior al observado con GroEL, este fue muy similar al control negativo realizado con tampón PBS, por lo que aparentemente esta proteína tampoco presentó un efecto frente a las larvas de *C. capitata* (Figura 44).

La Enolasa es una enzima citosólica que participa en la ruta de la glucólisis y la gluconeogénesis catalizando la conversión del 2-fosfoglicerato hasta fosfoenolpiruvato, siendo esta es su principal función cuando se encuentra en el citosol bacteriano (Wold and Ballou 1957). Sin embargo, al igual que GroEL, las Enolasas que han demostrado ser factores de virulencia en determinados organismos realizan su función patogénica fuera de la célula, por lo que la proteína debe excretarse o exportarse al exterior y quedar

asociada a la membrana celular o libre en el medio extracelular. Las Enolasas que son factores de virulencia presentan actividad proteasea y capacidad de unión al plasminógeno (Miles et al. 1991; Nakajima et al. 1994) La capacidad de unión al plasminógeno ha sido observada tanto en Enolasas procedentes de bacterias patógenas de insectos (Agarwal et al. 2008; Antúnez et al. 2010; Antúnez et al. 2011) como en Enolasas patógenas de células eucariotas (Bergmann et al. 2001; Whiting et al. 2002; Jolodar et al. 2003; Esgleas et al. 2008).

El mecanismo de acción de las Enolasas que participan en la patogenicidad bacteriana sobre células eucariotas está relacionada con la actividad proteolítica que presenta y su capacidad de activación de la plasmina, que con su actividad proteasa favorece la degradación de varias moléculas de la matriz extracelular para llevar a cabo la colonización e invasión de los tejidos (Lottenberg et al. 1994; Eberhard et al. 1999; Bergmann et al. 2001). La activación del plasminógeno en bacterias patógenas de mamíferos se inicia por la capacidad que presenta la Enolasa de unirse a este zimógeno y de activarlo mediante su procesamiento proteolítico, dando lugar a la plasmina. La enzima queda anclada a la superficie de la bacteria y la actividad proteasa que presenta es utilizada por la misma para llevar a cabo la degradación de tejido y la invasión de estos. La unión al plasminógeno por la Enolasa presente en la membrana bacteriana y su activación hasta plasmina, dota a la superficie bacteriana de una fuerte actividad proteolítica que ayuda a esta a la invasión de tejidos del huésped (Bergmann et al. 2001; Agarwal et al. 2008; Esgleas et al. 2008).

Este sistema plasmina/plasminógeno solo ha sido identificado en mamíferos y se desconoce su existencia en insectos, aunque se piensa que estos podrían presentar un sistema similar ya que se han descrito proteasas similares a la plasmina en algunos insectos (Hahn et al. 2001; Choo et al. 2010). En la bibliografía se desconoce si *C. capitata* o el orden Díptera presenta un sistema similar.

El estudio de las Enolasas ha demostrado como estas proteínas carecen de una secuencia señal de transporte conocida (Agarwal et al. 2008), al igual que ocurre con la Enolasa de B. pumilus 15.1. En estos casos, la enzima debe ser trasnportada hacia el exterior mediante algún sistema de transporte aún no conocido.

La enzima Enolasa de *B. pumilus* 15.1 no mostró actividad proteasa en ensayos realizados en placas suplementadas con caseína o leche (datos no mostrados), por lo que no se le ha podido demostrar ninguna actividad proteolítica. Sin embargo, estos resultados son muy preliminares y no puede descartarse que la Enolasa de *B. pumilus* tenga dicha actividad. El trabajo con esta enzima continuará por esta línea e intentaremos en un futuro cercano evaluar la capacidad proteolítica de la Enolasa de *B.*

pumilus 15.1 mediante otras metodologías, especialmente usando el plasminógeno como sustrato, para evaluar la capacidad de la Enolasa de su activación hasta plasmina.

5.3. Estudio de la región con alto contenido en genes homólogos a fagos y evaluación de su relación con la virulencia de *B. pumilus* 15.1

La identificación de elementos similares a bacteriófagos (o fagos) llevado a cabo durante el análisis del genoma de la cepa enomopatógena B. *pumilus* 15.1 no representó una gran sorpresa. Se estima que en todo genoma bacteriano existe al menos un fago lisogénico, aunque en muchas ocasiones el número de fagos lisogénicos es superior (Hayashi et al. 2001; Ohnishi et al. 2001). Los fagos son las entidades biológicas más abundantes en el planeta (Suttle 2005; Grose and Casjens 2014) y están considerados como uno de los principales agentes moldeadores de los genomas bacterianos, teniendo una importante participación en la transferencia horizontal de genes entre bacterias (Casjens et al. 2005; Kwan et al. 2005; Grose and Casjens 2014).

El genoma viral incorporado al material genético de la bacteria en ocasiones presenta genes que provocan la modificación de la bacteria huésped, a menudo mediante la adquisición de nuevas funciones, resistencias o capacidad patógena, como ocurre por ejemplo con la toxina del cólera (Waldor and Mekalanos 1996) y las toxinas Shiga de enterobacterias (Perna et al. 1998) (T**abla 30**). El proceso por el cual las bacterias adquieren estas nuevas capacidades se conoce como conversión lisogénica, y viene determinada por la presencia de genes específicos codificados por el bacteriófago (Brüssow et al. 2004; Skurnik and Strauch 2006; Karthik et al. 2014). Algunos elementos similares a fagos también están relacionados con actividades entomopatógenas (Hurst et al. 2007a; Wang et al. 2022) por lo que el estudio de esta región del genoma de *B. pumilus* 15.1 se estimó conveniente.

Aunque el análisis inicial del cóntigo 59 del genoma de *B. pumilus* 15.1 predijo la existencia de un bacteriófago lisogénico, el análisis en detalle de esta región, junto con las pruebas experimentales que obtuvimos, permitieron determinar que en realidad la bacteria tiene dos clústeres relacionados con fagos. Uno de ellos, codificado por la región de 60.2 Kb (región 2), parece ser un fago verdadero, Bp15.1Hope, nunca descrito en *B. pumilus* ni en bacterias relacionadas. El otro elemento, codificado por una región de 28.7 Kb (región 1), parece corresponder a una partícula similar a un fago (fago defectivo), Bp15.1PLP, común en bacterias del grupo de *B. pumilus*.

Protein	Gene	Phage	Bacterial host
Extracellular toxins			
Diphtheria toxin	tox	β-Phage	C. diphtheriae
Neurotoxin	C1	Phage C1	C. botulinum
Shiga toxins	stx1, stx2	H-19B	E. coli
Enterohaemolysin	hly2	φFC3208	E. coli
Cytotoxin	ctx	ϕCTX	P. aeruginosa
Enterotoxin	see, sel	NA	S. aureus
Enterotoxin P	sep	φN315	S. aureus
Enterotoxin A	entA	ф13	S. aureus
Enterotoxin A	sea	φMu50A	S. aureus
Exfoliative toxin A	eta	\$ETA	S. aureus
Toxin type A	speA	T12	S. pyogenes
Toxin type C	speC	CS112	S. pyogenes
Cholera toxin	ctxAB	СТХф	V. cholerae
Leukocidin	pvl	fPVL	S. aureus
Superantigens	speA1, speA3, speC, speI, speH, speM, speL, speK, ssa	8232.1	S. pyogenes
Cytolethal distending toxin	cdt	Unnamed	E. coli
Proteins altering antigenicity			
Membrane proteins	Mu-like	Pnm1	N. meningitidis
Glucosylation	rfb	÷-3	S. enterica
Glucosylation	gtr	P22	S. enterica
O-antigen acetylase	oac	Sf6	S. flexneri
Glucosyl transferase	gtrII	SfII, SfV, SfX	S. flexneri
Effector proteins involved in invasion			
Type III effector	sonE	SonEΦ	S. enterica
Type III effector	ssel (gtaR)	GIESY-2	S enterica
Type III effector	sspH1	GIFSY-3	S. enterica
Fnzvmes			
Superovide dismutase	sodC	Sn4 10	E coli O157
Superovide dismutase	sodC-I	GIESY-2	S enterica
Superovide dismutase	sodC-III	Fels-1	S. enterica
Neuraminidase	nanH	Fels-1	S. enterica
Hyaluropidase	hulP	H4480A	S mogenes
Leukocidin	nyl	APVI	S. pyogenes
Stanbylokinasa	sak	413	S. aureus
Phospholipase	suc	315 4	S. uureus
DNasa/strontodornaso	sta sda sda	215.6 9222.5	S. pyogenes
Divase/streptodomase	san, saa	515.0, 6252.5	S. pyogenes
Serum resistance			
OMP ^b	bor	λ	E. coli
OMP	eib	λ-like	E. coli
Adhesions for bacterial host attachment			
Vir	vir	MAV1	M arthritidis
Phage cost proteins	ph/4 ph/B	SM1	S mitis
r nage coar protents	pour, pour	51411	D. mails
Others			
Mitogenic factors	mf2, mf3, mf4	370.1, 370.3, 315.3	S. pyogenes
Mitogenic factor	toxA	Unnamed	P. multocida
Mitogenic factor	Unnamed	phise 1	S. canis
Virulence	gtgE	GIFSY-2	S. enterica
Antivirulence	grvA	GIFSY-2, Fels-1	S. enterica

Tabla 30. Factores de virulencia codificados por bacteriófagos. Tomada de Brüssow et al., 2004.

^{*a*} Updated from reference 26 with permission. ^{*b*} OMP, outer membrane protein.

Ambas regiones, que se encuentran muy cercanas entre sí en el genoma de B. pumilus 15.1, presentaron una organización típica de los fagos caudados, donde i) la mayoría de genes se encuentran transcritos en la misma dirección, aunque pequeños clústeres de genes pueden ser transcritos en la dirección contraria ii) los genes se encuentran asociados generalmente en módulos discretos basándose en su función, (replicación del ADN, integración, empaquetado del material genético, proteínas de la cabeza, proteínas de la cola y lisis) y iii) los genes relacionados con la integración son casi siempre transcritos en dirección opuesta a la mayoría de genes estructurales (Kwan et al. 2005).

La comparación global de la región 1 (28.7 Kb) con regiones homólogas existentes en el genoma de otras bacterias mostraron una alta sintenia e identidad en la mayoría de los ORFs presentes (Figuras 49 y 50). Esto indicó que la producción de partículas similares a la partícula Bp151PLP potencialmente debe estar muy extendida. La identidad disminuyó drásticamente en aquellos ORFs que codifican proteínas de las fibras de la cola, estructuras relacionadas con el reconocimiento específico de receptores presentes en las bacterias susceptibles. Este hecho puede indicar que potencialmente que cada PLP producido puede tener la capacidad de reconocer a receptores específicos de las bacterias diana, tal y como ocurre en fagos(São-José et al. 2004; Dunne et al. 2018). La especificidad de los PLPs inferida en los estudios bioinformáticos, se encuentra respaldada experimentalmente por los resultados obtenidos (Figuras 73, 74, 75 y 82) donde cada PLP reconoce específicamente a unas cepas y no otras. Los genes encargados de producción de fibras están sujetos a modificaciones frecuentes, así como a transferencia horizontal entre fagos relacionados. Estas modificaciones dan lugar a proteínas quiméricas que presentan variaciones en el reconocimiento de los receptores específicos, con la posibilidad de un cambio en la especificidad de su huésped (Drexler et al. 1989; Tétart et al. 1996; Tétart et al. 1998; Trojet et al. 2011).

La comparación de la región 2 (60.2 Kb) con las regiones homólogas presentes en bacterias relacionadas con *B. pumilus*, aunque menos abundantes, mostraron una elevada sintenia, al igual que la región 1 (**Figura 52** y **53**). En la región 2, los ORFs similares a proteínas estructurales de bacteriófagos fueron los más conservados, mientras que se observó algo más de variabilidad en la región 5', compuesta por los ORFs con funciones reguladoras. En esta región también existieron ORFs, con posibles funciones como metilasas y endonucleasas, que no están presentes en la secuencia de *B. pumilus* 15.1.

A menudo las bacterias presentan sistemas de modificación y restricción que las protegen de la infección de fagos y elementos genéticos móviles. Gracias a la modificación del genoma bacteriano mediante metilación se puede diferenciar el ADN propio del exógeno, que será degradado por los sistemas de restricción bacterianos (Smith 1979; Pingoud and Jeltsch 2001; Pingoud et al. 2014)

La presencia de estos ORFs podría estar relacionada con la adquisición de sistemas de metilación por parte del fago para proteger su genoma de la acción de los sistemas de restricción de la bacteria huésped tal y como ocurre en otros casos previamente documentados (Hattman et al. 1985; Drozdz et al. 2012; Flodman et al. 2020). Otro de los sistemas empleados por los fagos para evitar estos sistemas de restricción es la codificación de proteínas anti-restricción como la proteína 0.3 del fago T7 o la proteína Ocr (Bandyopadhyayt et al. 1985; Dryden 2006; McMahon et al. 2009) sin embargo,

ninguno de estos sistemas se ha encontrado en la región codificante del bacteriófago Bp15.1Hope.

Los fagos presentan dos estrategias para llevar a cabo su replicación y mantenimiento, un ciclo lítico, por el cual el material genético del virus, una vez en el interior de la bacteria huésped se replica a costa de la lisis de la bacteria huésped y un ciclo lisogénico, en el cual el material genético del virus es integrado y mantenido en el genoma bacteriano y su replicación se produce asociado al de la bacteria. Los virus lisogénicos son capaces de inducir su ciclo lítico en presencia de condiciones desfavorables para la bacteria, produciendo la lisis bacteriana y liberando nuevas partículas víricas con el objeto de encontrar nuevos hospedadores (Wilcox and Fuhrman 1994; Casjens 2003; Gillis and Mahillon 2014; Hobbs and Abedon 2016).

El descenso de la densidad óptica de un cultivo de *B. pumilus* 15.1 tanto en condiciones de restricción de oxígeno como en presencia de Mitomicina C, fue concomitante con la observación de Bp15.1PLP (y Bp15.1Hope) en los sobrenadantes. Ambos escenarios corresponden con una situación de estrés para la célula, que desemboca en la inducción del ciclo lítico de los profagos y la multiplicación de estos. El proceso de inducción es regulado por el sistema SOS bacteriano tal y como ocurre en otros bacteriófagos lisogénicos (Sprizhitsky and Kopylov 1983; Lamont et al. 1989). Este sistema, asociado a la producción de daño en el ADN bacteriano por un factor externo adverso, codifica una elaborada reacción que se extiende más allá de la reparación del ADN e influye en muchos otros procesos (Aertsen and Michiels 2006; Cohen et al. 2008).

La Mitomicina C es un compuesto natural, producido por *Streptomyces caespitosus*, utilizado para el tratamiento del cáncer. La Mitomicina C se une al ADN en las bases adyacentes a la guanina, en el surco menor del ADN y actúa como agente alquilante, bloqueando la división celular. Además, es capaz de provocar daños en el ADN debido a la formación de radicales libres de oxígeno, por lo que el tratamiento con Mitomicina C induce la activación de la respuesta SOS, mediada por RecA y LexA en bacterias (Khil and Camerini-Otero 2002; Cohen et al. 2008) y ha sido ampliamente utilizado como agente inductor del ciclo lítico de fagos lisogénicos (Otsuji et al. 1959; Altenbern and Stull 1965; Payet and Suttle 2013).

El sistema se inicia por la acumulación de ADN de cadena sencilla, debido al daño producido en este. El proceso se encuentra regulado por las proteínas LexA (represor transcripcional) y RecA, que actúa como molécula sensora del ADN de cadena simple y estimula la degradación de LexA en condiciones de daño al ADN (Calsou et al. 1987; DiCapua et al. 1992; Patel et al. 2010). La proteína RecA también actúa como coproteasa en la degradación de los represores de la transcripción de los genes de fagos,

siendo la disminución de la concentración de estos la responsable de la entrada del fago en el ciclo lítico (Walker 1984; Maslowska et al. 2019).

Tanto la partícula codificada por la región de 28.7 Kb como la codificada por la región de 60.2 Kb, son inducidos por la Mitomicina C (**Figuras 62** y **72**), así que no es arriesgado decir que ambas partículas, Bp15.1PLP y Bp15.1Hope, siguen este mecanismo de activación.

Proponemos que la producción de moléculas de ADN de cadena simple en presencia de Mitomicina C posiblemente active a RecA, cuya acción proteasa lleva a cabo la degradación del represor Xre, el represor de tipo Helix-Turn-Helix codificado por el ORF 1 de la región de 28.7 Kb identificada en *B. pumilus*. Aunque no está demostrado experimentalmente, este regulador transcripcional es potencialmente responsable del mantenimiento de la lisogenia de la partícula vírica, dada su similitud con el represor de la partícula PBSX de B. subtilis (Wood et al. 1990b; Mcdonnell et al. 1994). La degradación de este represor (único gen del clúster de genes de expresión temprana) conllevaría el inicio de la transcripción de las proteínas reguladoras y estructurales, estas últimas posiblemente transcritas a partir de un único promotor denominado PL (de <u>L</u>ate Promoter) tal y como está descrito en la bibliografía (Mcdonnell et al. 1994). Este promotor se encuentra regulado por el ORF7 en el profago PBSX, el cual codifica un factor sigma esencial para la transcripción de los genes tardíos (Wood et al. 1990b). La región de 60.2 Kb también posee ORFs homólogos a los represores Xre. Los ORFs 53 y 54, potencialmente transcriben de forma reversa dos homólogos Xre y la ORF 90 en la cadena directa, por lo que la inducción de la producción de partículas de Bp15.1Hope también podría explicarse por la presencia de Mitomicina C en el medio. Por supuesto esto son únicamente especulaciones que serán probadas experimentalmente en trabajos futuros.

A Actualmente, la clasificación de los bacteriofagos se lleva a cabo siguiendo principalmente dos criterios, i) su morfología y ii) la naturaleza de su material genético (Bradley 1967; Ackermann 2011). El orden Caudoviral, el más abundante de todos, al que pertenecen más del 95% de todos los fagos estudiados, está compuesto por aquellos bacteriófagos que presentan cola. Una de las características principales de los fagos del orden Caudoviral es que presentan en el interior de sus cápsides ADN de cadena doble y carecen de envuelta (Ackermann 2007). La familia Myoviridae, engloba a aquellos fagos que presentan colas contráctiles y la familia Siphoviridae engloba a aquellos con colas no contráctiles (Ackermann 2011). De acuerdo con esta clasificación, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta tesis, podemos afirmar que el fago Bp15.1Hope, producido por *B. pumilus* 15.1 pertenece al orden Caudoviral, familia Siphoviridae y la partícula Bp15.1PLP, aunque no se trata de un fago propiamente dicho, presenta características similares a los fagos del orden Caudoviral, familia Myoviridae.

La observación morfológica más relevante realizada sobre la partícula Bp15.1PLP, aparte del pequeño tamaño de la cápside, fue que poseía dos conformaciones muy distintas, una relajada o extendida y otra contraída. Aparte de las diferencias en el tamaño de estas partículas en una u otra conformación, se observó un hecho curioso que fue que el patrón de estriación observado en la cola de la partícula fue completamente diferente. Así, las formas extendidas mostraron colas con una estriación transversal, mientras que las formas contraídas presentaron colas con una estriación longitudinal (Figura 62). Esta observación pareció indicar que el cambio conformacional experimentado por la partícula Bp15.1PLP, fue concomitante con una reorganización de las proteínas de la cola. Este fenómeno parece similar al observado en el fago T4 de E. coli, donde se ha demostrado que la unión de las fibras de la cola al receptor del fago produce un cambio conformacional en la placa basal, que es el responsable de desencadenar la contracción de la cola mediante el cambio conformacional de las proteínas de la envuelta (Simon and Anderson 1967a; Simon and Anderson 1967b; Hu et al. 2015) y provocar la inyección del ADN del fago en la célula huésped. Por el momento esto no está demostrado para la partícula Bp15.1PLP, pero de estarlo tendría una implicación muy importante, que es las partículas similares a Bp15.1PLP podrían tener la habilidad de introducir ADN en las células. Por supuesto, esto se encuentra ahora mismo en el área de la especulación, pero queremos poner de manifiesto que forma parte de nuestros planes evaluar este posible mecanismo en un futuro próximo.

El análisis del contenido de ADN en las cápsides de la partícula Bp15.1PLP mostró la capacidad de estas partículas de empaquetar generalizadamente ADN procedente del genoma bacteriano en pequeños fragmentos de aproximadamente 9 Kb (**Figura 67**). Este comportamiento está también descrito en la partícula PBSX de *B. subtilis,* la cual presenta una gran similitud tanto morfológicamente, como en su organización genómica (Andersont and Bott 1985; Wood et al. 1990b; Krogh et al. 1996) Sin embargo, la diferencia fundamental es que PBSX empaqueta fragmentos de de aproximadamente 13 Kb (Andersont and Bott 1985; Wood et al. 1990a) en vez de 9 kb. El mismo hecho ha sido descrito en otras estructuras relacionadas filogenéticamente con fagos, los *Gene Transfer Agents* o GTAs, producidos por bacterias muy distantes al género *Bacillus*, pero que empaquetan también fragmentos al azar del genoma de su célula huésped y son capaces de transferirlo a bacterias filogenéticamente relacionadas (Lang et al. 2002; McDaniel et al. 2010).

El mecanismo mediante el cual el ADN bacteriano es introducido en la cápside de la partícula Bp15.1PLP es desconocido. Lo único que ha podido predecirse es que probablemente se realice mediante el mecanismo conocido como *Headfull*, tras el estudio filogenético realizado con la subunidad mayor de la terminasa presente en la región 1 de 28.7 Kb (**Figura 58**). Se ha descrito que la proximidad filogenética de la

subunidad mayor de las terminasas está correlacionada con el mecanismo de empaquetamiento del material genético que posee un fago, y por ello tienden a formar clados cuando se construyen árboles filogenéticos con sus secuencias (Casjens et al. 2005; Merrill et al. 2014) Lo mismo parece ser cierto para la terminasa de la partícula Bp15.1PLP, que i) quedó incluida dentro del clúster de terminasas con el sistema de empaquetamiento *Headfull*, representado por las terminasas de los fagos SPP1 y P22 y ii) quedó incluída dentro del mismo cluster que la partícula PBSX de *B. subtilis*. El mecanismo de empaquetamiento *Headfull* es potencialemente el más práctico si se pretende empaquetar ADN bacteriano aparentemente al azar tal y como ocurre en la partícula Bp15.1PLP y los GTAs.

Este sistema de empaquetamiento no es específico de secuencia y de todos los sistemas de empaquetado del ADN conocidos en los bacteriófagos representaría el más simple (Esterman et al. 2021). En este sistema, los segmentos de ADN son empaquetados de manera secuencial a partir de un precursor de concatémeros del ADN viral (Tavares et al. 1992; Black 2003). El empaquetado se inicia generalmente a partir de una secuencia específica (pac), la cual es reconocida por la subunidad grande de la terminasa, enzima que posee un dominio ATPasa y nucleasa. Esta enzima produce la hidrólisis de la molécula de ADN que es traslocado hacia el interior de la cápside gracias a la hidrólisis de ATP (Casjens 2011; Rao and Feiss 2015). En este mecanismo de empaquetado, el fin de la translocación está asociado a el momento en el que la cápside se llena, de ahí su nombre *Headfull*. Estos virus reales, habitualmente se empaqueta más del 100% del ADN que codifica para el virus, ya que la hidrólisis del ADN una vez llena la cápside, llevada a cabo por la subunidad mayor de la terminasa, no es específica de secuencia (Bhattacharyya and Rao 1994; Roy and Cingolani 2012).

La caracterización mediante huella peptídica de las proteínas más abundantes de las partículas obtenidas de los lisados bacterianos permitió la identificación de una partícula de fago diferente a la partícula mayoritaria Bp15.1PLP, al encontrar que al menos una de las bandas de las 15 observadas en las preparaciones proteicas estaba codificado por un ORF presente en la región 2 de 60.2 Kb. Esto permitió demostrar que la región 1 y la región 2, separadas por motivos prácticos y por tener diferente contenido en GCs, tenían orígenes muy diferentes y codificaban partículas distintas, no como había predicho en un principio PHASTER. En un principio se barajó la posibilidad de la partícula Bp15.1PLP estuviera codificada en varios loci del genoma, como ocurre en los GTAs. Los GTAs, mencionados anteriormente, son elementos con origen y organización similar a los fagos, capaces de llevar a cabo la transferencia de material genético entre bacterias de la misma especie y caracterizados porque presentan una organización genética en *multilocus* repartidos a lo largo del genoma bacteriano. Dichos *loci* presentan una regulación común, aunque aparentemente presentan orígenes evolutivos diferentes (Stanton et al. 2009; Hynes et al. 2016). La hipótesis de que la partícula Bp15.1PLP

estuviera formada gracias a la expresión de genes en diferentes *loci* se descartó por existir una explicación más sencilla: que la región de 98 Kb identificada por PHASTER codificara las proteínas necesarias para la producción de dos partículas diferentes. Esta hipótesis se demostró experimentalmente cuando se localizó mediante MET la partícula Bp15.1Hope, muy diferente morfológicamente a Bp15.1PLP.

Una de las características principales de los bacteriófagos es su especificidad. Los bacteriófagos son capaces de infectar una única especie bacteriana o especies muy relacionadas filogenéticamente. Esto es debido a que para que un fago lleve a cabo la infección se necesita del reconocimiento especifico de proteínas presentes en la célula huésped. En un primer paso se produce la adsorción de la partícula vírica a la superficie de la bacteria. Esta adsorción inicialmente reversible, se lleva a cabo gracias a la interacción de los receptores con las conocidas proteínas de unión a receptor (RBPs), las cuales se encuentran en los extremos de las proteínas de la espícula y las fibras de la cola (Schwartz 1975; Prehm et al. 1976; Montag et al. 1990; Leiman et al. 2010). Esta primera adsorción reversible sirve para facilitar el reconocimiento de un segundo receptor específico, cuyo reconocimiento provoca un cambio conformacional en la estructura de la placa basal, que provocan la unión irreversible de las fibras de la cola a la superficie bacteriana (Hu et al. 2015; Taylor et al. 2016). La reorganización de la placa basal provoca posteriormente la contracción de la cola (en los fagos con colas contráctiles), lo cual lleva a la inyección del material genético en el interior de la bacteria (Leiman et al. 2004; Taylor et al. 2016; Arnaud et al. 2017).

Algo similar parece ocurrir con aquellas bacteriocinas cuyo origen está relacionado evolutivamente con las colas de los bacteriófagos. Las bacteriocinas se unen específicamente a determinadas bacterias sobre las cuales realizan su acción lítica. Este por ejemplo es el caso las piocinas, bacteriocinas que presentan una estructura similar a colas de fago. Existen tres tipos de piocinas, tipo R, las cuales recuerdan a colas de fagos contráctiles, las piocinas tipo F, que recuerdan a colas no contráctiles y las piocinas tipo S que presentan una estructura similar a las colicinas (Nomura 1967; Kuroda and Kageyama 1981; Uratani and Hoshino 1984; Michel-Briand and Baysse 2002; Heo et al. 2007). Las piocinas son también inducibles mediante el sistema SOS bacteriano, al igual que la mayor parte de los fagos lisogénicos y además presentan un estrecho rango de acción, determinado por la especificidad de unión a receptores específicos presentes en la superficie de las bacterias(Matsui et al. 1993; Nakayama et al. 2000; Michel-Briand and Baysse 2002). La actividad bactericida de las piocinas tipo R es producida por la despolarización de la membrana debido a la formación de poros asociada a la contracción de la cola, tal y como ocurre en los fagos contráctiles (Uratani and Hoshino 1984; Strauch et al. 2001; Michel-Briand and Baysse 2002).

La actividad bacteriocina observada en las partículas Bp15.1PLP de *B. pumilus* 15.1 podría presentar un mecanismo similar al observado en las piocinas. Esta afirmación se encuentra apoyada por el hecho de que cada PLP obtenido de las diferentes cepas utilizadas en nuestro estudio tiene una especificidad distinta. Además, nuestros estudios de adhesión mostraron que estuvo muy correlacionado la actividad lítica de la partícula Bp15.1PLP con la capacidad de unión a una cepa en concreto (**Figura 78**). En otras palabras, aquellas células susceptibles a la acción bactericida de Bp15.1PLP mostraron afinidad por la partícula, mientras que aquellas células resistentes a la acción bactericida no mostraron afinidad por la partícula.

La afinidad existente entre la partícula Bp15.1PLP y las células susceptibles se demostró indirectamente en los estudios realizados sobre las bacterias aisladas de muestras del suelo. El hecho de que solo el 1.18% de las cepas aisladas fuera susceptible a la acción de Bp15.1PLP, indicó que la actividad bacteriocina es muy específica y que se produce únicamente cuando Bp15.1PLP es afín a proteínas de la superficie de la bacteria. Al identificar las bacterias susceptibles se demostró que la mayoría de las cepas estaban relacionadas filogenéticamente con B. pumilus 15.1. Sin embargo, encontramos la excepción de una bacteria susceptible, identificada como Paenibacillus, la cual no pertenece siguiera al mismo género que B. pumilus 15.1. Aunque la cepa Paenibacillus 1.1.4 fue susceptible a los lisados obtenidos con Mitomicina C y a las preparaciones concentradas con PEG, no se puede descartar la presencia de algún otro componente con actividad bactericida, diferente a Bp15.1PLP, en las preparaciones utilizadas. Tras un análisis del genoma de B. pumilus 15.1 con el software Bagel4 (http://bagel4.molgenrug.nl/), que identifica posibles regiones codificantes de bacteriocinas, se obtuvieron varios ORFs potenciales codificantes para bacteriocinas en los cóntigos 24 y 44. No se puede descartar, por tanto, que la actividad observada en Paenibacillus 1.1.4 esté producida por otra molécula diferente a Bp15.1PLP.

La identificación de las cepas susceptibles a Bp15.1PLP (cepas 1.1.1, 1.1.2 y 1.1.3) en este trabajo se realizó solo a nivel de grupo, ya que se llevaron a cabo mediante la comparación de las secuencias del gen 16S ARNr, gen que se encuentra muy conservado en las bacterias pertenecientes al grupo de *B. subtilis* (Roberts et al. 1994; Palmisano et al. 2001). La identificación de las especies del grupo de *B. subtilis* ha presentado grandes dificultades también cuando se utilizan parámetros clásicos como la morfología, debido a que las bacterias de este grupo son muy similares entre si(Fan et al. 2017).

Para llevar a cabo la clasificación de estas cepas a nivel de especie, se requerirían por tanto estudios bioquímicos o genéticos adicionales, sin embargo, estos estudios que quedan fuera del objetivo de esta tesis. Para llevar a cabo la clasificación dentro de este género se propone el uso de análisis *multilocus* de genes conservados, que permita

detectar y definir estas nuevas especies (Rooney et al. 2009). Esto será parte del trabajo futuro que se realizará dentro de esta línea de investigación.

Conclusiones

6. Conclusiones

De los resultados obtenidos en este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1. La enzima oxalato decarboxilasa, principal componente de los cristales paraesporales que la cepa *B. pumilus* 15.1 sintetiza durante la fase de esporulación, presenta actividad enzimática, siendo capaz de transformar el oxalato en formiato. Tanto la enzima nativa como la recombinante, mostraron dicha actividad, que fue muy baja comparada con otras actividades descritas en la bibliografía. Aunque la enzima oxalato descarboxilasa produjo formiato, un compuesto conocido por su actividad insecticida, la inclusión de la enzima en grandes cantidades en la dieta de larvas de *C. capitata* no provocó un aumento de mortalidad en las mismas.
- La enzima oxalato descarboxilasa recombinante se obtuvo en forma insoluble, formando cuerpos de inclusión, en un sistema de expresión heteróloga. La enzima recombinante retuvo la característica de la enzima nativa sintetizada por *B. pumilus* 15.1 de ser solubilizada cuando se incubó a baja temperatura (-20ºC) durante al menos 24 h.
- 3. La cepa *B. pumilus* 15.1 presenta en su genoma ORFs homólogos a las proteínas GroEL y Enolasa, que en algunas bacterias representan factores de virulencia frente insectos. Los genes responsables de la producción de estas proteínas se han clonado y sobreexpresado en un sistema heterólogo de forma muy eficiente. Las proteínas recombinantes se expresaron en forma soluble. La inclusión de estas dos proteínas en la dieta de bioensayos realizados con larvas de *C. capitata* no mostro una mortalidad relevante, por lo que en las condiciones ensayadas no se puede afirmar que GroEL y Enolasa de *B. pumilus* 15.1 representen un factor de virulencia para larvas de *C. capitata*.
- 4. El genoma de *B. pumilus* 15.1 presenta una región de 98.1 Kb con genes homólogos a genes de fagos. Esta región puede ser subdividida en dos regiones de origen distinto, una de 60.2 Kb, que produce un fago, llamado Bp15.1Hope, nunca descrito en *B. pumilus* y otra región de 28.7 Kb, que produce una partícula similar a fagos, llamada Bp15.1PLP.
- 5. La región de 28.7 Kb, posee una organización genómica similar al profago defectivo PBSX de *B. subtilis* y se encuentra muy conservada en las bacterias de este grupo. Morfológicamente la partícula Bp15.1PLP es muy similar a PBSX, pero

a diferencia de él, empaqueta ADN bacteriano de 9 Kb de tamaño en vez de 13 Kb. La partícula Bp15.1PLP, presenta una importante actividad bacteriocina frente a cepas relacionadas con el grupo de *B. pumilus*.

- 6. La región de 60.2 Kb se encuentra en muy pocos genomas (disponibles) de bacterias del grupo *B. pumilus*. El hecho de que esta región presente un contenido de CGs muy superior al del genoma de *B. pumilus* 15.1 y se encuentre flanqueada por secuencias cortas repetidas, indica que su origen es heterólogo y sea posiblemente una inserción en el genoma de *B. pumilus* 15.1. Dicha inserción se localiza en el interior de la secuencia del gen que codifica el ARNt-Ala, al igual que ocurre con otras regiones homólogas identificadas en otras bacterias, que ocupan los ARNts de otros aminoácidos como el ARNt-Val o ARNt-Arg.
- 7. La morfología de Bp15.1Hope observada mediante microscopía electrónica de transmisión permitió clasificar este nuevo fago como un fago caudado con cola contráctil (Familia Siphoviridae). La morfología de la partícula Bp15.1PLP recordó a un fago caudado, de cola contráctil similar a los de la familia Myoviridae.
Bibliografía

7. Bibliografía

- Abee T (1995) Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. FEMS Microbiol Lett 129:1–9. https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.1995.TB07548.X
- Aboussaid H, Vidal-Quist JC, Oufdou K, el Messoussi S, Castañera P, González-Cabrera J (2011) Occurrence, characterization and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from argan fields in Morocco. Environ Technol 32:1383–1391. https://doi.org/10.1080/09593330.2010.536789
- Ackermann HW (2007) 5500 Phages examined in the electron microscope. Arch Virol 152:227–243. https://doi.org/10.1007/s00705-006-0849-1
- Ackermann HW (2011) Bacteriophage taxonomy. Microbiol Aust 32:90–94. https://doi.org/10.1071/MA11090
- Aertsen A, Michiels CW (2006) Upstream of the SOS response: figure out the trigger. Trends Microbiol 14:421–423
- Agarwal S, Kulshreshtha P, Bambah Mukku D, Bhatnagar R (2008) α-Enolase binds to human plasminogen on the surface of *Bacillus anthracis*. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom 1784:986–994. https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2008.03.017
- Akhurst RJ (1982) Antibiotic activity of *Xenorhabdus spp.*, bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families *Heterorhabditidae* and *Steinernematidae*. Microbiology (N Y) 128:3061–3065. https://doi.org/10.1099/00221287-128-12-3061
- Akiba T, Okumura S (2017) Parasporins 1 and 2: Their structure and activity. J Invertebr Pathol 142:44–49. https://doi.org/10.1016/J.JIP.2016.10.005
- Alarcón A (2012) Efecto de la Temperatura y el pH sobre el Crecimiento y el perfil proteico de la cepa *Bacillus pumilus* 15.1. Universidad de Granada, Granada, España
- Albert A, Tiwari V, Paul E, Ganesan D, Ayyavu M, Kujur R, Ponnusamy S, Shanmugam K, Saso L, Govindan Sadasivam S (2017) Expression of heterologous oxalate decarboxylase in HEK293 cells confers protection against oxalate induced oxidative stress as a therapeutic approach for calcium oxalate stone disease. J Enzyme Inhib Med Chem 32:426–433. https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1256884
- Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2019) SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. Nature Biotechnology 2019 37:4 37:420–423. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z
- Altenbern R a, Stull HB (1965) Inducible lytic systems in the genus *Bacillus*. J Gen Microbiol 39:53–62. https://doi.org/10.1099/00221287-39-1-53
- Altschul SF, Wootton JC, Gertz EM, Agarwala R, Morgulis A, Schaffer AA, Yu Y-K (2005) Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. FEBS Journal 272:5101–5109. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04945.x

- Aly C, Mulla MS, Federici BA (1985) Sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in cadavers of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). J Invertebr Pathol 46:251–258. https://doi.org/10.1016/0022-2011(85)90066-7
- Anand R, Dorrestein PC, Kinsland C, Begley TP, Ealick SE (2002) Structure of oxalate decarboxylase from *Bacillus subtilis* at 1.75 Å resolution. Biochemistry 41:7659–7669. https://doi.org/10.1021/bi0200965
- Anbazhagan K, Sasikumar P, Gomathi S, Priya HP, Selvam GS (2013) *In vitro* degradation of oxalate by recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing heterologous oxalate decarboxylase. J Appl Microbiol 115:880–887. https://doi.org/10.1111/jam.12269
- Andersont LM, Bott KF (1985) DNA packaging by the *Bacillus subtilis* defective bacteriophage PBSX. J Virol 54:773–780
- Angus TA (1954) A bacterial toxin paralysing Silkworm larvae. Nature 1954 173:4403 173:545–546. https://doi.org/10.1038/173545a0
- Antúnez K, Anido M, Arredondo D, Evans JD, Zunino P (2011) Paenibacillus larvae enolase as a virulence factor in honeybee larvae infection. Vet Microbiol 147:83– 89. https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2010.06.004
- Antúnez K, Anido M, Evans JD, Zunino P (2010) Secreted and immunogenic proteins produced by the honeybee bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. Vet Microbiol 141:385–389. https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2009.09.006
- Arakawa T, Tsumoto K (2003) The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: Not facilitate refolding, but suppress aggregation. Biochem Biophys Res Commun 304:148–152. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00578-3
- Argov Y, Blanchet A, Gazit Y (2011) Biological control of the Mediterranean fruit fly in Israel: Biological parameters of imported parasitoid wasps. Biological Control 59:209–214. https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2011.07.009
- Arnaud CA, Effantin G, Vivès C, Engilberge S, Bacia M, Boulanger P, Girard E, Schoehn G, Breyton C (2017) Bacteriophage T5 tail tube structure suggests a trigger mechanism for Siphoviridae DNA ejection. Nat Commun 8:1–9. https://doi.org/10.1038/s41467-017-02049-3
- Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, Wishart DS (2016) PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. Nucleic Acids Res 44:W16–W21. https://doi.org/10.1093/nar/gkw387
- Aronson A, Beckman W, Dunn P (1986) *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol Rev 1–24
- Aronson AI, Han ES, McGaughey W, Johnson D (1991) The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. Appl Environ Microbiol 57:981. https://doi.org/10.1128/AEM.57.4.981-986.1991
- Atsumi S, Miyamoto K, Yamamoto K, Narukawa J, Kawai S, Sezutsu H, Kobayashi I, Uchino K, Tamura T, Mita K, Kadono-Okuda K, Wada S, Kanda K, Goldsmith MR,

Noda H (2012) Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*. Proceedings of the National Academy of Sciences 109:9674. https://doi.org/10.1073/pnas.1120698109

- Aunpad R, Na-Bangchang K (2007) Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and Anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. Curr Microbiol 55:308–313. https://doi.org/10.1007/S00284-006-0632-2/FIGURES/2
- Baeza-Larios G, Sivinski J, Holler T, Aluja M (2002) The ability of *Coptera haywardi* (Ogloblin) (Hymenoptera: Diapriidae) to locate and attack the pupae of the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), under seminatural conditions. Biological Control 23:213–218. https://doi.org/10.1006/bcon.2001.1010
- Bailly-Bechet M, Vergassola M, Rocha E (2007) Causes for the intriguing presence of tRNAs in phages. Genome Res 17:1486–1495. https://doi.org/10.1101/gr.6649807
- Bandyopadhyayt PK, Studier FW, Hamilton DL, Yuan R (1985) Inhibition of the type I restriction-modification enzymes EcoB and EcoK by the gene O-3 protein of bacteriophage T7. Mol Biol 182:567–578
- Banerjee J, Singh J, Mohan ‡, Joshi C, Ghosh S, Banerjee N (2006) The cytotoxic fimbrial structural subunit of *Xenorhabdus nematophila* is a pore-forming toxin. Journal of Bacteriology 188:7957–7962. https://doi.org/10.1128/JB.00787-06
- Baptista C, Santos MA, São-José C (2008) Phage SPP1 reversible adsorption to Bacillus subtilis cell wall teichoic acids accelerates virus recognition of membrane receptor YueB. J Bacteriol 190:4989–4996. https://doi.org/10.1128/JB.00349-08
- Barloy F, Delécluse A, Nicolas L, Lecadet MM (1996) Cloning and expression of the first anaerobic toxin gene from *Clostridium bifermentans* subsp. *malaysia*, encoding a new mosquitocidal protein with homologies to *Bacillus thuringiensis* deltaendotoxins. J Bacteriol 178:3099–3105. https://doi.org/10.1128/JB.178.11.3099-3105.1996
- Barloy F, Lecadet MM, Delécluse A (1998) Cloning and sequencing of three new putative toxin genes from *Clostridium bifermentans* CH18. Gene 211:293–299
- Barth H, Aktories K, Popoff MR, Stiles BG (2004) Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 68:373–402. https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.373-402.2004
- Baumann L, Broadwell AH, Baumann P (1988) Sequence analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding 51.4-and 41.9-kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. Journal of Bacteriology 170:2045–2050
- Becking JH (1961) Studies on nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia*: I. geographical and ecological distribution in soils. Plant Soil 14:49–81

- Bedini S, Muniz ER, Tani C, Conti B, Ruiu L (2020) Insecticidal potential of *Brevibacillus laterosporus* against dipteran pest species in a wide ecological range. J Invertebr Pathol 177:107493. https://doi.org/10.1016/J.JIP.2020.107493
- Beebee T, Korner A, Bond RPM, Pilkis S (1972) Differential inhibition of mammalian ribonucleic acid polymerases by an exotoxin from *Bacillus thuringiensis*.Biochemical Journal 127:619–624
- Belcaid M, Bergeron A, Poisson G (2011) The evolution of the tape measure protein: units, duplications and losses. BMC Bioinformatics 12:S10. https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-S9-S10
- Belousova ME, Malovichko Y v, Shikov AE, Nizhnikov AA, Antonets KS (2021) Dissecting the environmental consequences of *Bacillus thuringiensis* application for natural ecosystems †. Toxins (Basel). https://doi.org/10.3390/toxins13050355
- Lugtenberg B (2015) Principles of plant-microbe interactions. Springer International Publishing, Cham
- Bergmann S, Rohde M, Chhatwal GS, Hammerschmidt S (2001) α-Enolase of Streptococcus pneumoniae is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. Mol Microbiol 40:1273–1287. https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2001.02448.X
- Berliner E (1911) Uber die schalaffsucht der Mehlmottenraupe. Gesamte Getreidewes 252:3160–3162
- Berry C (2012) The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. J Invertebr Pathol 109:1–10. https://doi.org/10.1016/J.JIP.2011.11.008
- Bess HA, van den Bosch R, Haramoto FH (1961) Fruit fly parasites and their activities in Hawaii. Proceedings, Hawaiian Entomologycal Society 17
- Bhate DS (1955) Pumilin, a new antibiotic from *Bacillus pumilus*. Nature 1955 175:4462 175:816–817. https://doi.org/10.1038/175816a0
- Bhatnagar BS, Bogner RH, Pikal MJ (2007) Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. Pharm Dev Technol 12:505–523. https://doi.org/10.1080/10837450701481157
- Bhattacharyya SP, Rao VB (1994) Structural analysis of DNA cleaved in vivo by bacteriophage T4 terminase. Gene 146:67–72. https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90834-6
- Biessy A, Filion M (2018) Phenazines in plant-beneficial *Pseudomonas* spp.: biosynthesis, regulation, function and genomics. Environ Microbiol 20:3905–3917. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14395
- Bird AF, Akhurst RJ (1983) The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family *Steinernematidae*. International Journal of Parasitology 13:985
- Black LW (2003) DNA packaging in dsDNA bacteriophages. Annu Rev Microbiol 43:267–292. https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MI.43.100189.001411

Blundell-Hunter G, Tellier M, Chalmers R (2018) Transposase subunit architecture and its relationship to genome size and the rate of transposition in prokaryotes and eukaryotes. Nucleic Acids Res 46:9637–9646. https://doi.org/10.1093/nar/gky794

Bobay LM, Rocha EPC, Touchon M (2013) The adaptation of temperate bacteriophages to their host genomes. Mol Biol Evol 30:737–751. https://doi.org/10.1093/molbev/mss279

Boemare NE, Akhurst RJ, Mourant RG (1993) DNA relatedness between Xenorhabdus spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer Xenorhabdus luminescens to a new genus, Photorhabdus gen. nov. Int J Syst Bacteriol 43:249–255. https://doi.org/10.1099/00207713-43-2-249/CITE/REFWORKS

Boets A, Arnaut G, van Rie J, Damme N (2004) Toxins

- Bokonon-Ganta AH, Ramadan MM, Wang XG, Messing RH (2005) Biological performance and potential of *Fopius ceratitivorus* (Hymenoptera: Braconidae), an egg–larval parasitoid of tephritid fruit flies newly imported to Hawaii. Biological Control 33:238–247. https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2005.02.015
- Bolwerk A, Lagopodi AL, Wijfjes AHM, Lamers GEM, Chin-A-Woeng TFC, Lugtenberg BJJ, Bloemberg G v. (2007) Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. radicislycopersici. Molecular Plant-Microbe Interactions 16:983–993. https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.11.983
- Bönemann G, Pietrosiuk A, Mogk A (2010) Tubules and donuts: a type VI secretion storym mi_7171 815..821 The type VI secretion system: a novel player in the export game. Mol Microbiol. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07171.x
- Bottone EJ (1999) *Yersinia enterocolitica*: Overview and epidemiologic correlates. Microbes Infect 1:323–333. https://doi.org/10.1016/S1286-4579(99)80028-8
- Bowen D, Blackburn M, Rocheleau T, Grutzmacher C, Ffrench-Constant RH (2000) Secreted proteases from *Photorhabdus luminescens*: Separation of the extracellular proteases from the insecticidal Tc toxin complexes. Insect Biochem Mol Biol 30:69–74. https://doi.org/10.1016/S0965-1748(99)00098-3
- Bowen D, Rocheleau TA, Blackburn M, Andreev O, Golubeva E, Bhartia R, Ffrench-Constant RH (1998) Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. Science (1979) 280:2129–2132. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.280.5372.2129

Bradley DE (1967) Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. Bacteriol Rev

- Braun V, Krieger-Brauer HJ (1977) Interrelationship of the phage λ receptor protein and maltose transport in mutants of *Escherichia coli* K12. BBA Biomembranes 469:89–98. https://doi.org/10.1016/0005-2736(77)90328-5
- Bravo A, Gill SS, Soberón M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon 49:423–435. https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2006.11.022

- Bresolin G, Morgan JAW, Ilgen D, Scherer S, Fuchs TM (2006) Low temperature-induced insecticidal activity of *Yersinia enterocolitica*. Mol Microbiol 59:503–512. https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2005.04916.X
- Brillard J, Duchaud E, Boemare N, Kunst F, Givaudan A (2002) The PhIA hemolysin from the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* belongs to the twopartner secretion family of hemolysins. J Bacteriol 184:3871–3878. https://doi.org/10.1128/JB.184.14.3871-3878.2002
- Brillard J, Ribeiro C, Noe N, Boemare N, Lin MB, Givaudan A (2001) Two distinct hemolytic activities in *Xenorhabdus nematophila* are active against immunocompetent insect cells. Appl Environ Microbiol 67:2515–2525. https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2515-2525.2001
- Brown SE, Cao AT, Dobson P, Hines ER, Akhurst RJ, East PD (2006) Txp40, a ubiquitous insecticidal toxin protein from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria. Appl Environ Microbiol 72:1653. https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1653-1662.2006
- Brown SE, Cao AT, Hines ER, Akhurst RJ, East PD (2004) A novel secreted protein toxin from the insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. Journal of Biological Chemistry 279:14595–14601. https://doi.org/10.1074/jbc.M309859200
- Brüssow H, Canchaya C, Hardt W-D (2004) Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. Microbiol Mol Biol Rev 68:560–602, table of contents. https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.560-602.2004
- Bucher GE (1957) Disease of the larvae of tent caterpillars caused by a sporeforming bacterium. Can J Microbiol 3:695–709. https://doi.org/10.1139/M57-077
- Bucher GE (1961) Artificial culture of *Clostridium brevifaciens* n. sp. and *C. malacosomae* n. sp., the causes of brachytosis of tent caterpillars. Can J Microbiol 7:641–655. https://doi.org/10.1139/m61-073
- Bukin YS, Galachyants YP, Morozov I v., Bukin S v., Zakharenko AS, Zemskaya TI (2019) The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. Scientific Data 2019 6:1 6:1–14. https://doi.org/10.1038/sdata.2019.7
- Burgerjon A, Biache G, Cals P (1969) Teratology of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, as provoked by larval administration of the thermostable toxin of *Bacillus thuringiensis*. J Invertebr Pathol 14:274–278. https://doi.org/10.1016/0022-2011(69)90117-7
- Burgess RR (1996) [12] Purification of overproduced *Escherichia coli* RNA polymerase σ factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from Sarkosyl. Methods Enzymol 273:145–149. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(96)73014-8
- Burkholder PR, Giles NH (1947) Induced biochemical mutations in *Bacillus subtilis*. Am J Bot 34:345–348. https://doi.org/10.1002/J.1537-2197.1947.TB12999.X
- Butko P (2003) Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and
hypotheses.ApplEnvironMicrobiol69:2415–2422.https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2415-2422.2003

- Caldas C, Cherqui A, Pereira A, Simões N (2002) Purification and characterization of an extracellular protease from *Xenorhabdus nematophila* involved in insect immunosuppression. Appl Environ Microbiol 68:1297–1304. https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1297-1304.2002
- Calsou P, Villaverde A, Defais M (1987) Activated RecA protein may induce expression of a gene that is not controlled by the LexA repressor and whose function is required for mutagenesis and repair of UV-irradiated bacteriophage Lambda. J Bacteriol 169
- Canchaya C, Fournous G, Brüssow H (2004) The impact of prophages on bacterial chromosomes. Mol Microbiol 53:9–18. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04113.x
- Cao E, Chen Y, Cui Z, Foster PR (2003) Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. Biotechnol Bioeng 82:684–690. https://doi.org/10.1002/bit.10612
- Carey JR (1984) Host-specific demographic studies of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. Ecol Entomol 9:261–270. https://doi.org/10.1111/J.1365-2311.1984.TB00850.X
- Carozzi NB, Kramer VC, Warren GW, Evola S, Koziel MG (1991) Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. Appl Environ Microbiol 57:3057–3061
- Carpenter JF, Crowe JH (1988) The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. Cryobiology 25:244–255. https://doi.org/10.1016/0011-2240(88)90032-6
- Casjens S (2003) Prophages and bacterial genomics: What have we learned so far? Mol Microbiol 49:277–300. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03580.x
- Casjens SR (2011) The DNA-packaging nanomotor of tailed bacteriophages. Nat Rev Microbiol 9:647–657. https://doi.org/10.1038/nrmicro2632
- Casjens SR, Gilcrease EB, Winn-Stapley DA, Schicklmaier P, Schmieger H, Pedulla ML, Ford ME, Houtz JM, Hatfull GF, Hendrix RW (2005) The generalized transducing *Salmonella* bacteriophage ES18: Complete genome sequence and DNA packaging strategy. J Bacteriol 187:1091–1104. https://doi.org/10.1128/JB.187.3.1091-1104.2005
- Cass BN, Himler AG, Bondy EC, Bergen JE, Sierra ·, Fung K, Kelly SE, Hunter MS (2016) Conditional fitness benefits of the *Rickettsia* bacterial symbiont in an insect pest. Oecologia 180:169–179. https://doi.org/10.1007/s00442-015-3436-x
- Castagnola A, Stock SP (2014) Common virulence factors and tissue targets of entomopathogenic bacteria for biological control of *Lepidopteran* pests. Insects 5:139–166. https://doi.org/10.3390/INSECTS5010139
- Castro Tapia MP, Madariaga Burrows RP, Ruiz Sepúlveda B, Vargas Concha M, Vera Palma C, Moya-Elizondo EA (2020) Antagonistic activity of chilean strains of *Pseudomonas protegens* against fungi causing crown and root rot of wheat

(*Triticum aestivum* L.). Front Plant Sci 11:951. https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.00951/BIBTEX

- Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D (2007) A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. J Microbiol Methods 69:330. https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2007.02.005
- Chakroun M, Banyuls N, Bel Y, Escriche B, Ferré J (2016) Bacterial vegetative insecticidal proteins (Vip) from entomopathogenic bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews 80:329–350. https://doi.org/10.1128/MMBR.00060-15/FORMAT/EPUB
- Chang BS, Kendrick BS, Carpenter JF (1996) Surface-Induced Denaturation of Proteins during Freezing and its Inhibition by Surfactants. J Pharm Sci 85:1325–1330. https://doi.org/10.1021/js960080y
- Chang Jeong B, Hyun Han D, il Seo S, Soo Jeon S, Moo Lee H, Yong Choi H, Hyun Park Y, Hoe Kim H (2009) Yvrk gene recombinant *Escherichia coli* reduce the concentration of urine oxalate in transient hyperoxaluria rat model. J Urol 181:660. https://doi.org/10.1016/S0022-5347(09)61851-6
- Charles JF, Delécluse A, Nielsen-Le Roux C (2000) Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Springer Netherlands, Dordrecht
- Charles J-F, Nicolas L, Sebald M, de Barjac H (1990) Clostridium bifermentans serovar malaysia: Sporulation, biogenesis of inclusion bodies and larvicidal effect on mosquito. Res Microbiol 141:721–733. https://doi.org/10.1016/0923-2508(90)90066-Y
- Chaskopoulou A, Nguyen S, Pereira RM, Scharf ME, Koehler PG (2009) Toxicities of 31 volatile low molecular weight compounds against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus.* J Med Entomol 46:328–334. https://doi.org/10.1603/033.046.0218
- Chen J, Rashid T, Feng G (2012) Toxicity of formic acid to red imported fire ants, *Solenopsis invicta* Buren. Pest Manag Sci 68:1393–1399. https://doi.org/10.1002/PS.3319
- Chen J, Rashid T, Feng G, Zhao L, Oi D, Drees BBM (2013) Defensive chemicals of tawny crazy ants, *Nylanderia fulva* (Hymenoptera: Formicidae) and their toxicity to red imported fire ants, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). Toxicon 76:160–166. https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2013.09.018
- Chen XH, Koumoutsi A, Scholz R, Schneider K, Vater J, Süssmuth R, Piel J, Borriss R (2009)
 Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. J Biotechnol 140:27–37. https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2008.10.011
- Choo YM, Lee KS, Yoon HJ, Kim BY, Sohn MR, Roh JY, Je YH, Kim NJ, Kim I, Woo SD, Sohn HD, Jin BR (2010) Dual function of a bee venom serine protease: prophenoloxidaseactivating factor in Arthropods and fibrin(ogen)olytic enzyme in mammals. PLoS One 5:e10393. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0010393

- Christenson LD, Foote RH (1960) Biology of fruit flies. Annu Rev Entomol 5:171–192. https://doi.org/10.1146/annurev.en.05.010160.001131
- Cochrane SA, Vederas JC (2016) Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: A gold mine of antibiotic candidates. Med Res Rev 36:4–31. https://doi.org/10.1002/MED.21321
- Cohen SE, Foti JJ, Simmons LA, Walker GC (2008) The SOS regulatory network. EcoSal Plus 3. https://doi.org/10.1128/ecosalplus.5.4.3
- Conter C, Oppici E, Dindo M, Rossi L, Magnani M, Cellini B (2019) Biochemical properties and oxalate-degrading activity of oxalate decarboxylase from *Bacillus subtilis* at neutral pH. IUBMB Life 71:917. https://doi.org/10.1002/IUB.2027
- Cowles KN, Goodrich-Blair H (2004) Expression and activity of a *Xenorhabdus nematophila* haemolysin required for full virulence towards *Manduca sexta* insects. Cell Microbiol 7:209–219. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00448.x
- Crosland RD, Fitch RW, Hines HB (2005) Characterization of β-leptinotarsin-h and the effects of calcium flux antagonists on its activity. Toxicon 45:829–841. https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2004.12.022
- Daborn PJ, Waterfield N, Silva CP, Au CPY, Sharma S, Ffrench-Constant RH (2002) A single *Photorhabdus* gene, makes caterpillars floppy (mcf), allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. Proc Natl Acad Sci U S A 99:10742–10747. https://doi.org/10.1073/PNAS.102068099/ASSET/1FC1CEC4-240C-46EB-80A8-6F93594C022F/ASSETS/GRAPHIC/PQ1020680005.JPEG
- Damgaard PH, Abdel-Hameed A, Eilenberg J, Smits PH (1998) Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* on grass foliage. World J Microbiol Biotechnol 14:239–242
- Danhorn T, Fuqua C (2007) Biofilm formation by plant-associated bacteria. Annu Rev Microbiol 61:401–422. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093316
- DasGupta SM, Khan N, Nautiyal CS (2006) Biologic control ability of plant growth– promoting *Paenibacillus lentimorbus* NRRL B-30488 isolated from milk. Curr Microbiol 53:502–505. https://doi.org/10.1007/s00284-006-0261-9
- Dash HR, Mangwani N, Chakraborty J, Kumari S, Das S (2013) Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. Appl Microbiol Biotechnol 97:561–571. https://doi.org/10.1007/s00253-012-4584-0
- de Bortoli CP, Jurat-Fuentes JL (2019) Mechanisms of resistance to commercially relevant entomopathogenic bacteria. Curr Opin Insect Sci 33:56–62. https://doi.org/10.1016/J.COIS.2019.03.007
- de Maagd RA, Bravo A, Berry C, Crickmore N, Schnepf HE (2003) Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. Annu Rev Genet 37:409–433. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.143042
- de Oliveira EJ, Rabinovitch L, Monnerat RG, Passos LKJ, Zahner V (2004) Molecular characterization of *Brevibacillus laterosporus* and its potential use in biological

control. Appl Environ Microbiol 70:6657. https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6657-6664.2004

- de Vor L, Rooijakkers SHM, van Strijp JAG (2020) *Staphylococci* evade the innate immune response by disarming neutrophils and forming biofilms. FEBS Lett 594:2556–2569. https://doi.org/10.1002/1873-3468.13767
- de Weert S, Vermeiren H, Mulders IHM, Kuiper I, Hendrickx N, Bloemberg G v, Vanderleyden J, de Mot R, Lugtenberg BJJ (2002) Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. Molecular Plant-Microbe Interactions 15:1173–1180
- Dias BBA, Cunha WG, Morais LS, Vianna GR, Rech EL, Capdeville G, Aragao FJL (2006) Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina* sp. in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Pathol 55:187–193. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01342.x
- DiCapua E, Cuillel M, Hewat E, Schnarr M, Timmins PA, Ruigrok RWH (1992) Activation of RecA protein. The open helix model for LexA cleavage. J Mol Biol 226:707–719. https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90627-V
- Dillon RJ, Dillon VM (2004) The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. Annu Rev Entomol 49:71–92. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123416
- Djukic M, Brzuszkiewicz E, Fünfhaus A, Voss J, Gollnow K, Poppinga L, Liesegang H, Garcia-Gonzalez E, Genersch E, Daniel R (2014) How to kill the honey bee larva: genomic potential and virulence mechanisms of *Paenibacillus larvae*. PLoS One 9:e90914. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090914
- Djukic M, Poehlein A, Thürmer A, Daniel R (2011) Genome sequence of *Brevibacillus laterosporus* LMG 15441, a pathogen of invertebrates. J Bacteriol 193:5535. https://doi.org/10.1128/JB.05696-11
- Dodd SJ, Hurst MRH, Glare TR, O'Callaghan M, Ronson CW (2006) Occurrence of *sep* insecticidal toxin complex genes in *Serratia* spp. and *Yersinia frederiksenii*. Appl Environ Microbiol 72:6584–6592. https://doi.org/10.1128/AEM.00954-06
- Doss VA, Anup Kumar K, Jayakumar R, Sekar V (2002) Cloning and expression of the vegetative insecticidal protein (vip3V) gene of *Bacillus thuringiensis* in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif 26:82–88. https://doi.org/10.1016/S1046-5928(02)00515-6
- Dowling AJ, Daborn PJ, Waterfield NR, Wang P, Streuli CH, Ffrench-Constant RH (2004) The insecticidal toxin Makes caterpillars floppy (Mcf) promotes apoptosis in mammalian cells. Cell Microbiol 6:345–353. https://doi.org/10.1046/J.1462-5822.2003.00357.X
- Drexler K, Riede I, Montag D, Eschbach ML, Henning U (1989) Receptor specificity of the *Escherichia coli* T-even type phage Ox2: Mutational alterations in host range mutants. J Mol Biol 207:797–803. https://doi.org/10.1016/0022-2836(89)90245-3
- Drobniewski FA, Ellar DJ (1989) Purification and properties of a 28-kilodalton hemolytic and mosquitocidal protein toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73-E10-2. J Bacteriol 171:3060–3067

- Drozdz M, Piekarowicz A, Bujnicki JM, Radlinska M (2012) Novel non-specific DNA adenine methyltransferases. Nucleic Acids Res 40:2119. https://doi.org/10.1093/NAR/GKR1039
- Dryden DTF (2006) DNA mimicry by proteins and the control of enzymatic activity on DNA. Trends Biotechnol 24:378–382. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.06.004
- Du C, Cao S, Shi X, Nie X, Zheng J, Deng Y, Ruan L, Peng D, Sun M (2017) Genetic and biochemical characterization of a gene operon for trans-aconitic acid, a novel nematicide from *Bacillus thuringiensis*. Journal of Biological Chemistry 292:3517– 3530. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.762666
- Du C, Martin PAW, Nickerson' KW (1994) Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals. Appl Environ Microbiol 3847–3853
- Duchaud E, Rusniok C, Frangeul L, Buchrieser C, Givaudan A, Taourit S, Bocs S, Boursaux-Eude C, Chandler M, Charles JF, Dassa E, Derose R, Derzelle S, Freyssinet G, Gaudriault S, Médigue C, Lanois A, Powell K, Siguier P, Vincent R, Wingate V, Zouine M, Glaser P, Boemare N, Danchin A, Kunst F (2003) The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. Nature Biotechnology 2003 21:11 21:1307–1313. https://doi.org/10.1038/nbt886
- Dulmage HT (1970) Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. alesti. J Invertebr Pathol 15:232–239. https://doi.org/10.1016/0022-2011(70)90240-5
- Dunne M, Denyes JM, Arndt H, Loessner MJ, Leiman PG, Klumpp J (2018) *Salmonella* phage S16 tail fiber adhesin features a rare polyglycine rich domain for host recognition. Structure 26:1573-1582.e4. https://doi.org/10.1016/j.str.2018.07.017
- Dunphy GB (1994) Interaction of mutants of *Xenorhabdus nematophilus* (*Enterobacteriaceae*) with antibacterial systems of *Galleria mellonella* larvae (Insecta: Pyralidae). Can J Microbiol 40:161–168. https://doi.org/10.1139/m94-028
- Dunphy GB, Webster JM (1988) Lipopolysaccharides of Xenorhabdus nematophilus (Enterobacteriaceae) and their haemocyte toxicity in non-immune Galleria mellonella (Insecta: Lepidoptera) larvae. Microbiology (N Y) 134:1017–1028. https://doi.org/10.1099/00221287-134-4-1017
- Dutky SR (1940) Two new spore-forming bacteria causing Milky Diseases of Japanese Beetle Larvae. Journal of Agriculture Research 61:57–68
- Dutton M v., Evans CS (2011) Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. https://doi.org/101139/m96-114 42:881–895. https://doi.org/10.1139/M96-114
- Ebeling J, Fünfhaus A, Genersch E (2021) The buzz about ADP-ribosylation toxins from *Paenibacillus larvae*, the causative agent of american foulbrood in honey bees. Toxins 2021, Vol 13, Page 151 13:151. https://doi.org/10.3390/TOXINS13020151

- Eberhard T, Kronvall G, Ullberg M (1999) Surface bound plasmin promotes migration of *Streptococcus pneumoniae* through reconstituted basement membranes. Microb Pathog 26:175–181. https://doi.org/10.1006/MPAT.1998.0262
- Eells JT, Black KA, Makar AB, Tedford CE, Tephly TR (1982) The regulation of one-carbon oxidation in the rat by nitrous oxide and methionine. Arch Biochem Biophys 219:316–326. https://doi.org/10.1016/0003-9861(82)90162-X
- Eiberle MK, Jungbauer A (2010) Technical refolding of proteins: Do we have freedom to operate? Biotechnol J 5:547–559. https://doi.org/10.1002/biot.201000001
- Elakhdar E, -Akhdar E, Ouda SM (2009) Pathogenicity of different fungal isolates to the adult stage of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedmann). Egypt J Biol Pest Control 9:5–10
- Elzen PJ, Westervelt D, Lucas R, Cox RL (2004) Formic acid treatment for control of Varroa destructor (Mesostigmata: Varroidae) and safety to Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) under southern United States conditions. J Econ Entomol 97:1509–1512. https://doi.org/10.1603/0022-0493-97.5.1509
- Enkerlin WR, Gutiérrez Ruelas JM, Pantaleon R, Soto Litera C, Villaseñor Cortés A, Zavala López JL, Orozco Dávila D, Montoya Gerardo P, Silva Villarreal L, Cotoc Roldán E, Hernández López F, Arenas Castillo A, Castellanos Dominguez D, Valle Mora A, Rendón Arana P, Cáceres Barrios C, Midgarden D, Villatoro Villatoro C, Lira Prera E, Zelaya Estradé O, Castañeda Aldana R, López Culajay J, Ramírez y Ramírez F, Liedo Fernández P, Ortíz Moreno G, Reyes Flores J, Hendrichs J (2017) The Moscamed Regional Programme: review of a success story of area-wide sterile insect technique application. Entomol Exp Appl 164:188–203. https://doi.org/10.1111/eea.12611
- Enright MR, Griffin CT (2004) Specificity of association between *Paenibacillus* spp. and the entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis* spp. Microb Ecol 48:414–423. https://doi.org/10.1007/s00248-003-0166-0
- Enright MR, McInerney JO, Griffin CT (2003) Characterization of endospore-forming bacteria associated with entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis* spp., and description of *Paenibacillus nematophilus* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 53:435– 441. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02344-0
- Ertürk Ö, Yaman M (2008) Effects of four *Bacillus* spp. of soil origin on the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say). 38:135–138. https://doi.org/10.1111/j.1748-5967.2008.00150.x
- Escudero-Colomar LA, Vilajeliu M, Batllori L (2008) Seasonality in the occurrence of the Mediterranean fruit fly [*Ceratitis capitata* (Wied.)] in the north-east of Spain. Journal of Applied Entomology 132:714–721. https://doi.org/10.1111/J.1439-0418.2008.01372.X
- Esgleas M, Li Y, Hancock MA, Harel J, Dubreuil JD, Gottschalk M (2008) Isolation and characterization of α -enolase, a novel fibronectin-binding protein from

Streptococcus suis. Microbiology (N Y) 154:2668–2679. https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/017145-0

- Eskafi FM, Kolbe MM (1990) Predation on larval and pupal *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) by the ant *Solenopsis geminata* (Hymenoptera: Formicidae) and other predators in Guatemala. Environ Entomol 19:148–153. https://doi.org/10.1093/ee/19.1.148
- Espinasse S, Gohar M, Chaufaux J, Buisson C, Perchat S, Sanchis V (2002) Correspondence of high levels of beta-exotoxin I and the presence of cry1B in *Bacillus thuringiensis*. Appl Environ Microbiol 68:4182. https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4182-4186.2002
- Esterman ES, Wolf YI, Kogay R, Koonin E v., Zhaxybayeva O (2021) Evolution of DNA packaging in gene transfer agents. Virus Evol 7. https://doi.org/10.1093/VE/VEAB015
- Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, Nye GJ, Craig JA, Koziel MG, Casida JE (1996) Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects (lepidopteran pathogen/biological insect control). Proc Natl Acad Sci U S A 93:5389–5394
- Fagundes R, Picoli E, Lana U, Valicente F (2011) Plasmid patterns of efficient and inefficient strains of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Neotrop Entomol 40:529–532. https://doi.org/10.1007/s00265-011-1141-2
- Fahie-Wilson M, Halsall D (2008) Polyethylene glycol precipitation: Proceed with care. Ann Clin Biochem 45:233–235. https://doi.org/10.1258/acb.2008.007262
- Fan B, Blom J, Klenk HP, Borriss R (2017) Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus velezensis, and Bacillus siamensis Form an "Operational Group B. amyloliquefaciens" within the B. subtilis species complex. Front Microbiol 8:22. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022
- Farkaš J, Šebesta K, Horská K, Samek Z, Dolejš L, Šorm F (1969) The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*. Preliminary communication. Collect Czechoslov Chem Commun 34:1118–1120. https://doi.org/10.1135/CCCC19691118
- Faust RM, Abe K, Held GA, Iizuka T, Bulla LA, Meyers CL (1983) Evidence for plasmidassociated crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Plasmid 9:98–103. https://doi.org/10.1016/0147-619X(83)90034-3
- Favret ME, Yousten AA (1985) Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. J Invertebr Pathol 45:195–203. https://doi.org/10.1016/0022-2011(85)90009-6
- Feldhaar H (2011) Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. Ecol Entomol 36:533–543. https://doi.org/10.1111/J.1365-2311.2011.01318.X

- ffrench-Constant RH, Dowling A, Waterfield NR (2007) Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture. Toxicon 49:436–451. https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2006.11.019
- Fisher KT, Hill AR, Sproul AN (1985) Eradication of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephrtidae) in Carnarvon, Western Australia. Aust J Entomol 24:207–208. https://doi.org/10.1111/J.1440-6055.1985.TB00228.X
- Flodman K, Corrêa IR, Dai N, Weigele P, Xu SY (2020) In vitro type II restriction of bacteriophage DNA with modified pyrimidines. Front Microbiol 11:2669. https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.604618/BIBTEX
- Forst S, Nealson K (1996) Molecular Biology of the Symbiotic-Pathogenic Bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. Microbiol Rev 60:21–43
- Fraser GM, Hughes C (1999) Swarming motility. Curr Opin Microbiol 2:630–635. https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)00033-8
- Fries I, Camazine S (2001) Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. Apidology 32:199–214. https://doi.org/10.1051/apido:2001122ï
- Fuchs TM, Bresolin G, Marcinowski L, Schachtner J, Scherer S (2008) Insecticidal genes of *Yersinia* spp.: taxonomical distribution, contribution to toxicity towards *Manduca sexta* and *Galleria mellonella*, and evolution. BMC Microbiol. https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-214
- Fullner KJ, Mekalanos JJ (2000) In vivo covalent cross-linking of cellular actin by theVibriocholeraeRTXtoxin.EMBOJ19:5315.https://doi.org/10.1093/EMBOJ/19.20.5315
- Fung B, Jo Lehman L, Jay McCoy R, Jane Messenger B, Carol Manker D, Ensio Orjala J, Lindhard D (2001) Strain of *Bacillus pumilus* for controlling plant diseases caused by fungi
- Gaastra W, de Graaf FK (1982) Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Microbiol Rev 46:129–161
- Gahan LJ, Pauchet Y, Vogel H, Heckel DG (2010) An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. PLoS Genet 6:1001248. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001248
- Ganyu A, Csiszovszki Z, Ponyi T, Kern A, Buzás Z, Orosz L, Papp PP (2005) Identification of cohesive ends and genes encoding the terminase of phage 16-3. J Bacteriol 187:2526–2531. https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2526-2531.2005
- García-González E, Genersch E (2013) Honey bee larval peritrophic matrix degradation during infection with *Paenibacillus larvae*, the aetiological agent of American foulbrood of honey bees, is a key step in pathogenesis. Environ Microbiol 15:2894– 2901. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12167
- Garcia-Ramon DC, Berry C, Tse C, Fernández-Fernández A, Osuna A, Vílchez S (2018) The parasporal crystals of *Bacillus pumilus* strain 15.1: a potential virulence factor? Microb Biotechnol 11:302–316. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12771

- Garcia-Ramon DC, Luque-Navas MJ, Molina CA, del Val C, Osuna A, Vilchez S (2015) Identification, sequencing and comparative analysis of pBp15.S plasmid from the newly described entomopathogen *Bacillus pumilus* 15.1. Plasmid 82:17–27. https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2015.09.001
- Garcia-Ramon DC, Molina CA, Osuna A, Vílchez S (2016) An in-depth characterization of the entomopathogenic strain *Bacillus pumilus* 15.1 reveals that it produces inclusion bodies similar to the parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis*. Appl Microbiol Biotechnol 100:3637–3654. https://doi.org/10.1007/s00253-015-7259-9
- García-Ramón DC, Palma L, Osuna A, Berry C, Vílchez S (2015) Draft genome of the entomopathogenic bacterium *Bacillus pumilus* 15.1, a strain highly toxic towards *Ceratitis capitata*, the Mediterranean fruit fly. Genome Annoucement 3:1–2. https://doi.org/10.1128/genomeA.01019-15.Copyright
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2004) Protein analysis tools on the ExPASy Server. Humana Press, Totowa
- Gatsogiannis C, Merino F, Roderer D, Balchin D, Schubert E, Kuhlee A, Hayer-Hartl M, Raunser S (2018) Tc toxin activation requires unfolding and refolding of a βpropeller. Nature 2018 563:7730 563:209–213. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0556-6
- Ge AZ, Rivers D, Milne R, Dean DH (1991) Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. Refinement of *Heliothis virescens* and *Trichoplusia ni* specificity domains on CryIA(c). Journal of Biological Chemistry 266:17954–17958. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)55221-2
- Ge AZ, Shivarova NI, Dean DH (1989) Location of the *Bombyx mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin protein. Proceedings of the National Academy of Sciences 86:4037–4041. https://doi.org/10.1073/PNAS.86.11.4037
- Geller AM, Pollin I, Zlotkin D, Danov A, Nachmias N, Andreopoulos WB, Shemesh K, Levy A (2021) The extracellular contractile injection system is enriched in environmental microbes and associates with numerous toxins. Nature Communications 2021 12:1 12:1–15. https://doi.org/10.1038/s41467-021-23777-7
- Genersch E, Forsgren E, Pentikäinen J, Ashiralieva A, Rauch S, Kilwinski J, Fries I (2006)
 Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. Int J Syst Evol Microbiol 56:501–511. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63928-0
- Georgescauld F, Popova K, Gupta AJ, Bracher A, Engen JR, Hayer-Hartl M, Hartl FU (2014) GroEL/ES chaperonin modulates the mechanism and accelerates the rate of TIMbarrel domain folding. Cell 157:922. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.03.038
- Gerrard JG, Joyce SA, Clarke DJ, Ffrench-Constant RH, Nimmo GR, Looke DFM, Feil EJ, Pearce L, Waterfield NR (2006) Nematode symbiont for *Photorhabdus asymbiotica*. Emerg Infect Dis 12
- Giffel MC te, Beumer RR, Slaghuis BA, Rombouts FM (1996) Occurrence and characterization of (psychrotrophic) *Bacillus cereus* on farms in the Netherlands.

Symposium on Bacteriological Quality of Raw Milk, Wolfpassing, Austria 13-15 March 1996 Proceedings 40–45

- Gill SS, Hornung JM (1987) Cytolytic activity of *Bacillus thuringiensis* proteins to insect and mammalian cell lines. J Invertebr Pathol 50:16–25. https://doi.org/10.1016/0022-2011(87)90140-6
- Gillis A, Mahillon J (2014) Phages preying on *Bacillus anthracis, Bacillus cereus,* and *Bacillus thuringiensis*: Past, present and future. Viruses 6:2623–2672. https://doi.org/10.3390/v6072623
- Glare TR, Corbett GE, Sadler TJ (1993) Association of a large plasmid with amber disease of the New Zealand grass grub, *Costelytra zealandica*, caused by *Serratia entomophila* and *Serratia proteamaculans*. J Invertebr Pathol 62:165–170. https://doi.org/10.1006/jipa.1993.1091
- Gohel V, Singh A, Vimal M, Ashwini P, Chhatpar H (2016) Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. Afr J Biotechnol 5:54–72. https://doi.org/10.4314/ajb.v5i2.
- Gough JM, Akhurst RJ, Ellar DJ, Kemp DH, Wijffels GL (2002) New isolates of *Bacillus thuringiensis* for control of livestock ectoparasites. Biological Control 23:179–189. https://doi.org/10.1006/BCON.2001.1006
- Grady EN, MacDonald J, Liu L, Richman A, Yuan ZC (2016) Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: A review. Microb Cell Fact 15:1–18. https://doi.org/10.1186/S12934-016-0603-7/TABLES/1
- Gregorc A, Bowen ID (1998) Histopathological and histochemical changes in honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) after infection with *Bacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood disease. Cell Biol Int 22:137–144. https://doi.org/10.1006/CBIR.1998.0232
- Gregory MA, Till R, Smith MCM (2003) Integration site for *Streptomyces* phage BT1 and development of site-specific integrating vectors. J Bacteriol 185:5320–5323. https://doi.org/10.1128/JB.185.17.5320-5323.2003
- Griffitts JS, Haslam SM, Yang T, Garczynski SF, Mulloy B, Morris H, Cremer PS, Dell A, Adang MJ, Aroian R v. (2005) Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringienses* crystal toxin. Science (1979) 307:922–925. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1104444/SUPPL FILE/GRIFFITTS.SOM.PDF
- Grimont PAD, Jackson TA, Ageron E, Noonan MJ (1988) Serratia entomophila sp. nov. associated with amber disease in the New Zealand grass grub Costelytra zealandica.
 Int J Syst Bacteriol 38:1–6. https://doi.org/10.1099/00207713-38-1-1/CITE/REFWORKS
- Grose JH, Casjens SR (2014) Understanding the enormous diversity of bacteriophages: The tailed phages that infect the bacterial family *Enterobacteriaceae*. Virology 468– 470:421–443. https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.08.024
- Groth AC, Calos MP (2004) Phage integrases: biology and applications. J Mol Biol 335:667–678. https://doi.org/10.1016/J.JMB.2003.09.082

- Groth AC, Olivares EC, Thyagarajan B, Calos MP (2000) A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. Proc Natl Acad Sci U S A 97:5995–6000. https://doi.org/10.1073/PNAS.090527097
- Grujic D, Salido EC, Shenoy BC, Langman CB, McGrath ME, Patel RJ, Rashid A, Mandapati S, Jung CW, Margolin AL (2009) Hyperoxaluria is reduced and nephrocalcinosis prevented with an oxalate-degrading enzyme in mice with hyperoxaluria. Am J Nephrol 29:86–93. https://doi.org/10.1159/000151395
- Guil JL, Torija ME, Giménez JJ, Rodríguez-García I, Giménez A (1996) Oxalic acid and calcium determination in wild edible plants. J Agric Food Chem 44:1821–1823. https://doi.org/10.1021/JF950472A
- Guillemet E, Cadot C, Tran S-L, Ne Guinebretiè M-H, Lereclus D, Ramarao N (2010) The InhA metalloproteases of *Bacillus cereus* contribute concomitantly to virulence. Journal of bacteriology 192:286–294. https://doi.org/10.1128/JB.00264-09
- Gupta RS, Patel S, Saini N, Chen S (2020) Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: Description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *subtilis* and *cereus* clades of species. Int J Syst Evol Microbiol 70:5753–5798. https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.004475/CITE/REFWORKS
- Gutiérrez-Mañero FJ, Ramos-Solano B, Probanza A, Mehouachi J, Tadeo FR, Talon M (2001) The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. Physiol Plant 111:206–211. https://doi.org/10.1034/J.1399-3054.2001.1110211.X
- Guzmán-Plazola RA (2010) Ficha técnica Ceratitis capitata
- Haas D, Défago G (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *pseudomonads*. Nat Rev Microbiol 3:307–319. https://doi.org/10.1038/nrmicro1129
- Hahn BS, Cho SY, Ahn MY, Kim YS (2001) Purification and characterization of a plasminlike protease from *Tenodera sinensis* (Chinese mantis). Insect Biochem Mol Biol 31:573–581. https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00162-4
- Haider MZ, Ellar DJ (1989) Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δendotoxin: interaction with phospholipid vesicles. Biochim Biophys Acta 978:216– 222. https://doi.org/10.1016/0005-2736(89)90118-1
- Han S, Craig JA, Putnam CD, Carozzi NB, Tainer JA (1999) Evolution and mechanism from structures of an ADP-ribosylating toxin and NAD complex. Nat Struct Biol 6:932– 936. https://doi.org/10.1038/13300
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol 166:557–580. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8
- Hannay CL (1953) Crystalline inclusions in aerobic sporeforming bacteria. Nature 172:1004–1004. https://doi.org/10.1038/1721004a0

- Hannay CLD (1957) The parasporal body of *Bacillus laterosporus* Laubach. J Biophys Biochem Cytol 3
- Haritos VS, Dojchinov G (2003) Cytochrome c oxidase inhibition in the rice weevil Sitophilus oryzae (L.) by formate, the toxic metabolite of volatile alkyl formates.
 Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 136:135–143. https://doi.org/10.1016/S1532-0456(03)00173-X
- Harrison H, Patel R, Yousten AA (2000) Paenibacillus associated with milky disease in Central and South American scarabs. J Invertebr Pathol 76:169–175. https://doi.org/10.1006/JIPA.2000.4969
- Hashizume K, Kakiuchi K, Koyama E, Watanabe T (1971) Denaturation of soybean protein by freezing Part I. Agric Biol Chem 35:449–459
- Hastowo S, Lay BW, Ohba M (1992) Naturally occurring *Bacillus thuringiensis* in Indonesia. Journal of Applied Bacteriology 73:108–113. https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.1992.TB01695.X
- Hattman S, Wilkinson J, Swinton D, Schlagman S, Macdonald PM, Mosig G (1985) Common evolutionary origin of the phage T4 dam and host *Escherichia coli* dam DNA-adenine methyltransferase genes. J Bacteriol 164:932–937
- Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, Kurokawa K, Ishii K, Yokoyama K, Han CG, Ohtsubo E, Nakayama K, Murata T, Tanaka M, Tobe T, Iida T, Takami H, Honda T, Sasakawa C, Ogasawara N, Yasunaga T, Kuhara S, Shiba T, Hattori M, Shinagawa H (2001) Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Eschelichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. DNA Research 8:11–22. https://doi.org/10.1093/DNARES/8.1.11
- Heins SD, Manker DC, Jimenez DR, Marrone PG (1999) *Bacillus pumilus* strain for controlling corn rootworm, nematode and armyworm infestations US Patent 6001637
- Hendrichs J, Katsoyannos BI, Wornoayporn V, Hendrichs MA (1994) Odour-mediated foraging by yellowjacket wasps (Hymenoptera: Vespidae): predation on leks of pheromone-calling Mediterranean fruit fly males (Diptera: Tephritidae). Oecologia 99:88–94. https://doi.org/10.1007/BF00317087
- Hendrichs J, Ortiz G, Liedo P, Schwarz A (1983) Six years of successful medfly program in Mexico and Guatemala. In: IOBC Symposium
- Heo YJ, Chung IY, Choi KB, Cho YH (2007) R-type pyocin is required for competitive growth advantage between *Pseudomonas aeruginosa* strains. J Microbiol Biotechnol 17:180–185
- Hernández-Pelegrín L, Llopis-Giménez Á, Crava CM, Ortego F, Hernández-Crespo P, Ros
 VID, Herrero S (2022) Expanding the medfly virome: viral diversity, prevalence, and
 sRNA profiling in mass-reared and field-derived medflies. Viruses 14:623.
 https://doi.org/10.3390/V14030623

- Hernández-Santana A, Gómez-Garzón C, Dussán J (2016) Complete genome sequence of *Lysinibacillus sphaericus* WHO reference Strain 2362. Genome Announc 4:1–2. https://doi.org/10.1128/GENOMEA.00545-16
- Heymann JB, Bartho JD, Rybakova D, Venugopal HP, Winkler DC, Sen A, Hurst MRH, Mitra AK (2013) Three-dimensional structure of the toxin-delivery particle antifeeding prophage of *Serratia entomophila*. Journal of Biological Chemistry 288:25276–25284. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.456145
- Hill JE, Baiano JCF, Barnes AC (2009) Isolation of a novel strain of *Bacillus pumilus* from penaeid shrimp that is inhibitory against marine pathogens. J Fish Dis 32:1007–1016. https://doi.org/10.1111/J.1365-2761.2009.01084.X
- Hindley J, Berry C (1987) Identification, cloning and sequence analysis of the Bacillus sphaericus 1593 41.9 kD larvicidal toxin gene. Mol Microbiol 1:187–194. https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.1987.TB00511.X
- Hobbs Z, Abedon ST (2016) Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with 'Lytic or lysogenic.' Microbiology Letters 363. https://doi.org/10.1093/femsle/fnw047
- Hofmann C, Lüthy P, Hütter R, Pliska V (1988) Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (Pieris brassicae). Eur J Biochem 173:85–91. https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1988.TB13970.X
- Hossain DM, Shitomi Y, Moriyama K, Higuchi M, Hayakawa T, Mitsui T, Sato R, Hori H (2004) Characterization of a novel plasma membrane protein, expressed in the midgut epithelia of *Bombyx mori*, that binds to Cry1A toxins. Appl Environ Microbiol 70:4604–4612. https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4604-4612.2004
- Hu B, Margolin W, Molineux IJ, Liu J (2015) Structural remodeling of bacteriophage T4 and host membranes during infection initiation. Proceedings of the National Academy of Sciences 112:4919–4928. https://doi.org/10.1073/PNAS.1501064112
- Huang E, Yousef AE (2015) Biosynthesis of paenibacillin, a lantibiotic with N-terminal acetylation, by *Paenibacillus polymyxa*. Microbiol Res 181:15–21. https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2015.08.001
- Huang X, Tian B, Niu Q, Yang J, Zhang L, Zhang K (2005) An extracellular protease from Brevibacillus laterosporus G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. Res Microbiol 156:719–727. https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2005.02.006
- Hubbert WT, Petenyi CW, Glasgow LA, Uyeda CT, Creighton SA (1971) *Yersinia pseudotuberculosis* infection in the United States. Septicemia, appendicitis, and mesenteric lymphadenitis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 20:679–84
- Hurst MRH, Beard SS, Jackson TA, Jones SM (2007a) Isolation and characterization of the *Serratia entomophila* antifeeding prophage. FEMS Microbiol Lett 270:42–48. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00645.x

- Hurst MRH, Glare TR, Jackson TA (2004) Cloning Serratia entomophila antifeeding genes—a putative defective prophage active against the grass grub Costelytra zealandica. J Bacteriol 186:5116. https://doi.org/10.1128/JB.186.15.5116-5128.2004
- Hurst MRH, Glare TR, Jackson TA, Ronson CW (2000) Plasmid-located pathogenicity determinants of *Serratia entomophila*, the causal agent of amber disease of grass grub, show similarity to the insecticidal toxins of *Photorhabdus luminescens*. J Bacteriol 182:5127. https://doi.org/10.1128/JB.182.18.5127-5138.2000
- Hurst MRH, Jones SA, Binglin T, Harper LA, Jackson TA, Glare TR (2011) The main virulence determinant of *Yersinia entomophaga* MH96 is a broad-host-range toxin complex active against insects. J Bacteriol 193:1966. https://doi.org/10.1128/JB.01044-10
- Hurst MRH, Jones SM, Tan B, Jackson TA (2007b) Induced expression of the *Serratia entomophila* Sep proteins shows activity towards the larvae of the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. FEMS Microbiol Lett 275:160–167. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00886.x
- Hurst S, Rowedder H, Michaels B, Bullock H, Jackobeck R, Abebe-Akele F, Durakovic U, Gately J, Janicki E, Tisa LS (2015) Elucidation of the *Photorhabdus temperata* genome and generation of a transposon mutant library to identify motility mutants altered in pathogenesis. J Bacteriol 197:2201–2216. https://doi.org/10.1128/JB.00197-15
- Hynes AP, Shakya M, Mercer RG, Grüll MP, Bown L, Davidson F, Steffen E, Matchem H, Peach ME, Berger T, Grebe K, Zhaxybayeva O, Lang AS (2016) Functional and evolutionary characterization of a gene transfer agent's multilocus "genome." Mol Biol Evol 33:2530–2543. https://doi.org/10.1093/molbev/msw125
- IPPC Secretariat (2021) A global challenge to prevent and mitigate plant-pest risks in agriculture, forestry and ecosystems. Roma
- Ishii K, Adachi T, Hamamoto H, Sekimizu K (2014a) *Serratia marcescens* suppresses host cellular immunity via the production of an adhesion-inhibitory factor against immunosurveillance cells. Journal of Biological Chemistry 289:5876–5888. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.544536
- Ishii K, Adachi T, Hara T, Hamamoto H, Sekimizu K (2014b) Identification of a *Serratia marcescens* virulence factor that promotes hemolymph bleeding in the silkworm, *Bombyx mori*. J Invertebr Pathol 117:61–67. https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.02.001
- Ishiwata S (1901) On a kind of severe flacherie (sotto disease). Dainihon Sanshi Kaiho 114
- Jevševar S, Gaberc-Porekar V, Fonda I, Podobnik B, Grdadolnik J, Menart V (2005) Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. Biotechnol Prog 21:632–639. https://doi.org/10.1021/BP0497839

- Jolodar A, Fischer P, Bergmann S, Büttner DW, Hammerschmidt S, Brattig NW (2003) Molecular cloning of an α-enolase from the human filarial parasite *Onchocerca volvulus* that binds human plasminogen. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Gene Structure and Expression 1627:111–120. https://doi.org/10.1016/S0167-4781(03)00083-6
- Jones GW, Nielsen-Leroux C, Yang Y, Yuan Z, Fiúza Dumas V, Monnerat RG, Berry C (2007) A new Cry toxin with a unique two-component dependency from *Bacillus sphaericus*. The FASEB Journal 21:4112–4120. https://doi.org/10.1096/FJ.07-8913COM
- Jørgensen R, Wang Y, Visschedyk D, Merrill AR (2008) The nature and character of the transition state for the ADP-ribosyltransferase reaction. EMBO Rep 9:802–809. https://doi.org/10.1038/embor.2008.90
- Joshi MC, Sharma A, Kant S, Birah A, Gupta GP, Khan SR, Bhatnagar R, Banerjee N (2008) An insecticidal GroEL protein with chitin binding activity from *Xenorhabdus nematophila**. Journal of Biological Chemistry 283:28287–28296. https://doi.org/10.1074/JBC.M804416200
- Juan-Blasco M, Sabater-Muñoz B, Argilés R, Jacas JA, Ortego F, Urbaneja A (2013) Effects of pesticides used on citrus grown in Spain on the mortality of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) Vienna-8 Strain Sterile Males. J Econ Entomol 106:1226– 1233. https://doi.org/10.1603/EC12464
- Jucovic M, Walters FS, Warren GW, Palekar N v., Chen JS (2008) From enzyme to zymogen: engineering Vip2, an ADP-ribosyltransferase from *Bacillus cereus*, for conditional toxicity. Protein Engineering, Design and Selection 21:631–638. https://doi.org/10.1093/PROTEIN/GZN038
- Jurat-Fuentes JL, Adang MJ (2004) Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. Eur J Biochem 271:3127–3135. https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.2004.04238.X
- Just VJ, Burrell MR, Bowater L, Mcrobbie I, Stevenson CEM, Lawson DM, Bornemann S (2007) The identity of the active site of oxalate decarboxylase and the importance of the stability of active-site lid conformations 1. Biochemichal Journal 407:397– 406. https://doi.org/10.1042/BJ20070708
- Just VJ, Stevenson CEM, Bowater L, Tanner A, Lawson DM, Bornemann S (2004) A closed conformation of *Bacillus subtilis* oxalate decarboxylase OxdC provides evidence for the true identity of the active site *. Journal of Biological Chemistry 279:19867– 19874. https://doi.org/10.1074/JBC.M313820200
- Kaelin P, Morel P, Gadani F (1994) Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and Lasioderma sericome (F.). Appl Environ Microbiol 60:19–25
- Kapongo JP, Kevan PG, Giliomee JH (2007) Control of mediterranean fruit fly *Ceratitis* capitata (Diptera: Tephritidae) with the parasitoid *Muscidifurax* raptor (Hymenoptera: Pteromalidae) in vineyards. HortScience 42:1400–1404. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.6.1400

- Karagoz M, Gulcu B, Hazir C, Kaya HK, Hazir S (2009) Biological control potential of Turkish entomopathogenic nematodes against the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. Phytoparasitica 37:153–159. https://doi.org/10.1007/s12600-008-0020-5
- Karthik K, Muneeswaran NS, Manjunathachar HV (2014) Bacteriophages: Effective alternative to antibiotics. Adv Anim Vet Sci 2:1–7. https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2014/2.3s.1.7
- Kaspi R (2000) Attraction of female Chiracanthium mildei (Araneae: Clubionidae) to olfactory cues from male Mediterranean fruit flies *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). BioControl 45:463–468. https://doi.org/10.1023/A:1026593004360
- Kawanishi CY, Splittstoesser CM, Tashiro H (1978) Infection of the european chafer, Amphimallon majalis, by Bacillus popilliae: ultrastructure. J Invertebr Pathol 31:91– 102. https://doi.org/10.1016/0022-2011(78)90113-1
- Kay S, Edwards J, Brown J, Dixon R (2019) Galleria mellonella infection model identifies both high and low lethality of Clostridium perfringens toxigenic strains and their response to antimicrobials. Front Microbiol 10:1281. https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01281/BIBTEX
- Kellen WR, Clark TB, Lindegren JE, Ho BC, Rogoff MH, Singer S (1965) Bacillus sphaericus
 Neide as a pathogen of mosquitoes. J Invertebr Pathol 7:442–448.
 https://doi.org/10.1016/0022-2011(65)90120-5
- Khandelwal P, Banerjee-Bhatnagar N (2003) Insecticidal activity associated with the outer membrane vesicles of *Xenorhabdus nematophilus*. Appl Environ Microbiol 69:2032–2037. https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2032
- Khandelwal P, Bhatnagar R, Choudhury D, Banerjee N (2004) Characterization of a cytotoxic pilin subunit of *Xenorhabdus nematophila*. Biochem Biophys Res Commun 314:943–949. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2003.12.187
- Khuri S, Bakker FT, Dunwell JM (2001) Phylogeny, function, and evolution of the cupins, a structurally conserved, functionally diverse superfamily of proteins. Mol Biol Evol 18:593–605. https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A003840
- Kim YT, Huang HT (1970) The β-exotoxins of *Bacillus thuringiensis* I. Isolation and characterization. J Invertebr Pathol 15:100–108. https://doi.org/10.1016/0022-2011(70)90103-5
- Kitada S, Abe Y, Shimada H, Kusaka Y, Matsuo Y, Katayama H, Okumura S, Akao T, Mizuki E, Kuge O, Sasaguri Y, Ohba M, Ito A (2006) Cytocidal actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. Journal of Biological Chemistry 281:26350–26360. https://doi.org/10.1074/jbc.M602589200
- Klein MG, Kaya H (1995) *Bacillus* and *Serratia* species for Scarab control. Mem Inst Oswaldo Cruz 90:87–95. https://doi.org/10.1590/S0074-02761995000100019
- Knight PJK, Crickmore N, Eiiar DJ (1994) The receptor for *Bacillus thuringiensis* CrylA(c) delta-endotoxln in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. Mol Microbiol 11:429–436

- Knipling EF (1955) Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. J Econ Entomol 48:459–462. https://doi.org/10.1093/jee/48.4.459
- Knipling EF (1959) Sterile-male method of population control. Science (1979) 130:902– 904. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.130.3380.902
- Knowles BH, Ellar DJ (1987) Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxins with different insect specificity. Biochim Biophys Acta 924:509–518. https://doi.org/10.1016/0304-4165(87)90167-X
- Knowles BH, White PJ, Nicholls CN, Ellar DJ (1992) A broad-spectrum cytolytic toxin from Bacillus thuringiensis var. kyushuensis. Proc R Soc Lond B Biol Sci 248:1–7. https://doi.org/10.1098/RSPB.1992.0035
- Kogut M, Pollock MR, Tridgell EJ (1956) Purification of penicillin-induced penicillinase of *Bacillus cereus* NRRL 569: a comparison of its properties with those of a similarly purified penicillinase produced. Biochemichal Journal 62:391
- Kolandaswamy A, George L, Sadasivam S (2009) Heterologous expression of oxalate decarboxylase in *Lactobacillus plantarum* NC8. Curr Microbiol 58:117–121. https://doi.org/10.1007/s00284-008-9286-6
- Konit PA, Ellar DJ (1994) Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic endotoxins. Microbiology (N Y) 140:880
- Krieg A, Huger AM, Langenbruch GA, Schnetter W (1983) Bacillus thuringiensis var. tenebrionis: ein neuer, gegenüber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp. Zeitschrift für Angewandte Entomologie 96:500–508. https://doi.org/10.1111/J.1439-0418.1983.TB03704.X
- Kroder S, Messing RH (2010) A new parasitoid from Kenya, *Fopius ceratitivorus*, complements the extant parasitoid guild attacking Mediterranean fruit fly in Hawaii.
 Biological
 Kontrol
 Control
 S3:223–229.
 https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2010.01.003
- Krogh S, O'Reilly M, Nolan N, Devine KM (1996) The phage-like element PBSX and part of the skin element, which are resident at different locations on the *Bacillus subtilis* chromosome, are highly homologous. Microbiology (N Y) 142:2031–2040. https://doi.org/10.1099/13500872-142-8-2031
- Krska D, Ravulapalli R, Fieldhouse RJ, Lugo MR, Merrill AR (2015) C3larvin Toxin, an ADPribosyltransferase from *Paenibacillus larvae*. Journal of Biological Chemistry 290:1639–1653. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.589846
- Krumsiek J, Arnold R, Rattei T (2007) Gepard: a rapid and sensitive tool for creating dotplots on genome scale. Bioinformatics 23:1026–1028. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm039
- Kuipers OP, de Ruyter PGGA, Kleerebezem M, de Vos WM (1998) Quorum sensingcontrolled gene expression in lactic acid bacteria. J Biotechnol 64:15–21. https://doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00100-X

- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol Biol Evol 35:1547–1549. https://doi.org/10.1093/molbev/msy096
- Kumari P, Kant S, Zaman S, Mahapatro GK, Banerjee N, Sarin NB (2014) A novel insecticidal GroEL protein from *Xenorhabdus nematophila* confers insect resistance in tobacco. Transgenic Res 23:99–107. https://doi.org/10.1007/S11248-013-9734-3/TABLES/1
- Küppers T, Steffen V, Hellmuth H, O'Connell T, Bongaerts J, Maurer KH, Wiechert W (2014) Developing a new production host from a blueprint: *Bacillus pumilus* as an industrial enzyme producer. Microb Cell Fact 13:1–11. https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-46/TABLES/2
- Kuroda K, Kageyama M (1981) Comparative study on F-type pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. J Biochem 89:1721–1736. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133372
- Kwan T, Liu J, DuBow M, Gros P, Pelletier J (2005) The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. Proc Natl Acad Sci U S A 102:5174– 5179. https://doi.org/10.1073/pnas.0501140102
- Lamonica JM, Wagner MA, Eschenbrenner M, Williams LE, Miller TL, Patra G, DelVecchio VG (2005) Comparative secretome analyses of three *Bacillus anthracis* strains with variant plasmid contents. Infect Immun 73:3646. https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3646-3658.2005
- Lamont I, Brumby AM, Egan JB (1989) UV induction of coliphage 186: prophage induction as an SOS function. Source 86:5492–5496
- Lang AE, Schmidt G, Schlosser A, Hey TD, Larrinua IM, Sheets JJ, Mannherz HG, Aktories K (2010) *Photorhabdus luminescens* toxins ADP-ribosylate actin and RhoA to force actin clustering. Science (1979) 327:1139–1142. https://doi.org/10.1126/science.1184557
- Lang AS, Taylor TA, Thomas Beatty J (2002) Evolutionary implications of phylogenetic analyses of the gene transfer agent (GTA) of *Rhodobacter capsulatus*. J Mol Evol 55:534–543. https://doi.org/10.1007/s00239-002-2348-7
- Lavelle K, Murphy J, Fitzgerald B, Lugli GA, Zomer A, Neve H, Ventura M, Franz CM, Cambillau C, van Sinderen D, Mahony J (2018) A decade of *Streptococcus thermophilus* phage evolution in an irish dairy plant. Appl Environ Microbiol 84. https://doi.org/10.1128/AEM.02855-17
- Lee MK, Walters FS, 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-Endotoxin. Appl Environ Microbiol 69:4648–4657. https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4648-4657.2003
- Leifert C, Li H, Chidburee S, Hampson S, Workman S, Sigee D, Epton HAS, Harbour A (1995) Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and

Bacillus pumilus CL45. Journal of Applied Bacteriology 78:97–108. https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.1995.TB02829.X

- Leiman PG, Arisaka F, van Raaij MJ, Kostyuchenko VA, Aksyuk AA, Kanamaru S, Rossmann MG (2010) Morphogenesis of the T4 tail and tail fibers. Virol J 7:1–28. https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-355/FIGURES/16
- Leiman PG, Chipman PR, Kostyuchenko VA, Mesyanzhinov V v., Rossmann MG (2004) Three-dimensional rearrangement of proteins in the tail of bacteriophage T4 on infection of its host. Cell 118:419–429. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2004.07.022
- Leuber M, Orlik F, Schiffler B, Sickmann A, Benz R (2006) Vegetative insecticidal protein (Vip1Ac) of *Bacillus thuringiensis* HD201: Evidence for oligomer and channel formation. Biochemistry 45:283–288. https://doi.org/10.1021/BI051351Z/ASSET/IMAGES/MEDIUM/BI051351ZN00001. GIF
- Li J, Carroll J, Ellar DJ (1991) Crystal structure of insecticidal δ-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. Nature 1991 353:6347 353:815–821. https://doi.org/10.1038/353815a0
- Li J, Koni PA, Ellar DJ (1996) Structure of the mosquitocidal δ-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. J Mol Biol 257:129–152. https://doi.org/10.1006/JMBI.1996.0152
- Lian LH, Tian BY, Xiong R, Zhu MZ, Xu J, Zhang KQ (2007) Proteases from *Bacillus*: a new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations. Lett Appl Microbiol 45:262–269. https://doi.org/10.1111/J.1472-765X.2007.02184.X
- Ling Wu Z, Yi Guo W, Zhi Qiu J, Pei Huang T, Bo Li X, Guan X (2004) Cloning and localization of vip3A gene of *Bacillus thuringiensis*. Biotechnol Lett 26:1425–1428
- Liquido NJ, Nishida T (1985) Observations on some aspects of the biology of *Cyrtorhinus lividipennis* Reuter (Heteroptera: Miridae). Proceedings Hawaiian Entomological Society 25
- Liquido NJ, Shinoda LA, Cunningham RT (1991) Host plants of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): an annotated world review. miscellaneous publications of the entomological society of america 77:1–52
- Liu X, Ruan L, Peng D, Li L, Sun M, Yu Z (2014) Thuringiensin: A thermostable secondary metabolite from *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against a wide range of insects. Toxins (Basel) 6:2229. https://doi.org/10.3390/TOXINS6082229
- Liu XY, Ruan LF, Hu ZF, Peng DH, Cao SY, Yu ZN, Liu Y, Zheng JS, Sun M (2010) Genomewide screening reveals the genetic determinants of an antibiotic insecticide in *Bacillus thuringiensis*. J Biol Chem 285:39191. https://doi.org/10.1074/JBC.M110.148387
- Liu Y-B, Tabashnik BE, Moar WJ, Smith RA (1998) Synergism between *Bacillus thuringiensis* Spores and Toxins against Resistant and Susceptible Diamondback Moths (*Plutella xylostella*). Appl Environ Microbiol 64:3

- Lladó S, López-Mondéjar R, Baldrian P (2017) Forest soil bacteria: Diversity, involvement in ecosystem processes, and response to global change. Microbiology and Molecular Biology Reviews 81. https://doi.org/https://doi.org/10.1128/MMBR.00063-16
- Llopis-Giménez A, Maria González R, Millán-Leiva A, Catalá M, Llacer E, Urbaneja A, Herrero S (2017) Novel RNA viruses producing simultaneous covert infections in *Ceratitis capitata*. Correlations between viral titers and host fitness, and implications for SIT programs. J Invertebr Pathol 143:50–60. https://doi.org/10.1016/J.JIP.2016.11.014
- Longchamp PF, Mauel C, Karamata D (1994) Lytic enzymes associated with defective prophages of *Bacillus subtilis*: Sequencing and characterization of the region comprising the N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase gene of prophage PBSX. Microbiology (N Y) 140:1855–1867. https://doi.org/10.1099/13500872-140-8-1855
- Loper JE, Henkels MD, Rangel LI, Olcott MH, Walker FL, Bond KL, Kidarsa TA, Hesse CN, Sneh B, Stockwell VO, Taylor BJ (2016) Rhizoxin analogs, orfamide A and chitinase production contribute to the toxicity of *Pseudomonas protegens* strain Pf-5 to Drosophila melanogaster. Environ Microbiol 18:3509–3521. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13369
- Lottenberg R, Minning-Wenz D, Boyle MDP (1994) Capturing host plasmin(ogen): a common mechanism for invasive pathogens? Trends Microbiol 2:20–24. https://doi.org/10.1016/0966-842X(94)90340-9
- Lowe TM, Eddy SR (1997) tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. Nucleic Acids Res 25:955–964. https://doi.org/10.1093/nar/25.5.955
- Lucchini S, Desiere F, Brüssow H (1999) Comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* phage species supports a modular evolution theory. J Virol 73:8647. https://doi.org/10.1128/JVI.73.10.8647-8656.1999
- Lund BM, Peck MW (2013) Clostridium botulinum. Guide to Foodborne Pathogens 91– 111. https://doi.org/10.1002/9781118684856.CH6
- Magaña C, Hernández-Crespo P, Ortego F, Castañera P (2007) Resistance to malathion in field populations of *Ceratitis capitata*. J Econ Entomol 100:1836–43. https://doi.org/10.1093/jee/100.6.1836
- Mahony J, Alqarni M, Stockdale S, Spinelli S, Feyereisen M, Cambillau C, van Sinderen D (2016) Functional and structural dissection of the tape measure protein of lactococcal phage TP901-1. Sci Rep 6:1–10. https://doi.org/10.1038/srep36667
- Mäkelä MR, Hildén K, Lundell TK (2010) Oxalate decarboxylase: Biotechnological update and prevalence of the enzyme in filamentous fungi. Appl Microbiol Biotechnol 87:801–814. https://doi.org/10.1007/S00253-010-2650-Z/TABLES/4

- Malacrida AR, Gomulski LM, Bonizzoni M, Bertin S, Gasperi G, Guglielmino CR (2007) Globalization and fruit fly invasion and expansion: the medfly paradigm. Genetica 131:1–9. https://doi.org/10.1007/s10709-006-9117-2
- Malan AP, Manrakhan A (2009) Susceptibility of the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) and the Natal fruit fly (*Ceratitis rosa*) to entomopathogenic nematodes. J Invertebr Pathol 100:47–49. https://doi.org/10.1016/J.JIP.2008.09.007
- Mallick IH, Winslet MC (2004) A review of the epidemiology, pathogenesis and management of tetanus. International Journal of Surgery 2:109–112. https://doi.org/10.1016/S1743-9191(06)60056-3
- Martin PAW, Traverst RS (1989) Worldwide abundance and distribution of Bac*illus thuringiensis* isolates. Appl Environ Microbiol 55
- Martinez-Ferrer MT, Campos JM, Fibla JM (2012) Field efficacy of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) mass trapping technique on clementine groves in Spain. Journal of Applied Entomology 136:181–190. https://doi.org/10.1111/J.1439-0418.2011.01628.X
- Martínez-Zavala SA, Barboza-Pérez UE, Hernández-Guzmán G, Bideshi DK, Barboza-Corona JE (2020) Chitinases of *Bacillus thuringiensis*: phylogeny, modular structure, and applied potentials. Front Microbiol 10:3032. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03032
- Maslowska KH, Makiela-Dzbenska K, Fijalkowska IJ (2019) The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage. Environ Mol Mutagen 60:368–384
- Matsui H, Sano Y, Ishihara H, Shinomiya T (1993) Regulation of pyocin genes in *Pseudomonas aeruginosa* by positive (prtN) and negative (prtR) regulatory genes. J Bacteriol 175:1257–1263
- Maxwell DP (1973) Oxalate formation in *Whetzelinia sclerotiorum* by oxaloacetate acetylhydrolase. Physiol Plant Pathol 3:279–288. https://doi.org/10.1016/0048-4059(73)90090-8
- McCabe O, Spinelli S, Farenc C, Labbé M, Tremblay D, Blangy S, Oscarson S, Moineau S, Cambillau C (2015) The targeted recognition of *Lactococcus lactis* phages to their polysaccharide receptors. Mol Microbiol 96:875–886. https://doi.org/10.1111/mmi.12978
- McConnell E, Richards AG (1959) The production by *Bacillus thuringiensis Berliner* of a heat-stable substance toxic for insects. Can J Microbiol 5:161–168. https://doi.org/10.1139/m59-020
- McDaniel LD, Young E, Delaney J, Ruhnau F, Ritchie KB, Paul JH (2010) High frequency of horizontal gene transfer in the oceans. Science (1979) 330:50. https://doi.org/10.1126/science.1192243
- Mcdonnell GE, Wood H, Devine KM, Mcconnell DJ (1994) Genetic control of bacterial suicide: regulation of the induction of PBSX in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 176:5820–5830

- McMahon SA, Roberts GA, Johnson KA, Cooper LP, Liu H, White JH, Carter LG, Sanghvi B, Oke M, Walkinshaw MD, Blakely GW, Naismith JH, Dryden DTF (2009) Extensive DNA mimicry by the ArdA anti-restriction protein and its role in the spread of antibiotic resistance. Nucleic Acids Res 37:4887. https://doi.org/10.1093/NAR/GKP478
- McQuade R, Stock SP (2018) Secretion systems and secreted proteins in gram-negative entomopathogenic bacteria: Their roles in insect virulence and beyond. Insects 9:68
- Mehta A, Datta A (1991) Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes*: Purification, characterization, and cDNA cloning. Journal of Biological Chemistry 266:23548–23553. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)54317-9
- Melo ALDA, Soccol VT, Soccol CR (2014) *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. Crit Rev Biotechnol 36:317–326. https://doi.org/10.3109/07388551.2014.960793
- Mendelsohn M, Kough J, Vaituzis Z, Matthews K (2003) Are Bt crops safe? Nat Biotechnol 21:1003–1009
- Mendoza-Almanza G, Esparza-Ibarra EL, Ayala-Luján JL, Mercado-Reyes M, Godina-González S, Hernández-Barrales M, Olmos-Soto J (2020) The cytocidal spectrum of *Bacillus thuringiensis* toxins: from insects to human cancer cells. Toxins (Basel) 12:301. https://doi.org/10.3390/TOXINS12050301
- Ménétrey J, Flatau G, Stura EA, Charbonnier JB, Gas F, Teulon JM, Du MH le, Boquetand
 P, Ménez A (2002) NAD binding induces conformational changes in Rho ADP-ribosylating *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme. Journal of Biological Chemistry 277:30950–30957. https://doi.org/10.1074/jbc.M201844200
- Merrill BD, Grose JH, Breakwell DP, Burnett SH (2014) Characterization of Paen*ibacillus larvae* bacteriophages and their genomic relationships to firmicute bacteriophages. BMC Genomics 15. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-745
- Mesrati LA, Tounsi S, Kamoun F, Jaoua S (2005) Identification of a promoter for the vegetative insecticidal protein-encoding gene vip3LB from *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiol Lett 247:101–104. https://doi.org/10.1016/J.FEMSLE.2005.04.032
- Meusch D, Gatsogiannis C, Efremov RG, Lang AE, Hofnagel O, Vetter IR, Aktories K, Raunser S (2014) Mechanism of Tc toxin action revealed in molecular detail. Nature 508:61–65. https://doi.org/10.1038/nature13015
- Michel-Briand Y, Baysse C (2002) The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. Biochimie 84:499–510
- Mihara T, Nishimura Y, Shimizu Y, Nishiyama H, Yoshikawa G, Uehara H, Hingamp P, Goto S, Ogata H (2016) Linking virus genomes with host taxonomy. Viruses 8:1–6. https://doi.org/10.3390/V8030066
- Miles LA, Dahlberg CM, Plescia J, Felez J, Kato K, Plow EF (1991) Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a

candidate plasminogen receptor. Biochemistry 30:1682–1691. https://doi.org/10.1021/bi00220a034

- Mizuki E, Park YS, Hiroyuki Saitoh ⁺, Yamashita S, Akao T, Higuchi K, Ohba M (2000) Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. Clinical and Diagnostic Laboratory Inmunology 7:625–634
- Mohamed SA, Wharton RA, Mérey G von, Schulthess F (2006) Acceptance and suitability of different host stages of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) and seven other tephritid fruit fly species to *Tetrastichus giffardii* Silvestri (Hymenoptera: Eulophidae). Biological Control 39:262–271. https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2006.08.016
- Molina AC, Caña-Roca JF, Osuna A, Vilchez S (2010) Selection of a *Bacillus pumilus* strain highly active against *Ceratitis capitata* (wiedemann) larvae. Appl Environ Microbiol 76:1320–1327. https://doi.org/10.1128/AEM.01624-09
- Montag D, Hashemolhosseini S, Henning U (1990) Receptor-recognizing proteins of Teven type bacteriophages. J Mol Biol 216:327–334. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80324-9
- Monzó C, Sabater-Muñoz B, Urbaneja A, Castañera P (2011) The ground beetle *Pseudophonus rufipes* revealed as predator of *Ceratitis capitata* in citrus orchards. Biological Control 56:17–21. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.09.004
- Mubarik NR, Mahagiani I, Anindyaputri A, Santoso S, Rusmana I (2010) Chitinolytic bacteria isolated from chili rhizosphere: Chitinase characterization and its application as biocontrol for whitefly (*Bemisia tabaci* Genn.). Am J Agric Biol Sci 5:430–435
- Müller S, Garcia-Gonzalez E, Mainz A, Hertlein G, Heid NC, Mösker E, van den Elst H, Overkleeft HS, Genersch E, Süssmuth RD (2014) Paenilamicin: Structure and biosynthesis of a hybrid nonribosomal peptide/polyketide antibiotic from the bee pathogen *Paenibacillus larvae*. Angewandte Chemie International Edition 53:10821–10825. https://doi.org/10.1002/ANIE.201404572
- Nagamatsu Y, Toda S, Yamaguchi F, Ogo M, Kogure M, Nakamura M, Shibata Y, Katsumoto T (1998) Identification of *Bombyx mori* midgut receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. Biosci Biotechnol Biochem 62:718–726. https://doi.org/10.1271/bbb.62.718
- Nagar S, Jain RK, Thakur VV, Gupta VK (2013) Biobleaching application of cellulase poor and alkali stable xylanase from *Bacillus pumilus* SV-85S. 3 Biotech 3:277–285. https://doi.org/10.1007/s13205-012-0096-y
- Nakajima K, Hamanoue M, Takemoto N, Hattori T, Kato K, Kohsaka S (1994) Plasminogen binds specifically to α-enolase on rat neuronal plasma membrane. J Neurochem 63:2048–2057. https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.1994.63062048.X
- Nakayama K, Takashima K, Ishihara H, Shinomiya T, Kageyama M, Kanaya S, Ohnishi M, Murata T, Mori H, Hayashi T (2000) The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa*

is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. Mol Microbiol 38:213–231. https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2000.02135.X

- Naruse N, Tenmyo O, Kobaru S, Kamei H, Miyaki T, Konishi M, Oki T (1989) Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. J Antibiot (Tokyo)
- Nascimento NA, Torres-Quintero MC, Molin SL, Pacheco S, Romão TP, Pereira-Neves A, Soberón M, Bravo A, Silva-Filha MHNL (2020) Functional *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa is necessary to synergize *Lysinibacillus sphaericus* Binary Toxin (Bin) against Bin-Resistant and -refractory mosquito species. Appl Environ Microbiol 86:e02770-19. https://doi.org/10.1128/AEM.02770-19
- Navarro-Llopis V, Alfaro F, Domínguez J, Sanchis J, Primo J (2008) Evaluation of traps and lures for mass trapping of Mediterranean fruit fly in citrus groves. J Econ Entomol 101:126–131. https://doi.org/10.1603/0022-0493
- Navarro-Llopis V, Ayala I, Sanchis J, Primo J, Moya P (2015) Field efficacy of a *Metarhizium anisopliae* -based attractant–contaminant device to control *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). J Econ Entomol 108:1570–1578. https://doi.org/10.1093/JEE/TOV157
- Navarro-Llopis V, Vacas S, Sanchis J, Primo J, Alfaro C (2011) Chemosterilant bait stations coupled with Sterile Insect Technique: An integrated strategy to control the Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). J Econ Entomol 104:1647–1655. https://doi.org/10.1603/EC10448
- Neung S, Xuan ·, Nguyen H, Kyaw ·, Naing W, Lee YS, Kil ·, Kim Y (2014) Insecticidal potential of *Paenibacillus elgii* HOA73 and its combination with organic sulfur pesticide on Diamondback Moth, *Plutella xylostella*. J Korean Soc Appl Biol Chem 57:181–186. https://doi.org/10.1007/s13765-013-4273-4
- Nicolas L, Charles J -F, de Barjac H (1993) *Clostridium bifermentans* serovar *malaysia*: Characterization of putative mosquito larvicidal proteins. FEMS Microbiol Lett 113:23–28. https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.1993.TB06482.X
- Nielsen-LeRoux C, Gaudriault S, Ramarao N, Lereclus D, Givaudan A (2012) How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. Curr Opin Microbiol 15:220–231. https://doi.org/10.1016/J.MIB.2012.04.006
- Nishiwaki H, Nakashima K, Ishida C, Kawamura T, Matsuda K (2007) Cloning, functional characterization, and mode of action of a novel insecticidal pore-forming toxin, Sphaericolysin, produced by *Bacillus sphaericus*. Appl Environ Microbiol 73:3404–3411. https://doi.org/10.1128/AEM.00021-07
- Nomura M (1967) Colicins and related bacteriocins. Annu Rev Microbiol 21:257–284. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.21.100167.001353
- Otsuji N, Sekiguchi M, lijima T, Takagi Y (1959) Induction of phage formation in the lysogenic *Escherichia coli* K-12 by mitomycin C. Nature 184:1079–1080

- Ohba M, Mizuki E, Uemori A (2009) Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. Anticancer Res 29
- Ohba M, Tantichodok A, Aizawa K (1981) Production of heat-stable exotoxin by *Bacillus thuringiensis* and related bacteria. J Invertebr Pathol 38:26–32. https://doi.org/10.1016/0022-2011(81)90030-6
- Ohnishi M, Kurokawa K, Hayashi T (2001) Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? Trends Microbiol 9:481–485. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02173-4
- Okamoto K, Mudd JA, Mangan J, Huang WM, Subbaiah TV, Marmur J (1968) Properties of the defective phage of *Bacillus subtilis*. J Mol Biol 34:413–428. https://doi.org/10.1016/0022-2836(68)90169-1
- Oku S, Komatsu A, Nakashimada Y, Tajima T, Kato J (2014) Identification of *Pseudomonas fluorescens* chemotaxis sensory proteins for malate, succinate, and fumarate, and their involvement in root colonization. Microbes Environ 29:413–419. https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14128
- Orlova M v, Smirnova TA, Ganushkina LA, Yacubovich VY, Azizbekyan RR (1998) Insecticidal activity of Bacillus laterosporus. Appl Environ Microbiol 64:2723–2725
- Ovruski S, Aluja M, Sivinski J, Wharton R (2000) Hymenopteran parasitoids on fruitinfesting Tephritidae (Diptera) in Latin America and the Southern United States: Diversity, distribution, taxonomic status and their use in fruit fly biological control. Integrated Pest Management Reviews 2000 5:2 5:81–107. https://doi.org/10.1023/A:1009652431251
- Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P (2014a) Bacillus thuringiensis toxins:
 An overview of their biocidal activity. Toxins (Basel) 6:3296–3325.
 https://doi.org/10.3390/toxins6123296
- Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, de Escudero IR, Caballero P (2014b) Molecular and insecticidal characterization of a novel Cry-related protein from *Bacillus thuringiensis* toxic against *Myzus persicae*. Toxins 2014, Vol 6, Pages 3144-3156 6:3144–3156. https://doi.org/10.3390/TOXINS6113144
- Palma L, Sara Hernández-Rodríguez C, Maeztu M, Hernández-Martínez P, Ruiz De Escudero I, Escriche B, Muñoz D, Rie J van, Ferré J, Caballero P (2012) Vip3C, a novel class of vegetative insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. Appl Environ Microbiol 78:7163–7165. https://doi.org/10.1128/AEM.01360-12
- Palmisano MM, Nakamura LK, Duncan KE, Istock CA, Cohan FM (2001) Bacillus sonorensis sp. nov., a close relative of Bacillus licheniformis, isolated from soil in the Sonoran Desert Arizona. Int J Syst Evol Microbiol 51:1671–1679. https://doi.org/10.1099/00207713-51-5-1671/CITE/REFWORKS
- Papadopoulos NT, Katsoyannos BI (2003) Field parasitism of *Ceratitis capitata* larvae by *Aganaspis daci* in Chios, Greece. BioControl 2003 48:2 48:191–195. https://doi.org/10.1023/A:1022651306249

- Pardo-López L, Soberón M, Bravo A (2013) Bacillus thuringiensis insecticidal threedomain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. FEMS Microbiol Rev 37:3–22. https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2012.00341.X
- Parker MW, Feil SC (2005) Pore-forming protein toxins: from structure to function. Prog Biophys Mol Biol 88:91–142. https://doi.org/10.1016/J.PBIOMOLBIO.2004.01.009
- Patel M, Jiang Q, Woodgate R, Cox MM, Goodman MF (2010) A new model for SOSinduced mutagenesis: how RecA protein activates DNA polymerase V. Crit Rev Biochem Mol Biol 45:171–184. https://doi.org/10.3109/10409238.2010.480968
- Patzer SI, Albrecht R, Braun V, Zeth K (2012) Structural and mechanistic studies of Pesticin, a bacterial homolog of phage lysozymes. J Biol Chem 287:23381–23396. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.362913
- Khil PR, Camerini-Otero D (2002) Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of *Escherichia coli*. Mol Microbiol 44:89–105
- Payet JP, Suttle CA (2013) To kill or not to kill: The balance between lytic and lysogenic viral infection is driven by trophic status. Limnol Oceanogr 58:465–474. https://doi.org/10.4319/LO.2013.58.2.0465
- Péchy-Tarr M, Bruck DJ, Maurhofer M, Fischer E, Vogne C, Henkels MD, Donahue KM, Grunder J, Loper JE, Keel C (2008) Molecular analysis of a novel gene cluster encoding an insect toxin in plant-associated strains of *Pseudomonas fluorescens*. Environ Microbiol 10:2368–2386. https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2008.01662.X
- Peña G, Miranda-Rios J, de La Riva G, Pardo-López L, Soberón M, Bravo A (2006) A Bacillus thuringiensis S-Layer protein involved in toxicity against Epilachna varivestis (Coleoptera: Coccinellidae). Appl Environ Microbiol 72:353. https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.353-360.2006
- Peng D, Lin J, Huang Q, Zheng W, Liu G, Zheng J, Zhu L, Sun M (2016) A novel metalloproteinase virulence factor is involved in *Bacillus thuringiensis* pathogenesis in nematodes and insects. Environ Microbiol 18:846–862. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13069
- Perchat S, Buisson C, Chaufaux J, Sanchis V, Lereclus D, Gohar M (2005) *Bacillus cereus* produces several nonproteinaceous insecticidal exotoxins. J Invertebr Pathol 90:131–133. https://doi.org/10.1016/J.JIP.2005.08.002
- Pereira Menezes Reis S, de Andrade Silva EM, Peres Gramacho K, Freitas Sena K, da Costa Silva D, Lima Aragão FJ, Cardoso Costa MG, Micheli F (2022) Transgenic tomato expressing an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina* sp. shows increased survival to *Moniliophthora perniciosa*. Sci Hortic 299:111004. https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2022.111004
- Perna NT, Mayhew GF, Gyo["] G, Po[']sfai G, Po[']sfai P, Elliott S, Donnenberg MS, Kaper JB, Blattner FR (1998) Molecular evolution of a pathogenicity island from

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infection and Inmunity 66:3810–3817

- Perry RD, Fetherston JD (1997) *Yersinia pestis* Etiologic agent of plague. Clin Microbiol Rev 10:35–66. https://doi.org/10.1128/CMR.10.1.35
- Petit L, Gibert M, Popoff MR (1999) *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. Trends Microbiol 7:104–110. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01430-9
- Pham TT, Jacobs-Sera D, Pedulla ML, Hendrix RW, Hatfull GF (2007) Comparative genomic analysis of mycobacteriophage Tweety: evolutionary insights and construction of compatible site-specific integration vectors for mycobacteria. Microbiology (N Y) 153:2711–2723. https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/008904-0
- Pigott CR, Ellar DJ (2007) Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. Microbiology and Molecular Biology Reviews 71:255–281. https://doi.org/10.1128/MMBR.00034-06
- Pingoud A, Jeltsch A (2001) Structure and function of type II restriction endonucleases. Survey and Summary 29:3705–3727
- Pingoud A, Wilson GG, Wende W (2014) Type II restriction endonucleases-a historical perspective and more. Nucleic Acids Res 42:7489–7527. https://doi.org/10.1093/nar/gku447
- Pinheiro VB, Ellar DJ (2007) Expression and insecticidal activity of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Photorhabdus luminescens* toxin complex proteins. Cell Microbiol 9:2372–2380. https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2007.00966.X
- Pope L, Yolton DP, 4rode LJ (1968) Crystalline inclusions of *Clostridium cochlearium*. J Bacteriol 96:1859–1862
- Pope WH, Bowman CA, Russell DA, Jacobs-Sera D, Asai DJ, Cresawn SG, Jacobs WR, Hendrix RW, Lawrence JG, Hatfull GF (2015) Whole genome comparison of a large collection of mycobacteriophages reveals a continuum of phage genetic diversity. Elife 4. https://doi.org/10.7554/ELIFE.06416
- Poppinga L, Janesch B, Fünfhaus A, Sekot G, Garcia-Gonzalez E, Hertlein G, Hedtke K, Schäffer C, Genersch E (2012) Identification and functional analysis of the S-Layer protein SpIA of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of american foulbrood of honey bees. PLoS Pathog 8:e1002716. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002716
- Prakash D, Pal M (1991) Nutritional and antinutritional composition of vegetable and grain amaranth leaves. J Sci Food Agric 57:573–583. https://doi.org/10.1002/JSFA.2740570410
- Prasanna L, Eijsink VGH, Meadow R, Gåseidnes S (2013) A novel strain of Brevib*acillus laterosporus* produces chitinases that contribute to its biocontrol potential. Appl Microbiol Biotechnol 97:1601–1611. https://doi.org/10.1007/s00253-012-4019-y
- Prehm P, Jann B, Jann K, Schmidt G, Stirm S (1976) On a bacteriophage T3 and T4 receptor region within the cell wall lipopolysaccharide of *Escherichia coli* B. J Mol Biol 101:277–281. https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90377-6

Priest FG (1977) Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Bacteriol Rev 41:711. https://doi.org/10.1128/BR.41.3.711-753.1977

- Quesada-Moraga E, Martin-Carballo I, Garrido-Jurado I, Santiago-Álvarez C (2008) Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Biological Control 47:115–124. https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2008.07.002
- Quesada-Moraga E, Ruiz-García a, Santiago-Alvarez C (2006) Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). J Econ Entomol 99:1955–1966. https://doi.org/10.1603/0022-0493-99.6.1955
- Qureshi N, Chawla S, Likitvivatanavong S, Lee HL, Gill SS (2014) The Cry toxin operon of *Clostridium bifermentans* subsp. *malaysia* is highly toxic to *Aedes* larval mosquitoes. Appl Environ Microbiol 80:5689. https://doi.org/10.1128/AEM.01139-14
- Rampelotto PH (2013) Extremophiles and extreme environments. Life 2013, Vol 3, Pages 482-485 3:482–485. https://doi.org/10.3390/LIFE3030482
- Rand N du, Laing MD (2011) Determination of insecticidal toxicity of three species of entomopathogenic spore-forming bacterial isolates against *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). Afr J Microbiol Res 5:2222–2228. https://doi.org/10.5897/AJMR11.069
- Rao VB, Feiss M (2015) Mechanisms of DNA packaging by large double-stranded DNA viruses. Annu Rev Virol 2:351–378. https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055212
- Raupach GS, Kloepper JW (1998) Biological control mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. Phytopathology 88:1158–1164
- Reyes-Ramírez A, Ibarra JE (2008) Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* type strains. Appl Environ Microbiol 74:125–129. https://doi.org/10.1128/AEM.02133-07
- Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J (2016) JSpeciesWS: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. Bioinformatics 32:929–931. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681
- Rivers DB, Vann CN, Zimmack HL, Dean DH (1991) Mosquitocidal activity of *Bacillus laterosporus*. J Invertebr Pathol 58:444–447. https://doi.org/10.1016/0022-2011(91)90191-R
- Roberts MS, Nakamura LK, C O W FM (1994) *Bacillus mojavensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and differences in fatty acid composition. Int J Syst Bacteriol 44:256–264
- Roderer D, Schubert E, Sitsel O, Raunser S (2019) Towards the application of Tc toxins as a universal protein translocation system. Nat Commun 10:5263. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13253-8
- Rodriguez-Almazan C, Ruiz de Escudero I, Cantón PE, Muñoz-Garay C, Pérez C, Gill SS, Soberón M, Bravo A (2011) The amino- and carboxyl-terminal fragments of the *Bacillus thuringensis* Cyt1Aa toxin have differential roles in toxin oligomerization and pore formation. Biochemistry 50:388–396. https://doi.org/10.1021/bi101239r
- Rodríguez-Rubio L, Gutiérrez D, Martínez B, Rodríguez A, Götz F, García P (2012) The tape measure protein of the *Staphylococcus aureus* bacteriophage vB_SauS-philPLA35 has an active muramidase domain. Appl Environ Microbiol 78:6369–6371
- Rohwer GG (1958) The mediterranean fruit fly in Florida: Past, present, and future. Fla Entomol 41:23. https://doi.org/10.2307/3492630
- Rojas-Pinzón PA, Dussán J (2017) Contribution of *Lysinibacillus sphaericus* hemolysin and chitin-binding protein in entomopathogenic activity against insecticide resistant *Aedes aegypti*. World J Microbiol Biotechnol 33:1–9. https://doi.org/10.1007/S11274-017-2348-9
- Romeis J, Meissle M, Bigler F (2006) Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. Nat Biotechnol 24:63–71. https://doi.org/10.1038/nbt1180
- Rooney AP, Price NPJ, Ehrhardt C, Sewzey JL, Bannan JD (2009) Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 59:2429–2436. https://doi.org/10.1099/IJS.0.009126-0/CITE/REFWORKS
- Rose EAF, Harris RJ, Glare TR, Rose EAF (2010) Possible pathogens of social wasps (Hymenoptera: Vespidae) and their potential as biological control agents. Nex Zealand Journal of Zoology 26:179–190. https://doi.org/10.1080/03014223.1999.9518188
- Rosenberg AH, Lade BN, Dao-shan C, Lin SW, Dunn JJ, Studier FW (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. Gene 56:125–135. https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90165-X
- Roy A, Cingolani G (2012) Structure of P22 headful packaging nuclease. Journal of Biological Chemistry 287:28196–28205. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.349894
- Ruffner B, Péchy-Tarr M, Ryffel F, Hoegger P, Obrist C, Rindlisbacher A, Keel C, Maurhofer M (2013) Oral insecticidal activity of plant-associated pseudomonads. Environ Microbiol 15:751–763. https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2012.02884.X
- Ruiu L (2013) *Brevibacillus laterosporus,* a pathogen of invertebrates and a broadspectrum antimicrobial species. Insects 4:476. https://doi.org/10.3390/INSECTS4030476
- Ruiu L, Delrio G, Ellar DJ, Floris I, Paglietti B, Rubino S, Satta A (2006) Lethal and sublethal effects of *Brevibacillus laterosporus* on the housefly (*Musca domestica*). Entomol Exp Appl 118:137–144. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2006.00370.x

- Ruiu L, Falchi G, Floris I, Marche MG, Mura ME, Satta A (2015) Pathogenicity and characterization of a novel *Bacillus cereus sensu lato* isolate toxic to the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* Wied. J Invertebr Pathol 126:71–77. https://doi.org/10.1016/J.JIP.2015.01.010
- Ruiu L, Floris I, Satta A, Ellar DJ (2007a) Toxicity of a *Brevibacillus laterosporus* strain lacking parasporal crystals against *Musca domestica* and *Aedes aegypti*. Biological Control 43:136–143. https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2007.07.002
- Ruiu L, Mura ME (2021) Oral toxicity of *Pseudomonas protegens* against muscoid flies. Toxins 2021, Vol 13, Page 772 13:772. https://doi.org/10.3390/TOXINS13110772
- Ruiu L, Satta A, Floris I (2007b) Susceptibility of the house fly pupal parasitoid Muscidifurax raptor (Hymenoptera: Pteromalidae) to the entomopathogenic bacteria Bacillus thuringiensis and Brevibacillus laterosporus. Biological Control 43:188–194. https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2007.08.005
- Ruiu L, Satta A, Floris I (2013) Emerging entomopathogenic bacteria for insect pest management. Bull Insectology 66:181–186
- Ruiu L, Satta A, Floris I (2012) Observations on house fly larvae midgut ultrastructure after *Brevibacillus laterosporus* ingestion. J Invertebr Pathol 111:211–216. https://doi.org/10.1016/J.JIP.2012.08.005
- Ruiz de Escudero I, Banyuls N, Bel Y, Maeztu M, Escriche B, Muñoz D, Caballero P, Ferré J (2014) A screening of five *Bacillus thuringiensis* Vip3A proteins for their activity against lepidopteran pests. J Invertebr Pathol 117:51–55. https://doi.org/10.1016/J.JIP.2014.01.006
- Rutherford K, Yuan P, Perry K, Sharp R, van Duyne GD (2013) Attachment site recognition and regulation of directionality by the serine integrases. Nucleic Acids Res 41:8341– 8356. https://doi.org/10.1093/nar/gkt580
- Ryu CM, Hu CH, Reddy MS, Kloepper JW (2003) Different signaling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathovars of *Pseudomonas syringae*. New Phytologist 160:413–420. https://doi.org/10.1046/J.1469-8137.2003.00883.X
- Saggese A, de Luca Y, Baccigalupi L, Ricca E (2022) An antimicrobial peptide specifically active against *Listeria monocytogenes* is secreted by *Bacillus pumilus* SF214. BMC Microbiol 22. https://doi.org/10.1186/S12866-021-02422-9
- Saikia R, Gogoi DK, Mazumder S, Yadav A, Sarma RK, Bora TC, Gogoi BK (2011) Brevibacillus laterosporus strain BPM3, a potential biocontrol agent isolated from a natural hot water spring of Assam, India. Microbiol Res 166:216–225. https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2010.03.002
- Sakurai J, Nagahama M, Oda M, Tsuge H, Kobayashi K (2009) *Clostridium perfringens* Iota-toxin: structure and function. Toxins (Basel) 1:208–228. https://doi.org/10.3390/toxins1020208
- Salama HS, Foda MS, El-Bendary MA, Abdel-Razek A (2004) Infection of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*, by spore-forming bacilli indigenous to its natural

habitat in Egypt. J Pest Sci (2004) 77:27–31. https://doi.org/10.1007/s10340-003-0023-4

- Sánchez G, Murúa F, Suárez L, van Nieuwenhove G, Taret G, Pantano V, Bilbao M, Schliserman P, Ovruski SM (2016) Augmentative releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) for *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) control in a fruit-growing region of Argentina. Biological Control 103:101–107. https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2016.08.002
- São-José C, Baptista C, Santos MA (2004) *Bacillus subtilis* operon encoding a membrane receptor for bacteriophage SPP1. J Bacteriol 186:8337–8346. https://doi.org/10.1128/JB.186.24.8337-8346.2004
- Sattar S, Maiti MK (2011) Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* effective against sap-sucking insect pest. J Microbiol Biotechnol 21:937–946. https://doi.org/10.4014/JMB.1105.05030
- Satyaprakash M, Satyaprakash M, Nikitha T, Reddi EUB, Sadhana B, Satya Vani S (2017) Phosphorous and Phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition. Int J Curr Microbiol Appl Sci 6:2133–2144. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.604.251
- Schirmer J, Just I, Aktories K (2002) The ADP-ribosylating mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus*. Journal of Biological Chemistry 277:11941–11948. https://doi.org/10.1074/jbc.m108463200
- Schnepf E, Crickmore N, van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62:775–806. https://doi.org/https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.775-806.1998
- Schriefer EM, Hoffmann-Thoms S, Schmid FX, Schmid A, Heesemann J (2013) *Yersinia enterocolitica* and *Photorhabdus asymbiotica* β-lactamases BlaA are exported by the twin-arginine translocation pathway. International Journal of Medical Microbiology 303:16–24. https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2012.11.002
- Schwartz M (1975) Reversible interaction between coliphage lambda and its receptor protein. J Mol Biol 99:185–201. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(75)80167-7
- Šebesta K, Horská K (1970) Mechanism of inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. Biochim Biophys Acta 209:357–367. https://doi.org/10.1016/0005-2787(70)90734-3
- Sharma A, Thakur DR, Kanwar S, Chandla VK (2013) Diversity of entomopathogenic bacteria associated with the white grub, *Brahmina coriacea*. J Pest Sci (2004) 86:261–273. https://doi.org/10.1007/s10340-012-0459-5
- Sharma S, Waterfield N, Bowen D, Rocheleau T, Holland L, James R, Ffrench-Constant R (2002) The lumicins: novel bacteriocins from *Photorhabdus luminescens* with similarity to the uropathogenic-specific protein (USP) from uropathogenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 214:241–249. https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2002.TB11354.X

- Sharma V, Singh PK, Midha S, Ranjan M, Korpole S, Patil PB (2012) Genome sequence of Brevibacillus laterosporus strain GI-9. Genome Announc 1279. https://doi.org/10.1128/JB.06659-11
- Sheets JJ, Hey TD, Fencil KJ, Burton SL, Ni W, Lang AE, Benz R, Aktories K (2011) Insecticidal toxin complex proteins from *Xenorhabdus nematophilus*: Structure and pore formation. Journal of Biological Chemistry 286:22742–22749. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.227009
- Shelly T, Epsky N, Jang EB, Reyes-Flores J, Vargas R (2014) Trapping and the detection, control, and regulation of tephritid fruit flies. Springer Netherlands
- Shi Y, Ma W, Yuan M, Sun F, Pang Y (2007) Cloning of vip1/vip2 genes and expression of Vip1Ca/Vip2Ac proteins in *Bacillus thuringiensis*. World J Microbiol Biotechnol 23:501–507. https://doi.org/10.1007/S11274-006-9252-Z/FIGURES/4

Shi Y, Xu W, Yuan M, Tang M, Chen J, Pang Y (2004) Expression of vip1/vip2 genes in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and the analysis of their signal peptides. J Appl Microbiol 97:757–765. https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2004.02365.X

- Shinagawa K (1990) Analytical methods for *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. Int J Food Microbiol 10:125–141. https://doi.org/10.1016/0168-1605(90)90061-9
- Siebert JB (1991) The potential impact of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wied.), upon establishment in California: an update. California Agricultural Experiment Station 1–40
- Silva CP, Waterfield NR, Daborn PJ, Dean P, Chilver T, Au CPY, Sharma S, Potter U, Reynolds SE, Ffrench-Constant RH (2002) Bacterial infection of a model insect: *Photorhabdus luminescens* and *Manduca sexta*. Cell Microbiol 4:329–339. https://doi.org/10.1046/J.1462-5822.2002.00194.X
- Silvestri F (1945) Description and biology of the staphylinid, *B. rufipennis*, F., introduced into Italy against Trypetid flies. Bollettino del Laboratorio di entomologia agraria 312–326
- Simon LD, Anderson TF (1967a) The infection of *Escherichia coli* by T2 and T4 bacteriophages as seen in the electron microscope II. Structure and function of the baseplate. Virology 32:298–305. https://doi.org/10.1016/0042-6822(67)90278-4
- Simon LD, Anderson TF (1967b) The infection of *Escherichia coli* by T2 and T4 bacteriophages as seen in the electron microscope I. Attachment and penetration. Virology 32:279–297. https://doi.org/10.1016/0042-6822(67)90277-2
- Singer S (1996) The utility of strains of morphological group II *Bacillus*. Adv Appl Microbiol 42:219–261. https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70374-5
- Singh AK, Singh A, Joshi P (2016) Combined application of chitinolytic bacterium *Paenibacillus* sp. D1 with low doses of chemical pesticides for better control of *Helicoverpa armigera*. Int J Pest Manag 62:222–227. https://doi.org/10.1080/09670874.2016.1167267

- Singh J, Banerjee N (2008) Transcriptional analysis and functional characterization of a gene pair encoding iron-regulated xenocin and immunity proteins of *Xenorhabdus nematophila*. J Bacteriol 190:3877–3885. https://doi.org/10.1128/JB.00209-08
- Singh P, Park D, Forst S, Banerjee N (2013) Xenocin export by the flagellar type III pathway in *Xenorhabdus nematophila*. J Bacteriol 195:1400–1410. https://doi.org/10.1128/JB.01532-12/SUPPL FILE/ZJB999092488SO1.PDF
- Singh PK, Chittpurna, Ashish, Sharma V, Patil PB, Korpole S (2012) Identification, purification and characterization of Laterosporulin, a novel bacteriocin produced by *Brevibacillus* sp. strain GI-9. PLoS One 7. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0031498
- Singh SM, Panda AK (2005) Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. J Biosci Bioeng 99:303–310. https://doi.org/10.1263/JBB.99.303
- Sjöde A, Winestrand S, Nilvebrant NO, Jönsson LJ (2008) Enzyme-based control of oxalic acid in the pulp and paper industry. Enzyme Microb Technol 43:78–83. https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2007.11.014

Skurnik M, Strauch E (2006) Phage therapy: Facts and fiction. International Journal of Medical Microbiology 296:5–14. https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2005.09.002

- Smith HO (1979) Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases. Science (1979) 205:455–462. https://doi.org/10.1126/science.377492
- Soberón M, Gill SS, Bravo A (2009) Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? Cellular and Molecular Life Sciences 2009 66:8 66:1337–1349. https://doi.org/10.1007/S00018-008-8330-9
- Soberón M, López-Díaz JA, Bravo A (2013) Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. Peptides (NY) 41:87–93. https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2012.05.023
- Song Z, Liu K, Lu C, Yu J, Ju R, Liu X (2019) Isolation and characterization of a potential biocontrol *Brevibacillus laterosporus*. Advanced Journal of Microbiology Research 13:1–007
- Sood S, Steinmetz H, Beims H, Mohr KI, Stadler M, Djukic M, von der Ohe W, Steinert M, Daniel R, Müller R (2014) Paenilarvins: Iturin family lipopeptides from the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. ChemBioChem 15:1947–1955. https://doi.org/10.1002/CBIC.201402139
- Sorokin YI (1973) Trophical role of bacteria in the ecosystem of the coral reef. Nature 1973 242:5397 242:415–417. https://doi.org/10.1038/242415a0
- Sosa MF, Sobrero P, Valverde C, Agaras B (2020) A black-pigmented pseudomonad isolate with antibacterial activity against phyllospheric pathogens. Rhizosphere 15:100207. https://doi.org/10.1016/J.RHISPH.2020.100207
- Spanier B, Starke M, Higel F, Scherer S, Fuchs TM, Biochemie A, Mikrobiologie A (2010)Yersinia enterocolitica infection and tcaA-dependent killing of Caenorhabditiselegans.ApplEnvironMicrobiol76:6277–6285.https://doi.org/10.1128/AEM.01274-10

- Splittstoesser CM, Kawanishi CY, Tashiro H (1978) Infection of the european chafer, Amphimallon majalis by Bacillus popilliae: Light and electron microscope observations. J Invertebr Pathol 31:84–90. https://doi.org/10.1016/0022-2011(78)90112-X
- Springer K, Sänger PA, Moritz C, Felsl A, Rattei T, Fuchs TM (2018) Insecticidal toxicity of Yersinia frederiksenii involves the novel enterotoxin YacT. Front Cell Infect Microbiol 8:392. https://doi.org/10.3389/FCIMB.2018.00392/BIBTEX
- Sprizhitsky YA, Kopylov VM (1983) The SOS system of *Escherichia coli* in the regulation of bacteriophage λ development. FEBS Lett 160:7–10. https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80925-9
- Sree S, Varma A (2015) Biocontrol of lepidopteran pests. Springer International Publishing, Cham
- Srividhya K v., Rao G v, Raghavenderan L, Mehta P, Prilusky J, Manicka S, Sussman JL,
 Krishnaswamy S (2006) Database and comparative identification of prophages. In:
 Intelligent Control and Automation. Springer Berlin Heidelberg, pp 863–868
- Stanton TB, Humphrey SB, Bayles DO, Zuerner RL (2009) Identification of a divided genome for VSH-1, the prophage-like gene transfer agent of *Brachyspira hyodysenteriae*. J Bacteriol 191:1719–1721. https://doi.org/10.1128/JB.01359-08
- Starke M, Richter M, Fuchs TM (2013) The insecticidal toxin genes of *Yersinia enterocolitica* are activated by the thermolabile LTTR-like regulator TcaR2 at low temperatures. Mol Microbiol 89:596–611. https://doi.org/10.1111/MMI.12296
- Stenfors Arnesen LP, Fagerlund A, Granum PE (2008) From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol Rev 32:579–606. https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2008.00112.X
- Stout JD (2012) A bacterial survey of some New Zealand forest lands, grasslands, and peats. New Zealand Journal of Agricultural Research 4:1–30. https://doi.org/10.1080/00288233.1961.10419918
- Strauch E, Kaspar H, Schaudinn C, Dersch P, Madela K, Gewinner C, Hertwig S, Wecke J, Appel B (2001) Characterization of enterocoliticin, a phage tail-like bacteriocin, and its effect on pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. Appl Environ Microbiol 67:5634–5642. https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5634-5642.2001
- Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA (2011) Easyfig: a genome comparison visualizer.BioinformaticsApplicationsNote27:1009–1010.https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr039
- Suttle CA (2005) Viruses in the sea. Nature 437:356–361. https://doi.org/10.1038/nature04160
- Swiecicka I, Bideshi DK, Federici BA (2008) Novel isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* that produces a quasicuboidal crystal of Cry1Ab21 toxic to larvae of *Trichoplusia* ni. Appl Environ Microbiol 74:923. https://doi.org/10.1128/AEM.01955-07

- Tambong JT, Xu R, Sadiku A, Chen Q, Badiss A, Yu Q (2014) Molecular detection and analysis of a novel metalloprotease gene of entomopathogenic *Serratia marcescens* strains in infected *Galleria mellonella*. Can J Microbiol 60:203–209. https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0864
- Tamez-Guerra P, Iracheta MM, Pereyra-Alférez B, Galán-Wong LJ, Gomez-Flores R, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C (2004) Characterization of Mexican *Bacillus thuringiensis* strains toxic for lepidopteran and coleopteran larvae. J Invertebr Pathol 86:7–18. https://doi.org/10.1016/J.JIP.2004.02.009
- Tamiya T, Okahashi N, Sakuma R, Aoyama T, Akahane T, Matsumoto JJ (1985) Freeze denaturation of enzymes and its prevention with additives. Cryobiology 22:446–456. https://doi.org/10.1016/0011-2240(85)90156-7
- Tanner A, Bornemann S (2000) Bacillus subtilis yvrK is an acid-induced oxalatedecarboxylase.JBacteriol182:5271–5273.https://doi.org/10.1128/JB.182.18.5271-5273.2000/FORMAT/EPUB
- Tanner A, Bowater L, Fairhurst SA, Bornemann S (2001) Oxalate decarboxylase requires manganese and dioxygen for activity: Overexpression and characterization of *Bacillus subtilis* YvrK and YoaN. Journal of Biological Chemistry 276:43627–43634. https://doi.org/10.1074/JBC.M107202200
- Tavares P, Santos MA, Lurz R, Morelli G, de Lencastre H, Trautner TA (1992) Identification of a gene in *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 determining the amount of packaged DNA. J Mol Biol 225:81–92. https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)91027-M
- Taylor NMI, Prokhorov NS, Guerrero-Ferreira RC, Shneider MM, Browning C, Goldie KN, Stahlberg H, Leiman PG (2016) Structure of the T4 baseplate and its function in triggering sheath contraction. Nature 2016 533:7603 533:346–352. https://doi.org/10.1038/nature17971
- Tétart F, Desplats C, Krisch HM (1998) Genome plasticity in the distal tail fiber locus of the T-even bacteriophage: recombination between conserved motifs swaps adhesin specificity. J Mol Biol 282:543–556. https://doi.org/10.1006/JMBI.1998.2047
- Tétart F, Repoila F, Monod C, Krisch HM (1996) Bacteriophage T4 host range is expanded by duplications of a small domain of the tail fiber adhesin. J Mol Biol 258:726–731. https://doi.org/10.1006/JMBI.1996.0281
- Thanabalu T, Hindley J, Jackson-Yap J, Berry C (1991) Cloning, sequencing, and expression of a gene encoding a 100-kilodalton mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. J Bacteriol 173:2776–2785
- Thomas WE, Ellar DJ (1983) Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* insecticidal δ-endotoxin. FEBS Lett 154:362–368. https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80183-5

Thurston GS, Kaya HK, Burlando TM, Harrison RE (1993) Milky disease bacterium as a stressor to increase susceptibility of scarabaeid larvae to an entomopathogenic nematode. J Invertebr Pathol 61:167–172. https://doi.org/10.1006/JIPA.1993.1030

- Thurston GS, Kaya HK, Gaugler R (1994) Characterizing the enhanced susceptibility of milky disease-infected scarabaeid grubs to entomopathogenic nematodes. Biological Control 4:67–73. https://doi.org/10.1006/BCON.1994.1012
- Toledo J, Liedo P, Williams T, Ibarra J (1999) Toxicity of *Bacillus thuringiensis*-exotoxin to three species of fruit flies (Diptera: Tephritidae). J Econ Entomol 92:1052–1056
- Trojet SN, Caumont-Sarcos A, Perrody E, Comeau AM, Krisch HM (2011) The gp38 Adhesins of the T4 superfamily: A complex modular determinant of the phage's host specificity. Genome Biol Evol 3:674–686. https://doi.org/10.1093/gbe/evr059
- Trought TET, Jackson TA, French RA (1982) Incidence and transmission of a disease of grass grub *(Costelytra zealandica)* in Canterbury. New Zealand Journal of Experimental Agriculture 10:79–82. https://doi.org/10.1080/03015521.1982.10427847
- Tsai SF, Liu BL, Liao JW, Wang JS, Hwang JS, Wang SC, Tzeng YM, Ho SP (2003) Pulmonary toxicity of thuringiensin administered intratracheally in Sprague-Dawley rats. Toxicology 186:205–216. https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00744-8
- Tsai SF, Yang C, Liu BL, Hwang JS, Ho SP (2006) Role of oxidative stress in thuringiensininduced pulmonary toxicity. Toxicol Appl Pharmacol 216:347–353. https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2006.05.013
- Tsuge H, Nagahama M, Nishimura H, Hisatsune J, Sakaguchi Y, Itogawa Y, Katunuma N, Sakurai J (2003) Crystal structure and site-directed mutagenesis of enzymatic components from *Clostridium perfringens* Iota-toxin. J Mol Biol 325:471–483. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01247-0
- Turnbull PC, Kramer JM, Jørgensen K, Gilbert RJ, Melling J (1979) Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal, and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. Am J Clin Nutr 32:219–228. https://doi.org/10.1093/AJCN/32.1.219
- Uad I, Toledo FL, Pozo C, Silva GA, Gonzalez-Lopez J, Calvo C (2007) Caracterización de bacterias productoras de bioemulgentes aisladas de ambientes marinos. In: XXI Congr. Nac. Microbiol. Sociedad Española de Microbiología. Seville, Spain, p 292
- Underwood RM, Currie RW (2009) Indoor winter fumigation with formic acid for control of *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae) and Nosema Disease, *Nosema* sp. J Econ Entomol 102:1729–1736. https://doi.org/10.1603/029.102.0501
- Uratani Y, Hoshino T (1984) Pyocin R1 inhibits active transport in *Pseudomonas aeruginosa* and depolarizes membrane potential. J Bacteriol 157:632–636. https://doi.org/10.1128/jb.157.2.632-636.1984
- Vaaje-Kolstad G, Houston DR, Riemen AHK, Eijsink VGH, van Aalten DMF (2005) Crystal structure and binding properties of the *Serratia marcescens* chitin-binding protein CBP21. Journal of Biological Chemistry 280:11313–11319. https://doi.org/0.1074/jbc.M407175200

- Vachon V, Laprade R, Schwartz JL (2012) Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. J Invertebr Pathol 111:1–12. https://doi.org/10.1016/J.JIP.2012.05.001
- Vadlamudi RK, Ji TH, Bulla LA (1993) A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. Journal of Biological Chemistry 268:12334–12340. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)31394-2
- Valaitis AP, Jenkins JL, Lee MK, Dean DH, Garner KJ (2001) Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity. Arch Insect Biochem Physiol 46:186–200. https://doi.org/10.1002/ARCH.1028
- Vallejo LF, Rinas U (2004) Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. Microb Cell Fact 3:1–12. https://doi.org/10.1186/1475-2859-3-11
- Veesler D, Cambillau C (2011) A common evolutionary origin for tailed-bacteriophage functional modules and bacterial machineries. Microbiology and Molecular Biology Reviews 75:423–433. https://doi.org/10.1128/MMBR.00014-11
- Vesala L, McQuade RM, Kamiya K, Kodera N, Kuraishi T, Nonaka S, Salim E, Hori A, Nainu F, Meidianto Asri R, Masyita A, Nishiuchi T, Takeuchi S (2020) Molecular and functional analysis of pore-forming toxin Monalysin from entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila*. Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org 1:520. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00520
- Vidal-Quist JC, P. Castañera, J. González-Cabrera (2009) Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from citrus orchards in Spain and evaluation of their insecticidal activity against *Ceratitis capitata*. J Microbiol Biotechnol 19:749–759
- Vincze T, Posfai J, Roberts RJ (2003) NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. Nucleic Acids Res 31:3688–3691. https://doi.org/10.1093/NAR/GKG526
- Viscarret MM, la Rossa R, Segura DF, Ovruski SM, Cladera JL (2006) Evaluation of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) reared on a genetic sexing strain of *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). Biological Control 36:147–153. https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2005.08.009
- Visschedyk DD, Perieteanu AA, Turgeon ZJ, Fieldhouse RJ, Dawson JF, Merrill AR (2010) Photox, a novel actin-targeting mono-ADP-ribosyltransferase from *Photorhabdus luminescens*. Journal of Biological Chemistry 285:13525–13534. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.077339
- Vodovar N, Vallenet D, Cruveiller S, Rouy Z, Barbe V, Acosta C, Cattolico L, Jubin C, Lajus A, Segurens B, Benoı^{*}t Vacherie B, Wincker P, Weissenbach J, Lemaitre B, Médigue C, Boccard F (2006) Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. Nat Biotechnol 24:3. https://doi.org/10.1038/nbt1212

Vodovar N, Vinals M, Liehl P, Basset A, Degrouard J, Spellman P, Boccard F, Lemaitre B (2005) Drosophila host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. Proceedings of the National Academy of Sciences 102:11414–11419. https://doi.org/10.1073/pnas.0502240102

von Ihering (1901) Laranjas bichadas. Revista Agrícola 6:179–181

- Waldor MK, Mekalanos JJ (1996) Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science (1979) 272:1910–1913. https://doi.org/10.1126/science.272.5270.1910
- Walker GC (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. Microbiol Rev 48:60. https://doi.org/10.1128/MR.48.1.60-93.1984
- Wallace KB, Eellst V M C Madeira JT, Cortopassi G, Jones DP (1997) Mitochondriamediated cell injury. Fundamental and Applied Toxicology 38:23–37
- Wang M, Geng L, Xue B, Wang Z, Xu W, Shu C, Zhang J (2021) Structure characteristics and function of a novel extracellular polysaccharide from *Bacillus thuringiensis* strain 4D19. Int J Biol Macromol 189:956–964. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.08.193
- Wang X, Cheng J, Shen J, Liu L, Li N, Gao N, Jiang F, Jin Q (2022) Characterization of *Photorhabdus* virulence cassette as a causative agent in the emerging pathogen *Photorhabdus asymbiotica*. Sci China Life Sci 65:618–630. https://doi.org/10.1007/S11427-021-1955-4
- Warren G. (1997) Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. In: N Carozzi, M Koziel (eds) Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants . London, pp 109–121
- Waterfield N, Hares M, Yang G, Dowling A, Ffrench-Constant R (2005a) Potentiation and cellular phenotypes of the insecticidal toxin complexes of *Photorhabdus* bacteria. Cell Microbiol 7:373–382. https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2004.00467.X
- Waterfield N, Kamita SG, Hammock BD, Ffrench-Constant R (2005b) The *Photorhabdus* Pir toxins are similar to a developmentally regulated insect protein but show no juvenile hormone esterase activity. FEMS Microbiol Lett 245:47–52. https://doi.org/10.1016/J.FEMSLE.2005.02.018
- Waterfield NR, Bowen DJ, Fetherston JD, Perry RD, Ffrench-Constant RH (2001) The tc genes of *Photorhabdus*: a growing family. Trends Microbiol 9:185–191. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)01978-3
- Waterfield NR, Daborn PJ, Ffrench-Constant RH (2002) Genomic islands in *Photorhabdus*. Trends Microbiol 10:541–545. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02463-0
- Waterfield NR, Daborn PJ, Ffrench-Constant RH (2004) Insect pathogenicity islands in the insect pathogenic bacterium *Photorhabdus*. Physiol Entomol 29:240–250. https://doi.org/10.1111/J.0307-6962.2004.00407.X

Wei JZ, Hale K, Carta L, Platzer E, Wong C, Fang SC, Aroian R v. (2003) *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. Proc Natl Acad Sci U S A 100:2760–2765.

https://doi.org/10.1073/PNAS.0538072100/SUPPL_FILE/8072TABLE_3.HTML

- Weselowski B, Nathoo N, Eastman AW, MacDonald J, Yuan ZC (2016) Isolation, identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* CR1 with potentials for biopesticide, biofertilization, biomass degradation and biofuel production. BMC Microbiol 16:1–10. https://doi.org/10.1186/S12866-016-0860-Y/FIGURES/6
- Wharton RA, Gilstrap FE (1983) Key and status of Opiine braconid (Hymenoptera) parasitoids used in biological control of *Ceratitis* and *Dacus* s. l. (Diptera: Tephritidae). Ann Entomol Soc Am 76:721–742. https://doi.org/10.1093/AESA/76.4.721
- White PJ, Lotay HK (1980) Minimal nutritional requirements of *Bacillus sphaericus* NCTC 9602 and 26 other strains of this species: The majority grow and sporulate with acetate as sole major source of carbon. J Gen Microbiol 118:13–19. https://doi.org/10.1099/00221287-118-1-13/CITE/REFWORKS
- Whiting GC, Evans JT, Patel S, Gillespie SH (2002) Purification of native alpha-enolase from *Streptococcus pneumoniae* that binds plasminogen and is immunogenic. J Med Microbiol 51:837–843. https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-10-837
- Wilcox RM, Fuhrman JA (1994) Bacterial viruses in coastal seawater: lytic rather than lysogenic production. Mar Ecol Prog Ser 114:35–45
- William P Donovan, James T Engleman, Judith C Donovan, James A Baum, Greg J Bunkers, David J Chi, William P Clinton, Leigh English, Gregory R Heck, Oliver M Ilagan, Karina C Krasomil-Osterfeld, John W Pitkin, James K Roberts, Matthew R Walters (2006) Discovery and characterization of Sip1A: a novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. Appl Microbiol Biotechnol 72:713–719. https://doi.org/10.1007/s00253-006-0332-7

Hiatt W, Owades J (1987) Oxalic acid removal in beer production US Patent 4652452

- Wold F, Ballou CE (1957) Studies on the enzyme Enolase. Journal of Biological Chemistry 227:301–312. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)70816-8
- Wong TTY, McInnis DO, Nishimoto JI, Ota AK, Chang VCS (1984) Predation of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) by the Argentine ant (Hymenoptera: Formicidae) in Hawaii. J Econ Entomol 77:1454–1458. https://doi.org/10.1093/JEE/77.6.1454
- Wood HE, Dawson MT, Devine KM, McConnell DJ (1990a) Characterization of PBSX, a defective prophage of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 172:2667–2674. https://doi.org/10.1128/jb.172.5.2667-2674.1990
- Wood HE, Devine KM, McConnell DJ (1990b) Characterisation of a repressor gene (xre) and a temperature-sensitive allele from the *Bacillus subtilis* prophage, PBSX. Gene 96:83–88. https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90344-Q

- Xin N, Ren YL, Forrester RI, Ming X, Mahon D (2008) Toxicity of ethyl formate to adult Sitophilus oryzae (L.), Tribolium castaneum (herbst) and Rhyzopertha dominica (F.).
 J Stored Prod Res 44:241–246. https://doi.org/10.1016/J.JSPR.2008.02.003
- Xu C, Wang BC, Yu Z, Sun M (2014) Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin Toxins. Toxins (Basel) 6:2732–2770. https://doi.org/10.3390/TOXINS6092732
- Xu Z, Horwich AL, Sigler PB (1997) The crystal structure of the asymmetric GroEL–GroES– (ADP)7 chaperonin complex. Nature 1997 388:6644 388:741–750. https://doi.org/10.1038/41944
- Yaman M, Ertürk Ö, Aslan I (2010) Isolation of some pathogenic bacteria from the great spruce bark beetle, *Dendroctonus micans* and its specific predator, *Rhizophagus grandis*. Folia Microbiol (Praha) 55:35–38. https://doi.org/10.1007/s12223-010-0006-9
- Yang G, Dowling AJ, Gerike U, ffrench-Constant RH, Waterfield NR (2006) *Photorhabdus* virulence cassettes confer injectable insecticidal activity against the wax moth. J Bacteriol 188:2254–2261. https://doi.org/10.1128/JB.188.6.2254-2261.2006
- Yang G, Hernández-Rodríguez CS, Beeton ML, Wilkinson P, ffrench-Constant RH, Waterfield NR (2012a) Pdl1 Is a putative lipase that enhances *Photorhabdus* toxin complex secretion. PLoS Pathog 8:e1002692. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002692
- Yang J, Zeng HM, Lin HF, Yang XF, Liu Z, Guo LH, Yuan JJ, Qiu DW (2012b) An insecticidal protein from *Xenorhabdus budapestensis* that results in prophenoloxidase activation in the wax moth, *Galleria mellonella*. J Invertebr Pathol 110:60–67. https://doi.org/10.1016/J.JIP.2012.02.006
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. Gene 33:103–119. https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90120-9
- Yokoyama T, Tanaka M, Fujiie A, Hasegawa M (2003) A new strain of *Paenibacillus lentimorbus* isolated from larvae of the oriental beetle, *Blitopertha orientalis* (Coleoptera: Scarabaeidae), in Chiba Prefecture, Japan. Appl Entomol Zool 38:523– 528. https://doi.org/10.1303/aez.2003.523
- Yokoyama T, Tanaka M, Hasegawa M (2004) Novel cry gene from *Paenibacillus lentimorbus* strain *Semadara* inhibits ingestion and promotes insecticidal activity in *Anomala cuprea* larvae. J Invertebr Pathol 85:25–32. https://doi.org/10.1016/J.JIP.2003.12.009
- Yoshida N, Oeda K, Watanabe E, Mikami T, Fukita Y, Nishimura K, Komai K, Matsuda K (2001) Chaperonin turned insect toxin. Nature 2001 411:6833 411:44–44. https://doi.org/10.1038/35075148
- Yu C-G, Mullins MA, Warren GW, Koziel MG, Estruch JJ (1997) The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. Applied and Environmental Microbiology 63:532–536

- Yu X, Liu T, Liang X, Tang C, Zhu J, Wang S, Li S, Deng Q, Wang L, Zheng A, Li P (2011) Rapid detection of vip1-type genes from *Bacillus cereus* and characterization of a novel vip binary toxin gene. FEMS Microbiol Lett 325:30–36. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02409.x
- Zaim M (1999) World Health Organization. Guideline specifications for bacterial larvicides for public health. Report of the WHO Informal Consultation. Geneva
- Zamioudis C, Pieterse CMJ (2012) Modulation of host immunity by beneficial microbes. Molecular Plant-Microbe Interactions 25:139–150. https://doi.org/10.1094/MPMI-06-11-0179
- Zboralski A, Filion M (2020) Genetic factors involved in rhizosphere colonization by phytobeneficial *Pseudomonas* spp. Comput Struct Biotechnol J 18:3539–3554. https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2020.11.025
- Zhan Y, Huang S, Voget S, Simon M, Chen F (2016) A novel roseobacter phage possesses features of podoviruses, siphoviruses, prophages and gene transfer agents. Sci Rep 6:4–11. https://doi.org/10.1038/srep30372
- Zhang J, Hodgman TC, Krieger L, Schnetter W, Schairer HU (1997) Cloning and analysis of the first cry gene from *Bacillus popilliae*. J Bacteriol 179:4336–4341. https://doi.org/10.1128/JB.179.13.4336-4341.1997
- Zhang S, Moyne AL, Reddy MS, Kloepper JW (2002) The role of salicylic acid in induced systemic resistance elicited by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. Biological Control 25:288–296. https://doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00108-1
- Zhang X, Candas M, Griko NB, Rose-Young L, Bulla LA (2005) Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R 1 expressed in insect cells. Cell Death Differ 12:1407–1416. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401675
- Zhang X, Candas M, Griko NB, Taussig R, Bulla LA (2006) A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclasePKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of Bacillus thuringiensis. Cell Biology 103:9897–9902
- Zhao J, Guo L, Zeng H, Yang X, Yuan J, Shi H, Xiong Y, Chen M, Han L, Qiu D (2012)
 Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from *Brevibacillus laterosporus* strain A60. Peptides (NY) 33:206–211. https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2012.01.001
- Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS (2011) PHAST: A Fast Phage Search Tool. Nucleic Acids Res 39. https://doi.org/10.1093/nar/gkr485
- Zhu B, Stülke J (2018) SubtiWiki in 2018: from genes and proteins to functional network annotation of the model organism *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Res 46:D743– D748. https://doi.org/10.1093/NAR/GKX908