



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

---

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE BIOTECNOLOGÍA  
APLICADA**

**INVESTIGACION DEL PROCESO DE DIFERENCIACION  
CELULAR EN TIEMPO REAL E *in situ*.  
*Bacillus thuringiensis* COMO SISTEMA MODELO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTORA EN CIENCIAS EN  
BIOTECNOLOGÍA APLICADA**

**PRESENTA:**

**M. B. A. JABEL DINORÍN TÉLLEZ GIRÓN**

**DIRECTORES DE TESIS:**

**DR. VÍCTOR ERIC LÓPEZ Y LÓPEZ  
DRA. CLAUDIA PATRICIA LARRALDE CORONA**



**TEPETITLA, TLAX.**

**2015**

## **COMITÉ TUTORIAL:**

**Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuil (CIBA-IPN)**

**Dra. Silvia Luna Suárez (CIBA-IPN)**

**Dra. Mayra de la Torre Martínez (CIAD-Hermosillo)**

**Dra. Claudia Patricia Larralde Corona (CBG-IPN)**

**Dr. Víctor Eric López Y López (CIBA-IPN)**

# ACTA REVISION DE TESIS



## INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-B/S

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla de L. siendo las 12:00 horas del día 13 del mes de abril del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA-Tlaxcala para examinar la tesis titulada;

Investigación del proceso de diferenciación celular en tiempo real e *in situ*. *Bacillus thuringiensis* como sistema modelo

Presentada por el alumno:

Dinorín  
Apellido paterno

Téllez Girón  
Apellido materno

Jabel  
Numerales

Con registro: 

A	1	0	0	0	6	3
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

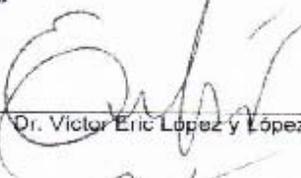
Doctorado

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

  
Dra. Claudia Patricia Larralde  
Corona

  
Dr. Victor Eric Lopez y Lopez

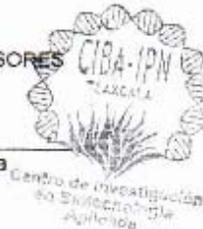
  
Dra. Silvia Luna Suárez

  
Dra. Mayra de la Torre Martínez

  
Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuil

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara



## CARTA CESION DE DERECHOS



### **INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL** **SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

#### *CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala el día 14 del mes Abril del año 2015, el (la) que suscribe Jabel Dinorín Téllez Girón alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología con número de registro A100063, adscrito a CIBA-IPN Tlaxcala, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Víctor Eric López Y López y cede los derechos del trabajo intitulado “Investigación del proceso de diferenciación celular en tiempo real e *in situ*. *Bacillus thuringiensis* como sistema modelo”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [vlopez@ipn.mx](mailto:vlopez@ipn.mx) Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jabel Dinorín Téllez Girón', written over a horizontal line.

Jabel Dinorín Téllez Girón

El presente trabajo se llevó a efecto en el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, bajo la Dirección de la Dra. Claudia Patricia Larralde Corona y el Dr. Víctor Eric López Y López.

## INDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	<b>10</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>11</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	<b>17</b>
II.1 Medición, control y monitoreo en un bioproceso .....	17
II.2 Espectroscopia de impedancia .....	19
II.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> , modelo de estudio .....	24
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>31</b>
<b>IV. HIPOTESIS</b> .....	<b>31</b>
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
V.1 Objetivo general .....	32
V.2 Objetivos específicos.....	32
<b>VI. MÉTODOS Y MATERIALES</b> .....	<b>33</b>
VI.1 Microorganismos .....	33
VI.2 Medios de cultivo.....	33
VI.3 Cinéticas de germinación.....	35
VI.4 Técnicas de cultivo .....	35
VI.4.1 Cultivo por lote (CL) .....	35
VI.4.2 Cultivo por lote alimentado (CLA).....	36
VI.5 Análisis fuera de línea ( <i>ex situ</i> ).....	37
VI.5.1 Cuentas celulares y eficiencia de esporulación.....	37
VI.5.2 Glucosa residual .....	37
VI.5.1 Parámetros cinéticos: Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), Consumo de sustrato ( $Q_s$ ) .....	37
VI.5.2 Expresión del gen <i>cry1A</i> .....	38
VI.6 Análisis en línea ( <i>in situ</i> ).....	38
VI.6.1 Temperatura, pH, oxígeno disuelto .....	38
VI.6.2 Dióxido de carbono .....	39
VI.6.3 Espectroscopia de impedancia .....	39
VI.7 Monitoreo en línea de fermentaciones de <i>B. thuringiensis</i> con barridos de frecuencia .....	41
VI.7.1 Establecimiento de fases de crecimiento en fermentaciones de <i>B.</i> <i>thuringiensis</i> .....	41
VI.7.2 Correlaciones de datos dieléctricos y cinéticos.....	43
VI.7.3 Fermentaciones a una frecuencia fija .....	45

<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>45</b>
VII.1	Establecimiento de inóculo a partir de cinéticas de germinación con cultivos a nivel matraz .....	45
VII.2	Utilización del medidor de impedancia .....	47
VII.2.1	Determinación superficies respuesta de impedancia del medio de cultivo a diferentes corrientes y frecuencias .....	47
VII.3	Caracterización en tiempo real e <i>in situ</i> de fermentaciones de <i>B. thuringiensis</i> .....	50
VII.4	Medición de parámetros dieléctricos por medio de espectroscopía de impedancia en las fermentaciones .....	55
VII.5	Correlaciones de perfiles cinéticos con perfiles de parámetros dieléctricos para selección de frecuencias .....	60
VII.6	Medición en cultivos por lote de <i>B. thuringiensis</i> pHTcry1kAc monitoreados a frecuencias fijas de 1.225, 0.5 y 0.1 MHz .....	63
VII.7	Porcentaje de diferencia de cambio de perfil dieléctrico .....	74
VII.8	Medición de cultivos bajo diferentes condiciones monitoreados a 0.5 y 1.225 MHz .....	76
VII.8.1	Cultivos por lote de <i>B. thuringiensis</i> pHT1kAc en medios con diferente $C_{ST}$ .....	76
VII.8.2	Cultivos por lote alimentado de <i>B. thuringiensis</i> pHT1kAc en ML.....	79
<b>VIII.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>89</b>
<b>IX.</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>91</b>
<b>X.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>93</b>
<b>XI.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>111</b>
XI.1	Medición de espectroscopía de impedanciaaa de medios de cultivo, esporas y sobrenadantes .....	111
XI.1.1	Determinación de valores de impedancia a diferentes frecuencias correspondientes a componentes de los medios de cultivo y agua .....	111
XI.1.1	Medición de espectroscopía de impedancia de preparación de ML..	112
XI.1.2	Medición de espectroscopia de impedancia de MF con diferentes valores de agitación.....	114
XI.1.3	Medición de espectroscopía de impedancia de medios de cultivo ....	116
XI.1.4	Medición de espectroscopía de impedancia de solución de esporas	118
XI.1.5	Medición de espectroscopía de impedancia de sobrenadante para su comparación con el medio de cultivo y solución de esporas en ML .....	121
XI.2	Manuscrito: “ <i>Reactance and Resistance; main properties to follow the cell differentiation process in Bacillus thuringiensis by dielectric spectroscopy in real time</i> ” .....	123

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación del principio de la técnica de espectroscopia de impedancia.....	19
Figura 2. Integración del desarrollo de señales que afectan a través del fosforelay la actividad del factor transcripcional Spo0A.....	26
Figura 3. Fases de crecimiento de <i>B. thuringiensis</i> en cultivos por lote.....	30
Figura 4. Arreglo de sondas de espectroscopia de impedancia en el fermentador....	40
Figura 5. Esquema que representa al vector <i>Impedancia</i> ( <i>Z</i> ) y sus componentes.....	40
Figura 6. Cinéticas de germinación de <i>B. thuringiensis</i> <i>pHTcry1kAc</i> (a y d), <i>B. thuringiensis</i> <i>pHTcry1A2</i> (b y e) y <i>B. thuringiensis</i> <i>HD73</i> (c y f) en MF (a, b y c) y MR (d, e y f).....	46
Figura 7. <i>Impedancia</i> de MF en los rangos de frecuencia aplicando diferentes corrientes.....	49
Figura 8. <i>Impedancia</i> de MF con una corriente de 20 mA bajo las condiciones A-F. (variables de temperatura, pH y aireación) y G-J (variables de volumen).....	50
Figura 9. Perfiles cinéticos de fermentaciones en ML de cepas HD73, 1A2 y 1kAc. .	53
Figura 10. Cinética de fermentación de <i>B. thuringiensis</i> HD73 <i>pHT1kAc</i> en ML monitoreada en el rango de 42 Hz a 5 MHz con 25 mediciones. ....	59
Figura 11. Incidencia por correlaciones igual o mayores a 0.9 absoluto de frecuencias evaluadas con espectroscopía de impedancia (200 frecuencias entre 42 Hz y 5 MHz).....	61
Figura 12. Fermentación de <i>B. thuringiensis</i> <i>pHTcry1kAc</i> en ML con medición de espectroscopía de impedancia a 1.225 MHz.....	65
Figura 13. Cinéticas de fermentaciones de <i>B. thuringiensis</i> HD73 <i>pHT1kAc</i> en ML monitoreadas a (a) 0.5 y (b) 0.1 MHz.....	67
Figura 14. Ejemplo de perfil dieléctrico ( <i>Reactancia</i> ) obtenido en una fermentación a frecuencia fija para calcular el porcentaje de diferencia de cambio (% $\Delta$ ).....	75
Figura 15. Diferencia de porcentaje del perfil dieléctrico alrededor de la fase de transición adquirida en un bioproceso.....	76
Figura 16. Fermentaciones en CL de <i>B. thuringiensis</i> <i>pHT1kAc</i> en MF con diferentes $C_{ST}$ .....	78
Figura 17. Fermentación en CLA de <i>B. thuringiensis</i> <i>pHT1kAc</i> en ML. ....	82
Figura 18. Fermentación en CLA de <i>B. thuringiensis</i> <i>pHT1kAc</i> en ML. ....	83
Figura 19. Superficies de respuesta de impedancia de agua, MF y soluciones a diferentes concentraciones algunos componentes de los medios de cultivo. ....	111
Figura 20. Gráficos de parámetros dieléctricos por etapas de la preparación de ML. ....	114

Figura 21. Gráficos radiales de respuesta de parámetros dieléctricos a variación de agitación (0 a 600 rpm).....	115
Figura 22. Perfiles dieléctricos de medios de cultivo en el rango de frecuencia de 42 Hz a 5 MHz.....	117
Figura 23. Valores absolutos de parámetros dieléctricos de medios de cultivo evaluados en frecuencias seleccionadas en diferentes fermentaciones. ....	118
Figura 24. Perfiles dieléctricos obtenidos al final de diferentes fermentaciones en el rango de frecuencia de 42 Hz a 5 MHz. ....	119
Figura 25. Valores absolutos de parámetros dieléctricos finales de proceso evaluados en frecuencias seleccionadas en diferentes fermentaciones. ....	120
Figura 27. Comparación de parámetros dieléctricos de medio de cultivo, sobrenadante y esporas en el rango de frecuencia de 42 Hz a 5 MHz. ....	122

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de parámetros de un proceso en línea y fuera de línea.....	17
Tabla 2. Clasificación de frecuencias.....	20
Tabla 3. Algunas aplicaciones de espectroscopia de impedancia. ....	23
Tabla 4. Composición de medios de cultivo.....	34
Tabla 5. Soluciones de componentes de medios de cultivo a diferentes concentraciones.....	41
Tabla 6. Agrupación de datos utilizados para calcular parámetros de correlación entre propiedades dieléctricas y parámetros cinéticos de <i>B. thuringiensis</i> .....	44
Tabla 7. Inóculos de cepas de <i>B. thuringiensis</i> .....	46
Tabla 8. Condiciones de operación evaluadas para efecto sobre parámetros dieléctricos. ....	47
Tabla 9. Comparación de parámetros cinéticos de fermentaciones en diferentes medios de cultivo. ....	54
Tabla 10. Parámetros cinéticos de fermentaciones realizadas de <i>B. thuringiensis</i> pHTcry1kAc aplicando una frecuencia fija para monitorear en línea con espectroscopia de impedancia.....	71
Tabla 11. Establecimiento del tiempo de fases de crecimiento en fermentaciones realizadas de <i>B. thuringiensis</i> pHTcry1kAc aplicando una frecuencia fija para monitorear en línea con espectroscopia de impedancia.....	72
Tabla 12. Parámetros cinéticos de cultivos por lote de <i>B. thuringiensis</i> pHT1kAc en ML monitoreado a 1.225, 0.5 y 0.1 MHz. ....	73
Tabla 13. Parámetros cinéticos de fermentaciones con MF con diferente $C_{ST}$ monitoreadas a una frecuencia de 0.5 MHz. ....	79
Tabla 14. Parámetros cinéticos de cultivo por lote alimentado de <i>B. thuringiensis</i> pHT1kAc en ML monitoreado a 1.225 MHz. ....	84

## RESUMEN

Durante el ciclo de vida de *Bacillus thuringiensis* se presentan tres fases: la de crecimiento exponencial, la de transición y la de esporulación. Para formar la espora y sintetizar delta-endotoxinas durante la fase de esporulación, la bacteria lleva a cabo un proceso de diferenciación celular que inicia durante la fase de transición. El proceso de diferenciación celular tiene importantes repercusiones en distintas ramas de la ciencia y la tecnología, por lo que su estudio en línea es de gran interés para el ser humano. La espectroscopia de impedancia es una técnica que puede permitir un monitoreo continuo e *in situ* del estado celular en un cultivo. Durante este proyecto se evaluaron con esta técnica: medios de cultivo, sobrenadantes de fermentación, esporas en solución, sales minerales del medio de cultivo así como cultivos celulares de *B. thuringiensis*, todo para establecer bases de estudio y seguir el proceso de diferenciación celular en tiempo real e *in situ*. Adicionalmente, se establecieron cultivos por lote a diferentes condiciones y se realizaron escaneos de 200 frecuencias de 42 Hz a 5 MHz aplicando corriente y voltaje fijos de 20 mA y 5 V DC respectivamente. Las respuestas de las señales dieléctricas adquiridas fueron *Impedancia (Z)*, *Angulo de fase (Deg)*, *Voltaje (V)*, *Capacitancia (Cs)*, *Factor de disipación (D)*, *Corriente (I)*, *Conductancia (G)*, *Reactancia (X)* y *Resistencia (R)* las cuales se correlacionaron con las diferentes fases de crecimiento establecidas con datos del crecimiento celular, expresión del gen *cry1Ac*, consumo de glucosa, oxígeno disuelto, dióxido de carbono, pH, temperatura y esporas libres obtenidas con técnicas convencionales y parámetros de fermentación. En base a estas correlaciones, las frecuencias de 0.1, 0.5 y 1.225 MHz fueron seleccionadas para medir las propiedades dieléctricas en cultivos por lote independientes a una

frecuencia fija. *Reactancia* y *Resistencia* mostraron un mejor comportamiento relacionado a fase de crecimiento exponencial, fase de transición, fase de esporulación y liberación de esporas debido la respuesta de las señales principalmente utilizando la frecuencia de 1.225 MHz, la cual también se aplicó a cultivos por lote alimentado. Interesantemente, estos perfiles tuvieron cambios particulares durante fase de crecimiento exponencial y fase de transición, cambios que no son identificados por métodos convencionales, pero fueron relacionados con el inicio del proceso de diferenciación celular del *B. thuringiensis*.

## **SUMMARY**

During life cycle of *Bacillus thuringiensis* presents three phases: exponential phase, transition state and sporulation phase. In order to form a dormant spore and to synthesize delta-endotoxins during sporulation phase, bacteria must undergo a cellular differentiation process initiated during the transition state. The process of cell differentiation process has important implications in various branches of science and technology, so its online study is of great interest to humans. Impedance spectroscopy, is a technique that can allow continuous and *in situ* monitoring of the cellular state in a culture. During this project were evaluated with this technique: culture media, fermentation supernatants, spores in solution, mineral salts of medium and cell cultures of *B. thuringiensis*, all to establish baseline study and follow the process of cell differentiation in real time and *in situ*. Additionally, we conducted batch cultures under different conditions, by scanning 200 frequencies from 42 Hz to 5 MHz applying fixed current and voltage of 20 mA and 5 V DC, respectively. The responses

of dielectric signals acquired were *Impedance (Z)*, *Angle phase (Deg)*, *Voltage (V)*, *Capacitance (Cs)*, *Dissipation factor (D)*, *Current (I)*, *Conductance (G)*, *Reactance (X)* and *Resistance (R)* which were correlated with the different growth phases established using data from cellular growth, *cry1Ac* gene expression, glucose consume, dissolved oxygen, carbon dioxide, pH, temperature and free spores obtained with conventional techniques and fermentation parameters. Based on these correlations, frequencies of 0.1, 0.5 and 1.225 MHz were selected for the purpose of measuring dielectric properties in independent batch cultures at a fixed frequency. *Reactance* and *Resistance* manifest more propitious behavior in relation to exponential growth phase, transition state, sporulation phase and spore release due to response of their signals mainly using 1.225 MHz frequency that was also applied to fed-batch cultures. Interestingly, these profiles underwent pronounced changes during exponential growth phase and transition state that were not noticed when using conventional methods, but were indicative of the beginning of the *B. thuringiensis* cell differentiation process.

## I. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos vistos individualmente, incluso poblaciones de clones pueden diferir entre ellos en la composición genética, su funcionamiento bioquímico y fisiológico (Davey y Kell 1996, Bridson y Gould 2000, Elowitz et al. 2002). Una pregunta clave en biología es como células hermanas con genomas idénticos siguen diferentes patrones de la expresión genética (Iber et al. 2006). Esta variabilidad tiene consecuencias prácticas que son importantes para muchos intereses humanos, por ejemplo: resistencia a antibióticos y biocidas (Baptista et al. 1999, Suller y Lloyd 1999, Turner 2000), productividad de fermentaciones industriales (Powell et al. 2000), eficacia en la preservación de componentes alimenticios (Steels et al. 2000) así como también patógenos que causan enfermedades (Davey y O'Toole 2000). Sin embargo, este interés no está limitado a microorganismos, también a temas sobre terapia celular (Hentze et al. 2006, Coleman et al. 2007), el uso de células madre en el estudio de nuevos antibióticos, medios de cultivo, drogas, toxinas, virus y agentes químicos (Thomson 2007, Choi y Murphy 2013, Simões et al. 2013), así también en diferentes estudios y aplicaciones con células cancerosas (Brú et al. 2003, Youn et al. 2006), en la terapia de reemplazo celular evitando la formación de tumores, en la pureza y producción de cultivos celulares (Park et al. 2011) y para pasar de la tecnología básica de las células madre a aplicaciones terapéuticas (Bagnaninchi y Drummond 2011).

La división celular es fundamental para el desarrollo, no solo de organismos multicelulares sino también para bacterias que entran a un proceso de diferenciación celular (Barák y Wilkinson 2005). En este proceso las células no especializadas

adquieren una estructura específica y/o rasgos funcionales que caracterizan a las células, tejidos u órganos de un organismo maduro o en una fase estable de la vida del organismo, incluyendo los procesos involucrados en el compromiso de una célula a un destino específico y su posterior desarrollo para el estado maduro (Cammack et al. 2006), por lo que identificar el momento cuando el proceso de diferenciación celular comienza es crucial y decisivo para obtener mejores resultados de una manera rápida en diversos estudios a nivel celular de diferentes organismos orientados a una gran variedad de aplicaciones de la biotecnología; aplicado por ejemplo al estudio y entendimiento de cultivos celulares que son esenciales en la investigación científica, tales como la producción de moléculas de interés industrial, ingeniería de tejidos, el descubrimiento de nuevas drogas, efectos de toxinas, regeneración celular, estudios del proceso de diferenciación celular (Strübing et al. 1995) en los que se requiere evaluar su desarrollo en células no deseadas, como células cancerosas o bien cuando se requiere diferenciación celular armónica y dirigida para el tratamiento, recuperación o regeneración de órganos (corazón, hígado, páncreas, etc.), y para aplicarlo en sistemas de diagnóstico rápido para patógenos de humanos, etc.

El entendimiento y estudio de estos procesos dependen de la reproducibilidad de los cultivos para poderlos llevar a escalas mayores, corroborando que el desarrollo de bioprocesos va en aumento y depende del progreso de manuales de protocolos de cultivos, aunque la automatización de sistemas para el cultivo de células madre está aun en sus primeros pasos (Thomson 2007).

Por estas razones y en base a la necesidad de entender que las células no tienen un comportamiento individual o egoísta sino que tienden a formar sociedades y que requieren de un apropiado funcionamiento y coordinación en la emisión y recepción de señales, surge la necesidad de identificar y monitorear las diferentes etapas de desarrollo en tiempo real e *in situ* con ayuda de un sistema modelo que permitirá establecer bases para otros sistemas celulares en los que sea indispensable monitorear el desarrollo de la diferenciación celular como es el caso con: células cancerosas, células diferenciadas para un tratamiento, recuperación o regeneración de órganos y para sistemas de diagnóstico rápido para patógenos de humanos (Gibson et al. 1992, Timms et al. 1996, Felice et al. 1999, Davey y O'Toole 2000, Ribeiro et al. 2003, Brú et al. 2003, Youn et al. 2006, Ramírez et al. 2009).

Algunas bacterias usan una variedad de mecanismos moleculares para lograr un proceso de diferenciación celular teniendo como resultado el desarrollo de transformaciones que generan diferentes tipos de células especializadas para incrementar su habilidad para sobrevivir en su ambiente (Barák y Wilkinson 2005, Banse et al. 2008, Saujet et al. 2011). Específicamente el género *Bacillus* tiene la habilidad de llevar a cabo el proceso de diferenciación celular, conduciendo a la formación de un septo asimétrico durante la esporulación, relacionado al control en parte de varios genes involucrados en la división celular afectada por factores de esporulación (Errington 2003, Hilbert y Piggot 2004). Por lo tanto este proceso morfológico, es un sistema poderoso para estudiar mecanismos que controlan la división celular y desarrollo (Bejerano-Sagie et al. 2006). Específicamente las células de *Bacillus* tienen que cambiar su metabolismo y fisiología cuando entran a la fase

de esporulación para hacer frente a las limitaciones de nutrientes, pero también durante la transición de la fase de crecimiento exponencial a la fase de esporulación, un red regulatoria compleja determinara que opción, la fase estacionaria o inicio de fase de esporulación es más adecuada bajo las condiciones dadas. Durante la fase de transición, conjuntos de genes se desactivan y otros secuencialmente se activan, incluyendo genes requeridos para la esporulación (Saujet et al. 2011). Gheorghiu (1996) menciona que las propiedades morfológicas y eléctricas de la membrana celular, medio intra y extracelular representan parámetros sensibles del estado celular, y debido a que el metabolismo lleva a cabo muchos cambios, estos teóricamente pueden ser detectados mediante espectroscopia de impedancia (Michaelis et al. 2013). Por lo que ésta técnica constituye una herramienta poderosa para lograr un rápido diagnóstico biomolecular, para el análisis de cultivos de células y puede ser una útil herramienta para entender los mecanismos que inician y propagan la expresión genética diferencial en la progenie de células diferentes (Jenal y Stephens 1996) bajo condiciones establecidas de medición *in vivo*. Esto permitirá un mejor entendimiento de la ingeniería de tejidos, biología de células madre y del cáncer (Cheung y Renaud 2006), sobretodo porque el proceso de diferenciación celular ha sido aplicado a células de diferente origen y con las que se han realizado estudios enfocados al tratamiento de enfermedades, producción de vacunas, producción de tejidos y órganos, la migración, proliferación de células.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Medición, control y monitoreo en un bioproceso

Una fermentación eficiente y su desarrollo depende del mantenimiento de un ambiente bien definido, controlado para las células y formación del producto; la manera más efectiva para lograrlo es regulando el proceso mediante mediciones directas de las condiciones de la fermentación sin que estas comprometan al proceso. Actualmente en bioprocesos la instrumentación utilizada, se clasifica en las siguientes categorías (Stephanopoulos 1993, Rodríguez Arevalo et al. 2003) (Tabla 1):

**Tabla 1.** Análisis de parámetros de un proceso en línea y fuera de línea.

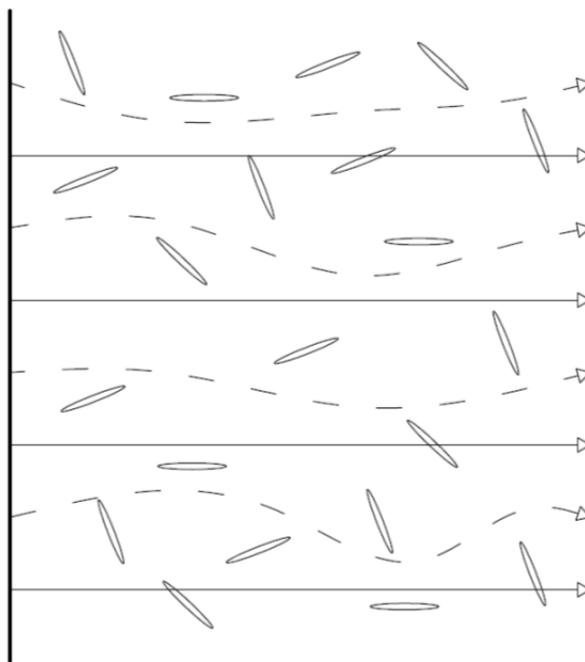
Pruebas <i>in situ</i>	Pruebas <i>ex situ</i>
Temperatura,	Biomasa
pH,	Sustratos
Oxígeno disuelto,	Productos
Espuma,	
Velocidad de agitación,	
Flujo de aire,	
Nivel,	
Presión,	
Flujos de alimentación,	
Análisis de gases,	
Dióxido de carbono,	
Biomasa.	

Uno de los parámetros más importantes a monitorear es la biomasa, existen diferentes técnicas para cuantificarla en un cultivo, pero la mayoría de estas técnicas no nos permiten conocer el estado metabólico de nuestro cultivo de una manera rápida, pues para esta evaluación es necesario obtener muestras que sean

analizadas *ex situ*. Por lo que para examinar con éxito los procesos celulares dinámicos en células vivas como el de diferenciación celular, se necesitan métodos de monitoreo en tiempo real no destructivo (Park et al. 2011). Diferentes técnicas se han desarrollado para generar dicha información pero la mayoría de ellas requieren tiempo, una muestra del cultivo, reactivos y otros recursos, así como también una persona con la capacitación adecuada para hacer los análisis. Algunas técnicas clásicas para detectar específicamente la diferenciación celular son inmunoquímica, citometría de flujo, análisis de expresión genética (Valero y Kintzios 2011), reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), Northern y Western blot, ensayos de inmunofluorescencia como análisis genómicos y proteómicos (Park et al. 2011), estas técnicas usualmente involucran etiquetado con ácidos nucleicos, antibióticos, radioisótopos y destruyen y/o alteran las células (Zavizion et al. 2010, Park et al. 2011). Sin embargo, todos los métodos mencionados consumen tiempo o una labor intensiva de procesos de múltiples pasos que no nos proporciona la información de manera oportuna. Adicionado a esto, son necesarios métodos de identificación, caracterización y/o la separación física de microorganismos individuales para la detección de patógenos y para la identificación y selección de cepas con características benéficas o propiedades mejoradas (Katsuragi y Tani 2000). Por lo que métodos capaces de analizar estas propiedades a diferentes niveles, tanto individual y poblacional, permitirán un entendimiento más completo de los fenómenos que son inaccesibles a los investigadores en la actualidad.

## II.2 Espectroscopia de impedancia

Métodos no destructivos para monitorear en tiempo real procesos celulares dinámicos en células vivas son requeridos (Bagnaninchi y Drummond 2011, Park et al. 2011), y una técnica que nos permitiría monitorear en tiempo real e *in situ* el proceso de diferenciación celular puede ser la espectroscopía de impedancia. Esta técnica se basa en la aplicación de un campo eléctrico a una suspensión celular (Figura 1) causando un cambio de los iones presentes y que resulta en la polarización de la membrana celular que se comporta como un capacitor (November y Van Impe 2002), las células son entonces llamadas dieléctricos, porque están localizadas entre dos electrodos donde se puede generar el campo eléctrico para su análisis (Justice et al. 2011) y donde hay una conducción eléctrica evidente (Grimnes y Martinsen 2000, Luong et al. 2001, Bonmassar et al. 2010, Pänke et al. 2011).



**Figura 1.** Representación del principio de la técnica de espectroscopia de impedancia.

Frecuencias altas (—), frecuencias bajas (⋯) (Grimnes and Martinsen 2000).

De acuerdo a la frecuencia aplicada para realizar la medición, se han clasificado a la frecuencias dependiendo del rango en el que se encuentren (Tabla 2). De donde Valero et al. (2010) y Michaelis et al. (2013) mencionan que a frecuencias de entre 100 KHz y 10 MHz, la impedancia total del sistema es independiente de la frecuencia, pero es el rango que genera un campo eléctrico de baja intensidad y armónico de donde se obtienen las principales características de las células (Gheorghiu 1996).

**Tabla 2.** Clasificación de frecuencias.

Clasificación	Rango de frecuencia	Referencia
$\beta$ -dispersión	2 KHz a 10 MHz	(Alzate et al. 2009, Justice et al. 2011)
$\gamma$ -dispersión	1 a 40 GHz	(Dalmay et al. 2010)
Frecuencias bajas	100 Hz a 0.1 MHz	(Davey y Kell 1998, Valero et al. 2010)
Frecuencias medias	1 MHz	(Davey y Kell 1998, Valero et al. 2010)
Frecuencias altas	10 MHz y 10 GHz	(Davey y Kell 1998, Valero et al. 2010)

Cheung y Renaud (2006) mencionan que a bajas frecuencias, la membrana celular es una barrera al flujo de la corriente y la célula no es un conductor; a frecuencias intermedias la capacitancia de la suspensión es reducida como la cantidad del plasma y decremento de polarización de la membrana; en el rango de  $\beta$ -dispersión debido a la disminución de polarización de la membrana, se puede obtener información de sus propiedades, se pueden medir células con membranas intactas, es decir, células viables (Olguín-Sánchez et al. 2009, Tibayrenc et al. 2011); y a altas frecuencias, la membrana plasmática es mínimamente polarizada, la membrana celular no es una barrera de la corriente (Figura 1) y las mediciones dan información

acerca de estructuras intracelulares y propiedades dieléctricas del interior de la célula (Desai y Sankhe 2011).

Por otro lado, esta técnica de medición se puede aplicar de manera directa o indirecta; se aplica la técnica directa cuando las concentraciones de sales en el medio de cultivo son muy altas o muy bajas y el monitoreo se realiza vía la producción de dióxido de carbono a través de dos electrodos sumergidos en una celda que contiene KOH y la variación de impedancia es cualitativamente y cuantitativamente correlacionada con la producción de dióxido de carbono (Ribeiro et al. 2003). En esta trabajo se aplicó la técnica directa al estar los electrodos sumergidos en el cultivo.

Gheorghiu (1996) menciona que las propiedades morfológicas y eléctricas de la membrana celular y el citoplasma así como del medio extracelular, representan parámetros sensibles dependiendo del estadio celular, lo cual nos permitirá monitorear mediante espectroscopia de impedancia eventos celulares relevantes. Las primeras mediciones de impedancia publicadas datan desde 1897 (Stewart 1897); y entre 1910 y 1913 Rudolf Höber probó que el interior de glóbulos rojos de la sangre y células musculares contenían conductivos a baja frecuencia (150 Hz) y también probó que las células poseen una membrana dieléctrica resistiva que rodea un interior electrolítico conductivo (Justice et al. 2011). Todos los materiales de la naturaleza presentan impedancia por lo que se puede valer de la variación de la impedancia para estudiar la evolución o los cambios de las propiedades de los materiales.

Mediante la espectroscopia de impedancia, se pueden medir altas densidades celulares, con la característica de que es insensible a células no viables, burbujas formadas por la aireación, restos celulares y una gran variedad de medios de cultivo (Cady et al. 1978). Frente a otras técnicas, la espectroscopia de impedancia tiene ventajas como el no ser destructiva (Carvell 2003, Wex et al. 2006), utiliza una pequeña señal (Ramírez et al. 2009), es altamente sensible, no es invasiva, permite investigar procesos desde el seno de la disolución, realiza la medición en un tiempo reducido, no está sujeta a error de interpretación humana, no está propensa a contaminación, no requiere de moléculas marcadoras que alteran el sistema de estudio y lo más importante, provee resultados en tiempo real (Zavizion et al. 2010).

Esta técnica ha sido aplicada para el análisis de materiales biológicos de suspensiones celulares o tejidos (Schwan y Takashima 1991, Morgan et al. 2007). Al ser aplicada a cultivos de otro tipo de células se debe considerar que estos pueden diferir unos de otros en términos de composición genética, fisiología, bioquímica o de comportamiento (Davey y Kell 1996, Bridson y Gould 2000). Esta variabilidad tiene importantes consecuencias prácticas para muchos intereses humanos como se aprecian en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Algunas aplicaciones de espectroscopia de impedancia.

Aplicaciones	Referencia
Resistencia a antibióticos y biocidas	(Suller y Lloyd 1999)
Productividad y estabilidad de fermentaciones industriales	(Powell et al. 2000)
Eficacia de preservativos alimentarios	(Steels et al. 2000)
Potencial de los patógenos para causar enfermedades	(Davey y O'Toole 2000)
Determinación de parámetros celulares	(Hoffman y Britt 1979, Matsunaga et al. 1979, Gheorghiu 1996, Cheung y Renaud 2006, Hunt et al. 2009)
Factores morfológicos en la caracterización de células vivas (volumen, longitud y tamaño), distribución del número de células sobre la fase del ciclo celular, estructura interna, permitividad compleja, medio intracelular y extracelular y factores morfológicos; monitoreo de fermentaciones a diferentes escalas	(Carvell 2003)
Medición de la actividad celular	(Yun et al. 2010)
Monitoreo en tiempo real del proceso de división celular medido por dispersión eléctrica	(Asami et al. 1999)
Evaluación de actividad metabólica debido al crecimiento y estado fisiológico entre levaduras, bacterias y hongos	(Owens et al. 1992, Deák y Beuchat 1993, Matanguihan et al. 1994)
Aplicaciones dirigidas a la industria de alimentos y derivados lácteos, fármacos, cosméticos y medio ambiente, como herramienta para el control de la calidad	(Ribeiro et al. 2003)
Control de proceso industrial microbiano y sanitación industrial	(Swaminathan y Feng 1994, Silley y Forsythe 1996)
Detección de bacterias en agua, leche o comida	(Gibson et al. 1992, Timms et al. 1996, Felice et al. 1999)
Crecimiento microbiano	(Dézenclos et al. 1994)
Estudio y registro de la carga microbiana de una amplia gama de productos alimenticios como: vegetales, cereales, dulces y carne; para identificación de microorganismos, evaluación de antibióticos; para supervisar forma de crecimiento de bacterias, como método alternativo de cuentas en placa	(Cady et al. 1978, Carvell 2003)
Estudio los cambios específicos en la estructura e integridad de la membrana citoplasmática	(Wex et al. 2006)
Monitoreo de la motilidad, difusión y mortalidad de células de insectos	(Luong et al. 2001)
Medición en línea de formación de biopelículas de <i>Klebsiella rubiacearum</i>	(Markx y Kell 1990)
Terapia celular en humanos	(Spalding et al. 2005, Hentze et al. 2006, Coleman et al. 2007)
Utilización de células madres en la búsqueda de nuevos antibióticos;	(Thomson 2007)
Estudios y aplicaciones de células cancerosas	(Brú et al. 2003, Youn et al. 2006)
Caracterización de células, el diagnóstico de enfermedades y la caracterización de cultivos de células	(Ramírez et al. 2009)

### II.3 *Bacillus thuringiensis*, modelo de estudio

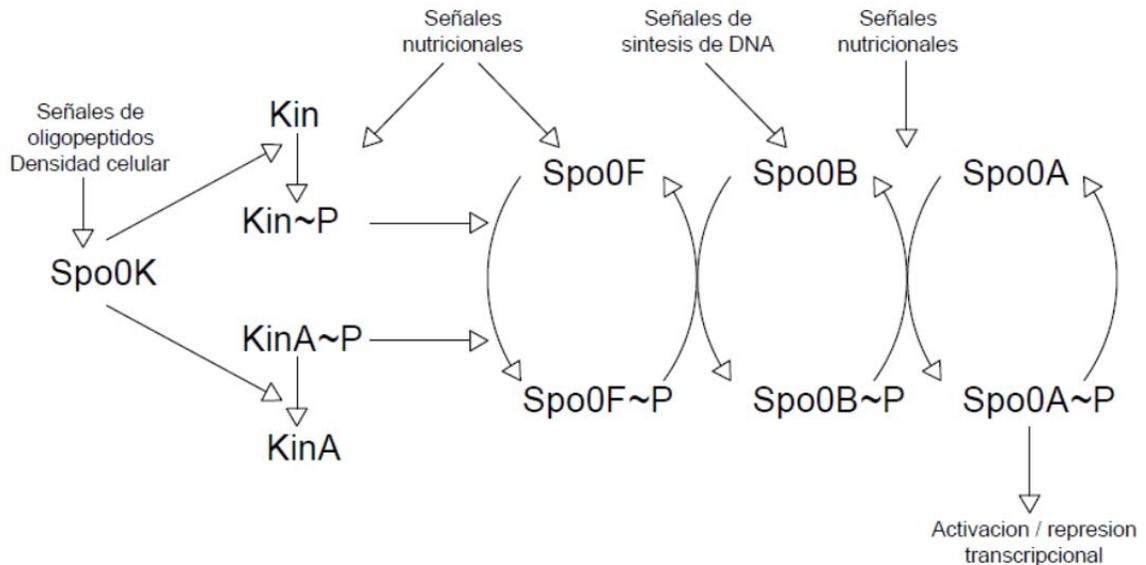
*B. thuringiensis* es una bacteria Gram positiva, pertenece al grupo de *Bacillus cereus* (*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* y *B. mycoides*) (Slamti y Lereclus 2002), la importancia de tomar como modelo de estudio a esta bacteria, es porque lleva a cabo el proceso de diferenciación celular conduciendo a la formación de la espora. Este proceso está estudiado para la identificación y explicación de diversos mecanismos fisiológicos, metabólicos, genéticos que intervienen en él. El ciclo de vida de *B. thuringiensis* incluye crecimiento vegetativo o fase de crecimiento exponencial, una fase de transición y una fase de esporulación, de donde, la fase de transición se caracteriza por un decremento en la velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ) y cambios metabólicos (López-y-López y de la Torre 2005). La esporulación del *B. subtilis* según lo reportado por Aronson (2002) y extensamente estudiada por Phillips y Strauch (2002) es regulada por un programa complejo del desarrollo de expresión génica acoplada con una precisa serie de eventos estructurales e intracelulares, que en conjunto resultan en un ambiente impermeable del cuerpo en estado de dormancia. Durante la fase de esporulación, *B. thuringiensis* también produce proteínas en la célula madre llamadas Cry las cuales pueden alcanzar aproximadamente el 25% en peso seco de la célula esporulada. Estas proteínas paraesporales son  $\delta$ -endotoxinas (Brosseau y Masson 1988) y están codificadas en los genes *cry* que son expresados durante el proceso de esporulación (Aronson 2002). Estas proteínas que produce *B. thuringiensis* son tóxicas para importantes plagas de insectos en su estado larval del orden de: *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera* y nematodos (Razo et al. 1997, Schnepf et al. 1998, Slamti y Lereclus 2002, Soberon et al. 2007) en aplicaciones forestal, agrícola y ornamental

(Rowe y Margaritis 2004). Por lo que en 1961 se registró como biopesticida en USA (Sanahuja et al. 2011) y es el agente de control biológico de mayor éxito pues representa más del 90% del mercado mundial de estos productos biológicos (Glare y O'Callaghan 2000) y el ~2% del total del mercado de insecticidas (Bravo et al. 2011).

En *B. subtilis*, cuando los nutrientes son escasos o se encuentra ante cambios ambientales adversos y las células alcanzan una densidad poblacional alta (quorum sensing), hay un lento crecimiento que lleva a la bacteria a entrar a la fase estacionaria (Banse et al. 2008, Saujet et al. 2011). Durante la fase de transición de la fase de crecimiento exponencial a la fase de esporulación, una red compleja regulatoria determina si la opción del inicio de fase de esporulación es la más adecuada bajo las condiciones dadas (Saujet et al. 2011) ya que este proceso consume una gran cantidad de energía. Si la decisión de las células es esporular (Lazazzera 2000, Phillips y Strauch 2002, Bassler y Losick 2006) tras la evaluación de nutrientes y recursos suficientes (Phillips y Strauch 2002), la progenie es compactada en una espora durable y otra en la célula madre que ayuda en la construcción de la espora, pero es lisada al completarse el proceso de diferenciación celular (Jenal y Stephens 1996).

Debido a la importancia de *B. thuringiensis* y su prolongado uso en programas de manejo de plagas, una gran cantidad de trabajos se ha dedicado a la elucidación del modo de acción del insecticida proteína Cry (Vachon et al. 2012), así como al desarrollo del medio de cultivo para diferentes cepas de producción e investigación que tratan de la actividad insecticida de las proteínas Cry (Frankenhuyzen 2009). La densidad celular, condiciones nutricionales y señales del ciclo celular que regulan la

activación del factor transcripcional Spo0A afectando uno o más pasos del fosforelay (Figura 2) (Ireton et al. 1993).



**Figura 2.** Integración del desarrollo de señales que afectan a través del fosforelay la actividad del factor transcripcional Spo0A. Flechas indican puntos de regulación.

En *B. thuringiensis* los cambios fisiológicos, metabólicos y genéticos son los que caracterizan sus tres fases de crecimiento: fase de crecimiento exponencial, fase de transición y fase de esporulación (López-y-López y de la Torre 2005). De igual manera, todo el proceso es regulado por complejos de circuitos reguladores y comienza cuando cierta concentración de Spo0A fosforilado (Spo0A~F) es alcanzada, lo cual se define como etapa cero de esporulación (Barák y Wilkinson 2005).

El proceso de esporulación (Lazazzera 2000) está regulado por quorum sensing, así como la adaptación de la población bacteriana a las condiciones ambientales, la formación de biopelículas, virulencia, competencia genética y bioluminiscencia entre otros factores con aplicación biotecnológica potencial (Mangwani et al. 2012), esto

debido a que la bacteria usa los circuitos de comunicación de quorum sensing para regular un diverso arreglo de actividades fisiológicas, estos cambios fisiológicos modifican la capacidad eléctrica de la célula.

La esporulación generalmente comienza bajo condiciones de cultivo que no es propicio para el crecimiento vegetativo. El inicio del proceso de esporulación depende del éxito de la acción de los productos de los genes *spo0*. Los productos de los genes *spo0* son responsables para la transducción de la maquinaria de transcripción de las señales metabólicas que inducen a la esporulación. Uno de los papeles más importantes de los productos del gen *spo0A* es liberarse de la represión de la expresión del gen de la fase estacionaria, que lleva a la proteína AbrB (Strauch et al. 1989).

La regulación de los genes *cry* ha evolucionado para asegurar su coordinación con el proceso de esporulación. Los reguladores producidos durante la fase de transición previenen la expresión inapropiada de funciones que sólo son necesarias durante la fase de crecimiento exponencial (Phillips y Strauch 2002), estas proteínas reguladoras (AbrB, ScoC, SinR y CodY), se unen al DNA y regulan la expresión de numerosos genes, algunos reprimen la esporulación (Hahn et al. 1995, Phillips y Strauch 2002). Por otro lado, López-y-López y de la Torre (2005) comprobaron que en la fase de transición existe una mayor concentración de factores extracelulares que tienen un efecto directo sobre la síntesis de la proteína Cry y formación de espora.

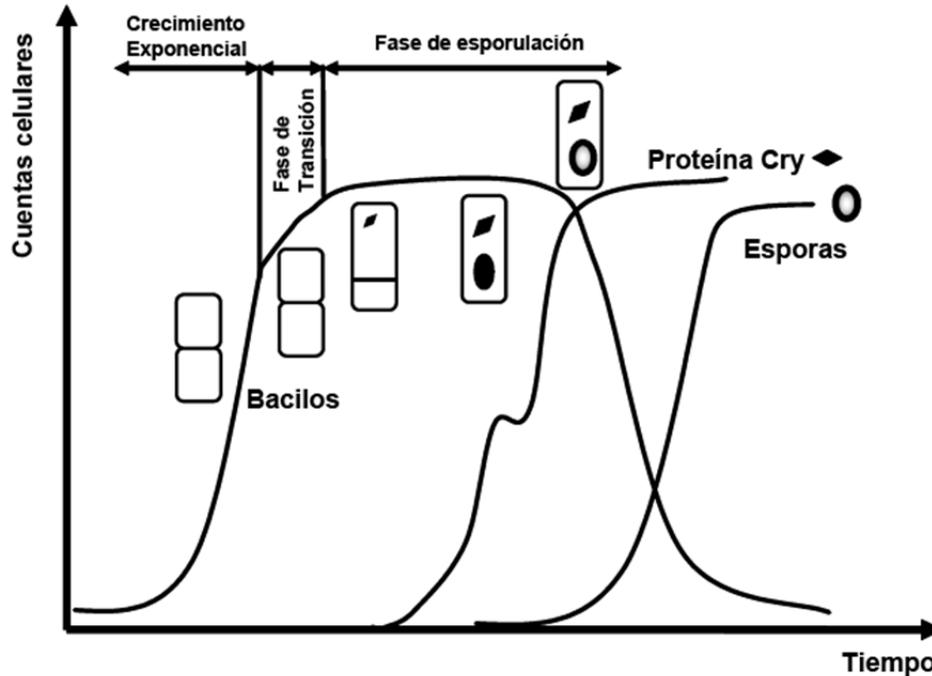
Con esto, podemos decir que el proceso de diferenciación celular de *B. thuringiensis* tiene un gran efecto desde el punto de vista de bioprocesos y puede dictaminar el fracaso o éxito del mismo, influenciado por los medios de cultivo y/o la técnica de cultivo utilizados para su producción.

A continuación se citan aspectos importantes en la producción de *B. thuringiensis*:

- Se han utilizado diferentes relaciones C:N, fuentes de carbono, nitrógeno y cationes a las cuales el *B. thuringiensis* ha respondido de diferentes maneras.
- El patrón metabólico de *B. thuringiensis* lo conforman tres fases, que son crecimiento vegetativo, fase de transición y fase de esporulación (Figura 3).
- Cuando se aplican cultivos por lote (CL) y medios con nutrientes fácilmente metabolizables,
  - estos afectan el crecimiento, esporulación y expresión del gen *cry1A*; la disponibilidad de nutrientes también tiene efecto sobre el tiempo y cantidad acumulada de citrato.
  - El exceso de nitrógeno orgánico ejerce un efecto negativo sobre esporulación, mientras que con el exceso tanto de carbono como nitrógeno, decrece también la expresión del gen *cry1A* si los nutrientes son fácilmente asimilados.
  - El exceso de aminoácidos libres causan un sobreflujo de carbono principalmente en el ciclo de Krebs y el exceso de carbono es excretado como citrato (López-y-López y de la Torre 2005).
  - La mejoría en la expresión del gen *cry1A* no correlaciona con el aumento en la concentración celular, la eficiencia de esporulación o la

cantidad de esporas alcanzada, estableciendo que la expresión de los genes *cry1A* y la esporulación son diferencialmente regulados (Bravo et al. 1996, Sierra-Martínez et al. 2004).

- Cuando se aplican cultivos por lote alimentado (CLA),
  - el metabolismo de *B. thuringiensis* es redirigido y la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) disminuye durante la fase de alimentación, aún cuando la concentración de nutrientes en el reactor sea mayor que al inicio del CL.
  - La producción de citrato usualmente ocurre durante la fase de transición, pero cuando se alimenta un medio rico en aminoácidos libres, el metabolito es producido durante la fase de crecimiento exponencial y la esporulación es prácticamente bloqueada (1% y 5% de eficiencia de esporulación).
  - Los cambios en la fisiología del microorganismo y la disminución en la  $\mu$ , sugieren que la fase de transición se establece durante la alimentación y esto al parecer tiene un efecto negativo en la esporulación y en la expresión del gen *cry1A*, debido tal vez a la sobreproducción inapropiada de los reguladores de transición.



**Figura 3.** Fases de crecimiento de *B. thuringiensis* en cultivos por lote. (López-y-López, 2004).

A pesar de la información de *B. thuringiensis* así como de espectroscopía de impedancia en diversas aplicaciones, existen pocas contribuciones del seguimiento en línea del proceso de diferenciación celular en bacterias y solo hay un reporte que aborda el monitoreo dieléctrico del crecimiento y esporulación de *B. thuringiensis* en CLA (Sarrafzadeh et al. 2005). Por todo lo anterior, el estudio del proceso de diferenciación celular en línea e *in situ* es de gran interés para el ser humano y *B. thuringiensis* puede ser un interesante modelo de estudio con el cual se podrán establecer bases de espectroscopía de impedancia para seguir dicho proceso.

### III. JUSTIFICACIÓN

Identificar el momento cuando el proceso de diferenciación celular comienza es crucial y decisivo para obtener mejores resultados de una manera rápida en diferentes estudios a nivel celular de diferentes organismos orientados a diversas aplicaciones humanas. La espectroscopia de impedancia es una herramienta útil para el seguimiento en línea en cultivos celulares con la que se puede monitorear en tiempo real el proceso de diferenciación celular. *Bacillus thuringiensis* presenta un proceso de diferenciación celular para llevar a cabo la síntesis de la espora y las proteínas Cry. Adicionalmente se tiene una gran información de la bacteria sobre su metabolismo y condiciones de proceso, por lo que es un interesante modelo de estudio. Por lo tanto, el interés de investigar las respuestas de diferentes propiedades dieléctricas a diferentes condiciones de cultivo y correlacionarlos con los procesos de esporulación, metabolismo y expresión de la proteína Cry de *B. thuringiensis*, nos ayudará a establecer bases de estudio para otros sistemas celulares y aplicaciones de interés humano.

### IV. HIPOTESIS

Las células de *Bacillus thuringiensis* producirán distintas señales dieléctricas dependiendo de la fase de crecimiento en la que se encuentren, el analizador de impedancia será capaz de adquirir y registrar cada valor de frecuencia a la que respondan cada tipo de células y el proceso de diferenciación celular.

## V. OBJETIVOS

### V.1 Objetivo general

Estudiar el proceso de diferenciación celular en tiempo real e *in situ* en cultivos de *Bacillus thuringiensis* mediante la espectroscopía de impedancia.

### V.2 Objetivos específicos

- Realizar cinéticas de germinación con cultivos a nivel matraz para establecer el inóculo que se utilizara en las fermentaciones.
- Determinar los valores de parámetros dieléctricos a diferentes frecuencias correspondientes al medio de cultivo.
- Identificar las señales correspondientes en valor de frecuencia de células en cada etapa de crecimiento y el proceso de diferenciación celular de *Bacillus thuringiensis* para correlacionarlos con los estadios metabólicos característicos de cada etapa.
- Caracterizar las cinéticas de poblaciones de células en tiempo real e *in situ* de las etapas de: crecimiento exponencial, células en fase de transición, células en etapa de esporulación y esporas en diferentes condiciones de cultivo de *Bacillus thuringiensis*.

## VI. MÉTODOS Y MATERIALES

### VI.1 Microorganismos

En este trabajo se evaluaron tres cepas de *B. thuringiensis*. Una nativa, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD73; y dos transformadas *B. thuringiensis* pHTcry1A2 y *B. thuringiensis* pHTcry1kAc. La cepa pHTcry1A2 contiene una fusión de 362 pb que incluyen el promotor del gen *cry1Aa* con *lacZ* (Bravo et al. 1996). La cepa pHTcry1kAc deriva de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD73 (ATCC-35866) y tiene una fusión de 1000 pb río arriba que incluyen el promotor de *cry1Ac* de *B. thuringiensis* HD73 fusionada con *lacZ* en el plásmido pHT304-18Z (Agaisse y Lereclus 1994). Sierra-Martínez et al. (2004) construyó la cepa pHTcry1kAc. Las cepas fueron conservadas en discos de esporas que contenían  $10^7$  esporas por disco.

### VI.2 Medios de cultivo

Con el fin de obtener diferentes perfiles de biomasa, consumo de sustratos y obtención de productos, se seleccionaron distintos medios de cultivo con diferente disponibilidad de nutrientes y la concentración de nutrientes totales ( $C_{ST}$ ) fue de  $29.41 \pm 0.47$  en la mayor parte de los experimentos, salvo la indicación del uso de otra concentración. En la Tabla 4, se describe la composición de los medios de cultivo utilizados en éste trabajo. Para el medio de Farrera se ajustó el pH a 2.0 con  $H_3PO_4$  85% (p/v) antes de esterilizar. En todos los casos se ajustó el pH a 7.2 con NaOH 5M antes de inocular.

**Tabla 4.** Composición de medios de cultivo.

Componente	Medio de Farrera (MF)*†	Medio Rowe (MR)	Medio Limpio (ML)*	Medio limpio con peptona de caseína (ML <sup>PC</sup> )*	Medio HySoy (MHySoy)*	MF <sup>40*</sup> C <sub>ST</sub> 40 g l <sup>-1</sup>	MF <sup>90*</sup> C <sub>ST</sub> 90 g l <sup>-1</sup>
	g l <sup>-1</sup>						
Glucosa	13.42	10.0	12.00	12.00	13.43	13.42	39.58
Harina de soya	5.6	-	-	-	-	6.3	19.90
Sólidos de cocimiento de maíz	4.05	-	-	-	4.06	4.06	9.15
Extracto de levadura	2.59	3.2	2.59	2.59	2.59	2.59	5.86
Peptona de Soya	-	-	12.0	-	6.1	-	-
Peptona de Caseína	-	3.2	-	12.0	-	-	-
Sulfato de Magnesio	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Sulfato manganoso	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Sulfato de Zinc	0.0058	0.0075	0.0058	0.0058	0.0058	0.0058	0.0058
Sulfato de Cobre	0.0075	0.0045	0.0075	0.0075	0.0075	0.0075	0.0075
Cloruro de potasio	3.0	0.5	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Sulfato ferroso	0.00135	-	0.00135	0.00135	0.00135	0.00135	0.00135
Cloruro de Cobalto	0.03	-	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
Cloruro de Calcio	-	0.106	-	-	-	-	-
Fosfato dibásico de Sodio	-	1.856	-	-	-	-	-
Fosfato monobásico de Sodio	-	0.153	-	-	-	-	-
Citrato Férrico	-	0.075	-	-	-	-	-
Ácido fosfórico	7.0	-	-	-	-	7.0	7.0
Antiespumante Mazu DF	1.0	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

\*Estos medios fueron esterilizados, se les ajusto a un pH de 7.2 con NaOH 5M estéril a excepción del medio de Rowe, al cual se le ajusta el pH antes de esterilizarse.

† modificado de Farrera et al. (1998)

### **VI.3 Cinéticas de germinación**

Las cinéticas de germinación se realizaron adicionando un disco con  $10^7$  esporas a 250 ml de medio de cultivo con agitación de 200 rpm, 30°C y pH 7.2. Los medios de cultivo evaluados fueron medio de Rowe y medio de Farrera (Tabla 4). El tiempo de incubación requerido para cada cepa se estableció ajustando las cuentas celulares a un modelo de crecimiento exponencial (Ecuación 1).

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (1)$$

Dónde: X son las cuentas celulares al tiempo t,  $X_0$  son las cuentas celulares iniciales,  $\mu$  es la velocidad de crecimiento específico y t es el tiempo.

### **VI.4 Técnicas de cultivo**

Se utilizó un fermentador Sartorius Biostat A plus con capacidad de 5 litros, y se realizaron fermentaciones por lote y lote alimentado de 4-l. El pH fue controlado automáticamente a 7.2 con NaOH 5M y  $H_3PO_4$  0.67 M. La espuma fue controlada con la adición del antiespumante Mazu DF. El fermentador se inoculó con 6.25% (v/v) con un cultivo de una etapa.

#### **VI.4.1 Cultivo por lote (CL)**

Esta técnica de cultivo se realizó con un volumen de operación de 4-l, aireación de 1.0 vvm, agitación de 600 rpm, 30°C y un pH de 7.2. Los parámetros cinéticos se calcularon en base a los resultados obtenidos de biomasa, consumo de sustrato y obtención de productos.

#### VI.4.2 Cultivo por lote alimentado (CLA)

Esta técnica de cultivo se realizó con un volumen inicial de 3-l, se mantuvo una aireación de 1.0 vvm, 600 rpm, 30°C y pH de 7.2. Se alimentó de forma exponencial con ML con la siguiente composición en (g l<sup>-1</sup>) de glucosa, 150.0; peptona de soya, 150.0; extracto de levadura, 32.38; sulfato de magnesio, 0.2; Sulfato manganoso, 0.04; sulfato de zinc, 0.0058; sulfato de cobre, 0.0075; cloruro de potasio, 3.0; sulfato ferroso, 0.00135 y cloruro de potasio, 0.03. Dicha alimentación se realizó desde la hora 1-h hasta las 9-h de edad de la fermentación con un flujo inicial de 5.71 ml·h<sup>-1</sup> de alimentación calculado de acuerdo a las siguientes ecuaciones para mantener una  $\mu$  constante:

$$F_0 = \frac{q_s \cdot x_0 \cdot V_0 \cdot e^{\mu t}}{S_0 - S} \quad (2)$$

$$x_0 = \frac{\mu \cdot x_0 \cdot e^{\mu t}}{\mu + (A \cdot x_0 \cdot e^{\mu t}) - (A \cdot x_0)} \quad (3)$$

$$A = \frac{\mu}{S \cdot Y_{x/s}} \quad (4)$$

$$Y_{x/s} = \frac{\mu \cdot x_0 \cdot V_0}{q_s \cdot V_0} \quad (5)$$

Donde, el valor de  $\mu$  fue el promedio de fermentaciones por lote realizadas en este trabajo;  $V_0$  es el volumen inicial con que se preparó el fermentador;  $S_0$  es la concentración del sustrato (glucosa) en el medio de cultivo utilizado para alimentación;  $S$  es la concentración de sustrato en el medio de cultivo utilizado al inicio del proceso en el fermentador;  $q_s$  es la velocidad específica de consumo del

sustrato ( $g_S \cdot g_X^{-1} h^{-1}$ );  $Y_{X/S}$  es el rendimiento celular ( $g_X \cdot g_S^{-1}$ );  $F_0$  es la alimentación inicial;  $x_0$  es la concentración de biomasa al tiempo cero;  $t$  es la edad del proceso (h).

## **VI.5 Análisis fuera de línea (*ex situ*)**

### **VI.5.1 Cuentas celulares y eficiencia de esporulación**

Las cuentas se realizaron en la cámara de Neubauer. Se tomó 1.0 ml del cultivo y por medio de diluciones seriales en solución salina 0.85% (p/v), se realizaron conteos de células y esporas por cuadruplicado. La eficiencia de esporulación se calculó tomando la cuenta de esporas libres al final de la fermentación divididas por las cuentas celulares determinadas al tiempo en que se estableció la fase de esporulación y multiplicando por 100 (López-y-López y de la Torre 2005).

### **VI.5.2 Glucosa residual**

La glucosa residual se determinó centrifugando 1.0 ml de muestra de caldo de cultivo a 10,000 rpm por 10 min y 4°C, el sobrenadante se utilizó para ser analizado con un analizador bioquímico YSI 2700 Select.

### **VI.5.1 Parámetros cinéticos: Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), Consumo de sustrato ( $Q_S$ )**

La velocidad específica de crecimiento se determinó graficando los datos de cuentas celulares totales en función del tiempo y ajustadas a un modelo exponencial de acuerdo a la Ecuación 1.

El consumo de sustrato ( $Q_{glucosa}$ ), se determinó haciendo una tendencia con ajuste polinómico de los datos obtenidos de glucosa durante la fermentación, esta ecuación se derivó hasta obtener una ecuación de primer orden en donde la pendiente es el valor de consumo de glucosa en  $g \cdot l^{-1} h^{-1}$ .

### **VI.5.2 Expresión del gen *cry1A***

Para determinar el nivel de expresión del gen *cry1A* en el caso de las cepas pHT*cry1kAc* y pHT*cry1A2* que tienen fusionado el gen reportero *lacZ*, se utilizó el ensayo de  $\beta$ -galactosidasa (Sambrook et al. 1989), utilizando la siguiente mezcla de reacción:

- 3  $\mu$ l de Solución 100x Mg
- 66  $\mu$ l de 1 X ONPG
- 30  $\mu$ l de suspensión celular
- 201  $\mu$ l de fosfato de sodio 0.1 M (pH 7.5)

La suspensión celular se obtuvo de 1.0 ml de muestra de fermentación centrifugada a 10,000 rpm a 4°C por 7 min, el paquete celular y se lavó dos veces y se resuspendió en 1.0 ml de solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 5). La reacción se incubó a 30°C por 30 minutos. La reacción se detuvo con la adición de 500  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M, se centrifugó bajo las mismas condiciones y el análisis se realizó por espectroscopia con UV/Vis a 420 nm. Una unidad de  $\beta$ -galactosidasa (unidad Miller, UM) fue definida como la cantidad de enzima que hidroliza 1.0  $\mu$ mol de orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) por min. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

## **VI.6 Análisis en línea (*in situ*)**

### **VI.6.1 Temperatura, pH, oxígeno disuelto**

Por medio del equipo y programa de control del fermentador Sartorius, PC-Panel  $\mu$ DCU 6.34, se monitoreó y/o controló en línea los parámetros de temperatura, pH y oxígeno disuelto (OD).

## VI.6.2 Dióxido de carbono

El dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en la salida de gas del fermentador fue monitoreado en tiempo real usando un analizador infrarrojo (Carbon dioxide analyzer Mod. 906, Quantek Instruments).

## VI.6.3 Espectroscopía de impedancia

- **Configuración de sondas, equipo de medición**

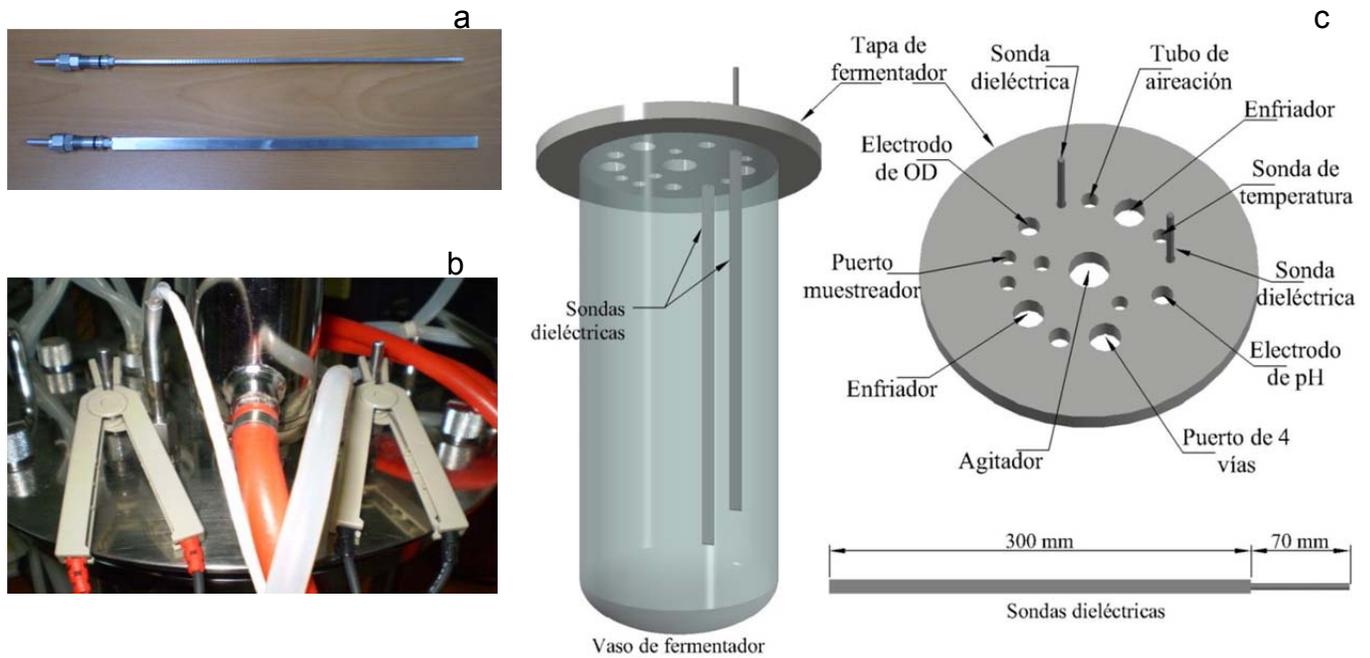
Se utilizó un analizador de impedancia marca Hioki, modelo 3532-50 LCR HiTester a donde se conectaron dos sondas de acero inoxidable sujetas a la tapa del fermentador que fueron diseñadas para este proyecto (Figura 4), fueron fabricadas en acero inoxidable con placa de 2.38 mm de espesor, 9.52 mm de ancho y 300 mm de largo (Figura 4a) a partir de la cuerda con la que se sujeta a la tapa del fermentador (Figura 4c) con un adaptador de Teflón® con el fin de evitar contacto con la tapa de metal, de donde sobresalen 35 mm de la sonda en donde van conectados los caimanes que provienen del analizador de impedancia (Figura 4b). En la Figura 4c, se observa la configuración de los puertos de los accesorios que se sujetan a la tapa del fermentador, la ubicación las sondas dieléctricas y sus dimensiones.

Los parámetros dieléctricos que se determinaron en este trabajo son: *Impedancia (Z)*, *Capacitancia (Cs)*, *Factor de disipación (D)*, *Angulo de fase (Deg)*, *Voltaje (V)* y *Corriente (I)*, a partir de las cuales se calcularon: *Resistencia (R)*, *Reactancia (X)* y *Conductancia (G)* con las Ecuaciones 6, 7 y 8, respectivamente.

$$R = Z \cdot \cos(Deg) \quad (6)$$

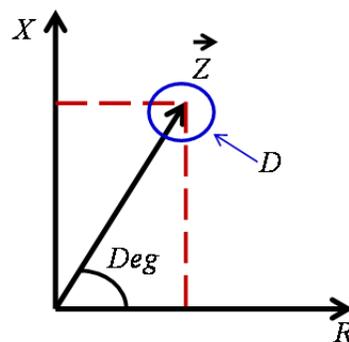
$$X = Z \cdot \sen(Deg) \quad (7)$$

$$G = \frac{I}{V} \quad (8)$$



**Figura 4.** Arreglo de sondas de espectroscopia de impedancia en el fermentador. (a) Sondass para espectroscopia de impedancia. (b) Sondass de impedancia conectadas con su respectivo caimán del analizador de impedancia y ensambladas en la tapa del fermentador. (c) Configuración de accesorios y sondas dieléctricas en la tapa del fermentador: condensador, enfriador, puerto de cuatro vías, aireador, agitador, puerto muestreador, sondas de pH y OD, temperatura y sondas dieléctricas.

En la Figura 5 se observa que  $R$  y  $X$  son la parte real e imaginaria respectivamente del vector *Impedancia*,  $Z$ ; además se muestran otros parámetros dieléctricos determinados en este proyecto y la relación entre ellos.



**Figura 5.** Esquema que representa al vector *Impedancia* ( $Z$ ) y sus componentes. *Reactancia* ( $X$ ), *Resistencia* ( $R$ ), *Factor de disipación* ( $D$ ) y *Angulo de fase* ( $Deg$ ).

- **Establecimiento de parámetros para medición**

Para fijar algunos parámetros en el equipo de medición dieléctrica se utilizó un voltaje de 5 V, se hizo una evaluación con barridos dentro de un rango de corriente de 0.01 a 99.99 mA mediante barridos de frecuencia: de 42 Hz a 1 y 5 MHz, para estas pruebas se utilizó el medio de Farrera y posteriormente con la corriente a utilizar definida, se aplicó en agua y soluciones a diferentes concentraciones de algunos componentes de los medios de cultivo (Tabla 5) y el MF.

**Tabla 5.** Soluciones de componentes de medios de cultivo a diferentes concentraciones.

Reactivo	Concentración (g·l <sup>-1</sup> )				
Agua	-	-	-	-	-
Sulfato ferroso	-	-	0.00135	-	-
Sulfato de Magnesio	0.1	0.2	0.25	0.3	0.4
Sulfato manganoso	0.03	0.04	0.045	0.05	0.06
Sulfato de Zinc	0.0041	0.0058	0.0067	0.0075	0.0092
Sulfato de Cobre	0.0015	0.0045	0.0060	0.0075	0.0105
Cloruro de potasio	0.2	0.5	1	3	5
Glucosa	7.5	10	12	13.42	16.5

## VI.7 Monitoreo en línea de fermentaciones de *B. thuringiensis* con barridos de frecuencia

### VI.7.1 Establecimiento de fases de crecimiento en fermentaciones de *B. thuringiensis*

Para el establecimiento de las fases de crecimiento en cultivo por lote de *B. thuringiensis* realizados en este proyecto, se consideraron las siguientes directrices características de cada fase de crecimiento.

- La fase de crecimiento exponencial se establece cuando las cuentas celulares son ajustadas a un modelo de crecimiento exponencial (Ecuación 1).

- La fase de transición se establece cuando la  $\mu$  decrece y el crecimiento celular es lineal (López-y-López de la Torre 2005, Boniolo et al. 2012) y la demanda bacteriana de oxígeno es máxima al final de la fase log, manteniéndose alta por un periodo corto de tiempo durante la fase de transición y decrece durante la fase de esporulación. En todos los gráficos de perfiles cinéticos obtenidos por técnicas convencionales, la fase de transición determinada se indica con un sombreado, que delimita del lado izquierdo la fase de crecimiento exponencial y del lado derecho del sombreado, la fase de esporulación.
- La fase de esporulación se establece una hora antes a la detección de actividad de  $\beta$ -galactosidasa de pHT1kAc, ya que el inicio de la transcripción de *cry1A* del promotor Btl ha sido reportada de 1 a 2 h antes de establecerse la fase de esporulación (Agaisse y Lereclus 1995; Schnepf et al. 1998, López-y-López de la Torre 2005), durante esta fase también se observa el incremento del perfil de OD.

En este trabajo se observaron adicionalmente variaciones en los perfiles de temperatura, CO<sub>2</sub> y pH junto con el consumo de ácido y base alrededor de la fase de transición que se utilizaron para corroborar el establecimiento de las fases de crecimiento de *B. thuringiensis*. Anderson et al. (2002) menciona al flujo de calor como un indicador en línea de la actividad metabólica y nosotros observamos un máximo al inicio de la fase de transición seguido de un descenso para después estabilizarse. Para el caso del perfil de pH, este mantiene su valor alto debido a que *B. thuringiensis* acumula ácidos orgánicos durante el crecimiento y se oxidan vía ciclo de ácidos tricarboxílicos (Bulla et al. 1980).

Con el voltaje y corriente fijos, a 5 V y 20 mA respectivamente, se hicieron evaluaciones de las propiedades dieléctricas de las fermentaciones sobre barridos de 200 frecuencias distribuidas en cuatro grupos de rango de frecuencias de 42 Hz a 1, 5, 10 KHz y 5 MHz. En cada fermentación se hicieron mediciones en al menos 19 tiempos. Estos datos dieléctricos registrados se procesaron en una computadora que se conectó al equipo de medición de espectroscopia de impedancia y que se controló por medio de un software permitiéndonos obtener en línea simultáneamente 6 parámetros dieléctricos:  $Z$ ,  $C_s$ ,  $D$ ,  $Deg$ ,  $V$  y  $I$ , y calcular  $G$ ,  $R$  y  $X$  mediante las Ecuaciones 6, 7 y 8.

Para descartar la influencia de variaciones de operación, condición, medio de cultivo y tipo de células se hicieron mediciones adicionales donde se evaluaron los medios de cultivo antes de que estos fueran inoculados, aplicando diferente velocidad de agitación, al final de la fermentación, del sobrenadante obtenido después de centrifugar el caldo de fermentación y solución de esporas (Resultados presentados en anexos).

### **VI.7.2 Correlaciones de datos dieléctricos y cinéticos**

Con el objetivo de seleccionar frecuencias que nos proporcionen señales óptimas relacionadas principalmente al proceso de diferenciación celular, se realizaron correlaciones de grupos de datos entre datos obtenidos por técnicas convencionales y los obtenidos por espectroscopia de impedancia.

Los datos obtenidos en las fermentaciones se correlacionaron por medio de la Ecuación 9 (coeficiente de correlación de Pearson de dos grupos de datos) los

valores de los perfiles dieléctricos con los cinéticos obtenidos por técnicas convencionales: conteo de bacilos y esporas, expresión del gen *cry*, glucosa residual, CO<sub>2</sub> producido, temperatura y DO.

$$\rho_{x,y} = \frac{\text{Cov}(X, Y)}{\sigma_x \cdot \sigma_y} \geq |0.9| \quad (9)$$

En esta ecuación,  $\rho$  es el coeficiente de correlación, Cov es la covarianza de X y Y, X representa cada parámetro de fermentación (bacilos, esporas, expresión de *cry*, glucosa residual, CO<sub>2</sub>, temperatura y OD) y Y representa cada propiedad dieléctrica (Z, Cs, D, Deg, V, I, G, R y X),  $\sigma$  es la desviación estándar de X y Y. La agrupación de datos utilizada se presenta en la Tabla 6, en donde también se enlista cada fase de crecimiento establecida por métodos convencionales. Se tomaron grupos de datos para cada una de las 200 frecuencias evaluadas a cada tiempo del transcurso de cada fermentación. Para el registro de datos se utilizó el programa muestra de Hioki LCR versión 4.03, el cual registra las propiedades dieléctricas medidas a una hoja de cálculo del programa Excel®.

**Tabla 6.** Agrupación de datos utilizados para calcular parámetros de correlación entre propiedades dieléctricas y parámetros cinéticos de *B. thuringiensis*.

Rango de Frecuencia evaluada	Tiempos de escaneo	Parámetros dieléctricos adquiridos	Parámetros convencionales evaluados	Segmentos de fermentación
42 – 1 KHz 42 – 5 KHz 42 – 10 KHz 42 – 5 MHz	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24	Z, X, R, V, Deg, G, Cs, D, I	Bacilos, Esporas, gen <i>cry</i> , OD, CO <sub>2</sub> , Temperatura Glucosa	Fase de crecimiento exponencial, Fase de transición, Fase de esporulación, Liberación de esporas, Fermentación completa
200 frecuencias	19 tiempos	9 parámetros	7 parámetros	5 segmentos de fermentación

### **VI.7.3 Fermentaciones a una frecuencia fija**

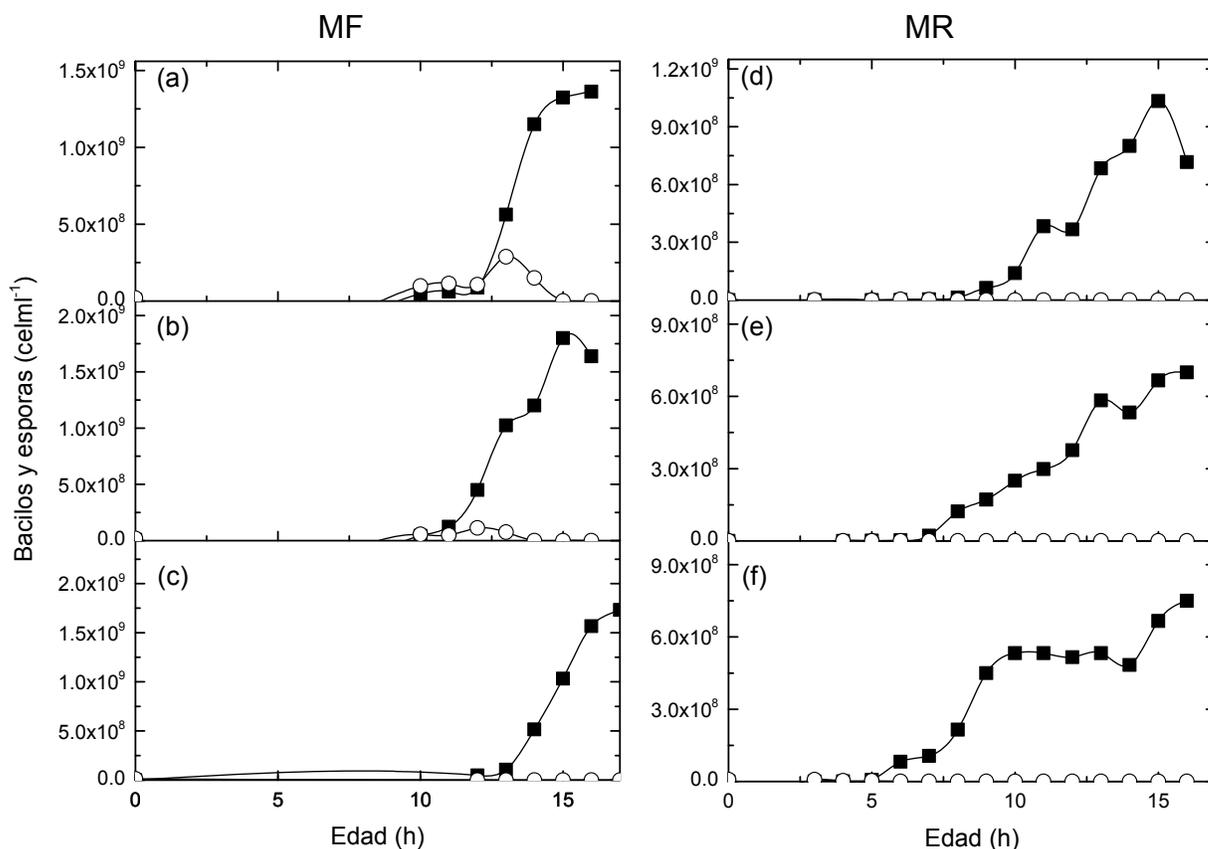
Una vez seleccionadas las frecuencias con mayor número de correlaciones mayor o igual a 0.9; para cada fermentación se hizo el mismo procedimiento para establecer las fases de crecimiento en la fermentación por técnicas convencionales. Los datos de parámetros dieléctricos fueron adquiridos cada 60 s durante todo el proceso de fermentación.

## **VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **VII.1 Establecimiento de inóculo a partir de cinéticas de germinación con cultivos a nivel matraz**

Se realizaron cultivos a nivel matraz utilizando el MF y MR inoculados con un disco de esporas con el fin de establecer el medio de cultivo y tiempo de propagación para cada microorganismo (cepa nativa *B. thuringiensis* HD73 y dos transformadas, *B. thuringiensis* pHTcry1kAc y *B. thuringiensis* pHTcry1A2). En la Figura 6 se presentan las cinéticas de germinación con el fin de obtener un cultivo sincrónico que se utilice para todas la fermentaciones.

Las cuentas de bacilos se ajustaron a un modelo exponencial asegurando que el inóculo se tomara durante la fase de crecimiento exponencial y de esta manera se obtenga en el fermentador un cultivo sincrónico y mismas condiciones para todos los experimentos. De los medios de cultivo evaluados para el inóculo (MF y MR), se observó un mejor comportamiento y crecimiento exponencial utilizando MF. En la Tabla 7 se muestran los tiempos de incubación determinados para cada cepa de *B. thuringiensis* en las condiciones y medios de cultivo de utilizados.



**Figura 6.** Cinéticas de germinación de *B. thuringiensis* pHtcry1kAc (a y d), *B. thuringiensis* pHtcry1A2 (b y e) y *B. thuringiensis* HD73 (c y f) en MF (a, b y c) y MR (d, e y f).

**Tabla 7.** Inóculos de cepas de *B. thuringiensis*.

Cepa	Medio de cultivo	$t_{\text{fase exponencial}}$ (h)	$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$t_{\text{incubación}}$ (h)
<i>B. thuringiensis</i> pHtcry1kAc	MF	12-15	0.75	13
<i>B. thuringiensis</i> pHtcry1A2	MF	13-17	1.06	14
<i>B. thuringiensis</i> HD73	MF	12-16	0.92	14

Para las fermentaciones indicadas, también se manejó el inóculo preparado bajo las condiciones planteadas por López-y-López y de la Torre (2005), las cuales consisten en hacer un doble pase, partiendo de inocular con disco de esporas a MR incubado por 12 h, y un segundo pase realizado a MF incubado por 12 h.

## VII.2 Utilización del medidor de impedancia

El equipo de medición tiene parámetros que fueron necesarios fijar, como lo fue el Voltaje y Corriente para posteriormente evaluar y definir las frecuencias que nos proporcionen mayor información del cultivo, específicamente el proceso de diferenciación celular de *B. thuringiensis*.

### VII.2.1 Determinación superficies respuesta de impedancia del medio de cultivo a diferentes corrientes y frecuencias

El voltaje que se maneja fue de 5 V, se realizaron barridos en el rango de frecuencia de 42 Hz a 1 MHz con corrientes entre 0.01 a 99.99 mA (Figura 7a) y barridos de 42 Hz a 5 MHz con corrientes entre 0.01 a 20 mA (Figura 7b) de acuerdo a especificaciones del equipo de medición. Estas primeras pruebas se realizaron con el sistema estéril con MF y sin inocular bajo diferentes condiciones de operación (Tabla 8) con el objetivo de fijar la corriente de medición en el equipo.

**Tabla 8.** Condiciones de operación evaluadas para efecto sobre parámetros dieléctricos.

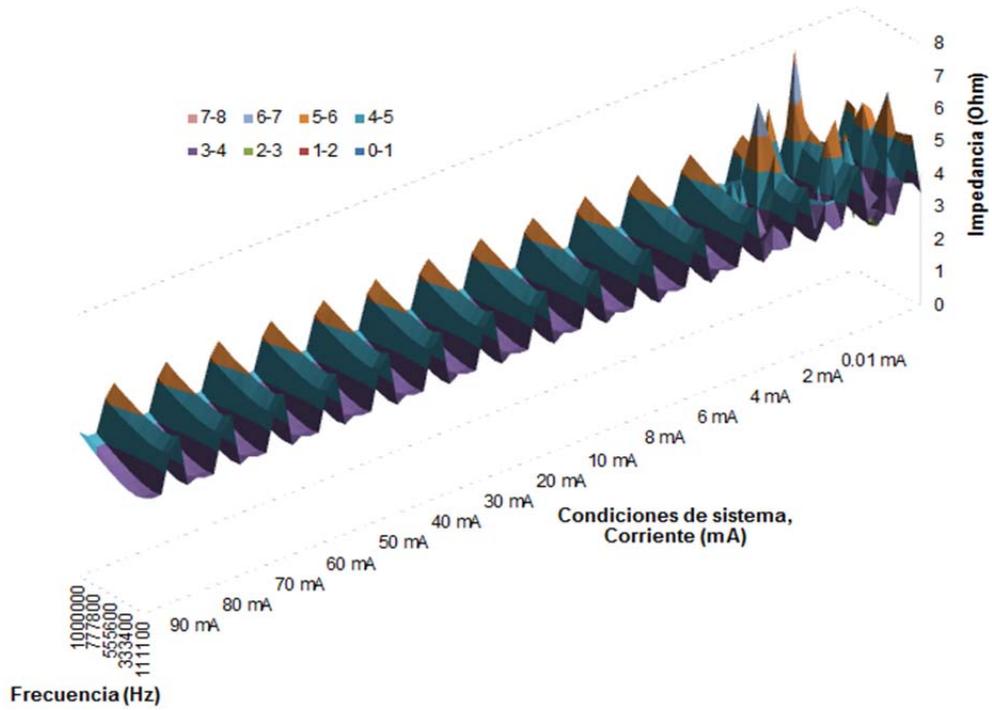
Condición de operación	Volumen de medio (l)	Temperatura (°C)	pH	Agitación (rpm)	Aireación (vvm)
A	4	Descenso	2	Sin agitación	Sin aireación
B	4	25	2	Sin agitación	Sin aireación
C	4	30	2	600	Sin aireación
D	4	30	7.2	600	Sin aireación
E	4	30	7.2	600	0.5
F	4	30	7.2	600	1
G	3.5	30	7.2	600	1
H	3	30	7.2	600	1
I	2	30	7.2	600	1
J	1	30	7.2	600	1

En las Figuras 7a y 7b se presentan las señales respuesta a las diferentes condiciones de operación (A-F); mostrando solo las superficies de respuesta del

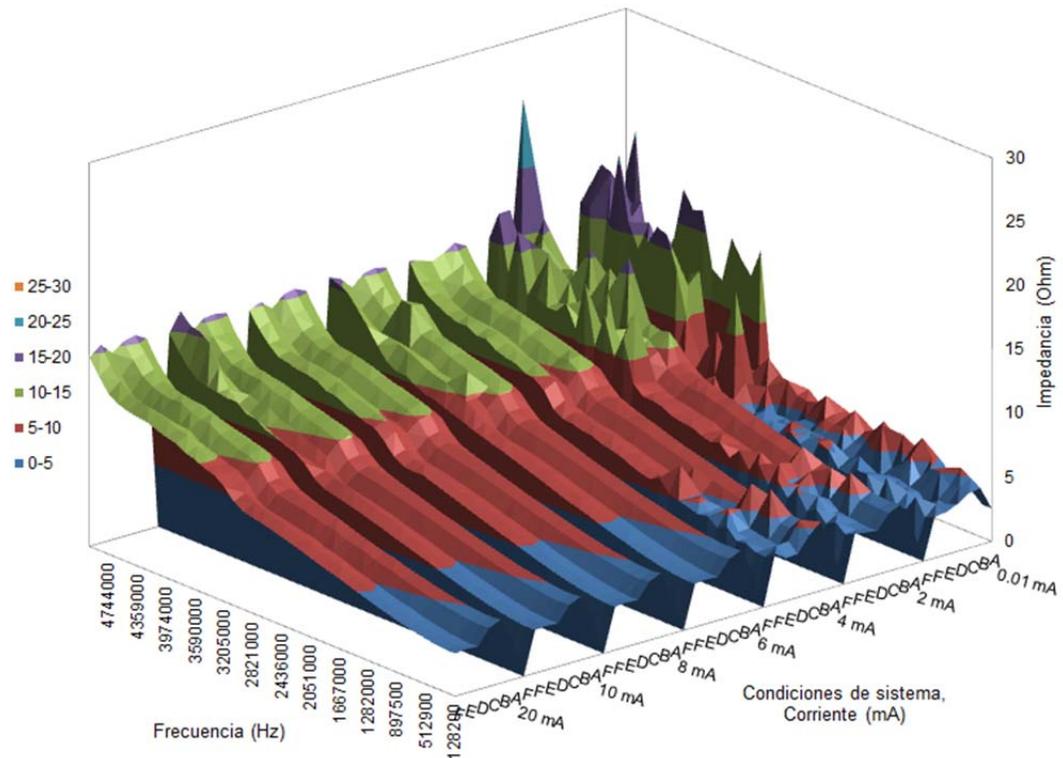
parámetro dieléctrico *Impedancia*. Se observó que a una frecuencia de 20 mA, la señal obtenida fue definida y estable a comparación de las obtenidas en el rango de 0.01 a 10 mA en donde se puede observar inestabilidad en la superficie de respuesta. Considerando la configuración del medidor de impedancia, se tomó la corriente que abarca todo el rango de frecuencia del equipo, para posteriormente hacer barridos de frecuencia de los experimentos posteriores.

En la Figura 8, se observa la superficie de respuesta de la *Impedancia* medida en el rango de frecuencia de 42 Hz a 5 MHz bajo todas las condiciones de operación (Tabla 8) con la corriente fija de 20 mA que se definió. En la superficie respuesta se observa que no se obtuvieron variaciones abruptas entre los valores de *Impedancia* bajo las condiciones (A-F), con un valor máximo de 15 ohms y frecuencia de 5 MHz. Sin embargo en los barridos evaluados con volúmenes de 4, 3.5, 2 y 1-l (Tabla 8), se observó un valor máximo de 22.6 Ohms en la frecuencia de 5 MHz. Con lo que se observó que la variable de volumen evaluada con medio de cultivo, causa diferencia en los valores respuesta de impedancia, pero no tan destacables para influir en las señales respuesta correspondientes a los cultivos en las fermentaciones de *B. thuringiensis*. Por lo que para los términos de interés y considerando que se evaluó solo con medio de cultivo, el uso de diferentes volúmenes tiene un efecto poco relevante sobre las respuestas de los parámetros dieléctricos.

(a)

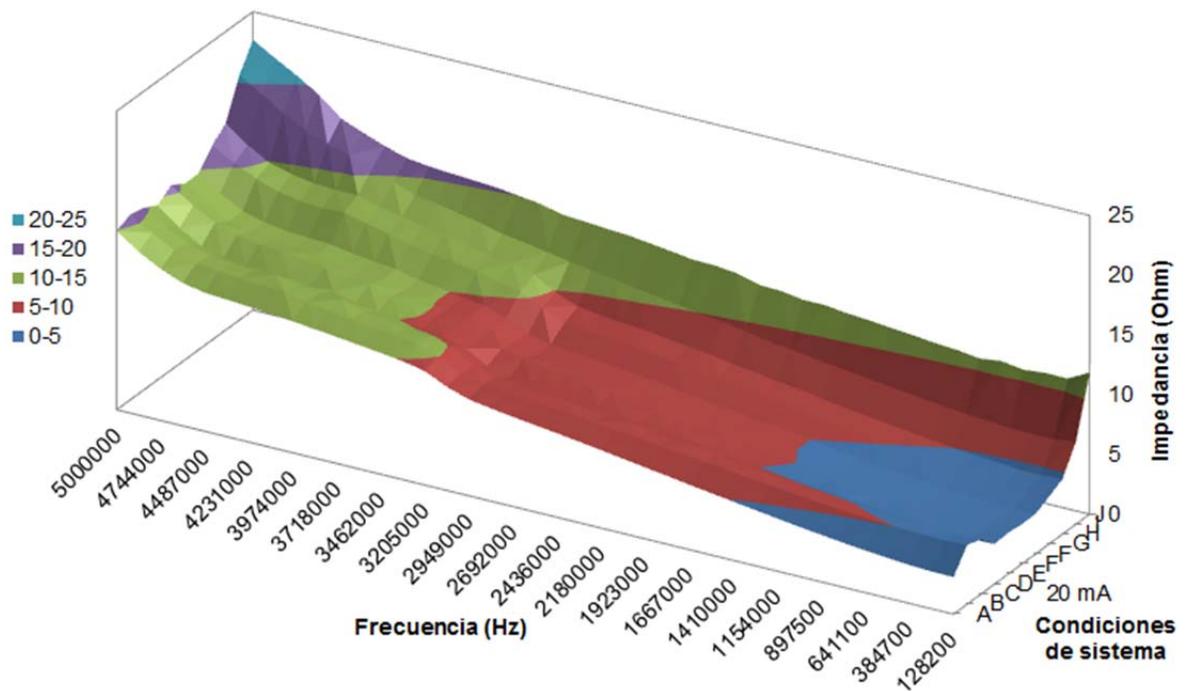


(b)



**Figura 7.** Impedancia de MF en los rangos de frecuencia aplicando diferentes corrientes.

(a) En el rango de 42 Hz a 1 MHz con corrientes de 0.01 a 99.99 mA bajo las condiciones A-F (variables de temperatura, pH y aireación) (b) En el rango de 42 Hz a 5 MHz con corrientes de 0.01 a 20 mA bajo las condiciones A-F



**Figura 8.** Impedancia de MF con una corriente de 20 mA bajo las condiciones A-F. (variables de temperatura, pH y aireación) y G-J (variables de volumen).

Con esto se verifico la aplicación del voltaje y corriente de 5 V y 20 mA respectivamente para mediciones posteriores en el proyecto; resaltando que este valor de corriente abarca todo el rango de frecuencia que tiene el equipo (42 Hz a 5 MHz). En el Anexo XI.1, se pueden observar respuestas correspondientes a algunos componentes de los medios de cultivo, el medio de cultivo, sobrenadante y esporas evaluados.

### VII.3 Caracterización en tiempo real e *in situ* de fermentaciones de *B. thuringiensis*

Con el fin de establecer las mejores condiciones de medición para determinar el proceso de diferenciación celular, se realizaron distintas fermentaciones por lote de las cepas de *B. thuringiensis* utilizando 4-l de volumen de operación. Donde se controlaron pH, temperatura, agitación, aireación; y monitorearon en línea el OD, CO<sub>2</sub>

y parámetros dieléctricos; fuera de línea se evaluaron la expresión del gen *cry*, consumo de glucosa, conteo de bacilos y esporas.

En la Figura 9 se muestra una comparación de los perfiles cinéticos obtenidos en ML para las tres cepas, en donde se observa para el caso de la cepa HD73, la limitante es el análisis de la expresión del gen *cry*. Se muestran también un grupo de 50 perfiles de *Impedancia* en el rango de 42 Hz a 5 MHz para 1A2 y 1kAc y en el rango de 42 Hz a 5 KHz para HD73. Sin embargo, para el objetivo de este trabajo y no causar variación por proceso en las correlaciones evaluadas, se decidió continuar el trabajo solamente con el uso de la cepa *B. thuringiensis* HD73pHT1kAc, con la cual se obtuvieron perfiles mejor definidos de acuerdo a la descripción hecha de las fermentaciones, además de que se realizaron más fermentaciones con esta cepa con las cuales se hicieron las correlaciones con los parámetros dieléctricos.

Las fases de crecimiento en estas fermentaciones se determinaron en función de los perfiles cinéticos que se obtuvieron con análisis convencionales en línea y fuera de ella. Los parámetros cinéticos de las distintas fermentaciones se muestran en la Tabla 9. Adicionalmente se observaron variaciones en los perfiles de temperatura, CO<sub>2</sub> y pH junto con el consumo de ácido y base alrededor de la fase de transición que se utilizaron para corroborar el establecimiento de las fases de crecimiento de *B. thuringiensis*. A continuación se describen las fermentaciones realizadas para cada cepa.

- **Fermentaciones de *B. thuringiensis* HD73**

Haciendo una comparación de las fermentaciones utilizando esta cepa tanto en ML como en MF, se obtuvo una mayor  $\mu$  al utilizar MF así como también un mayor

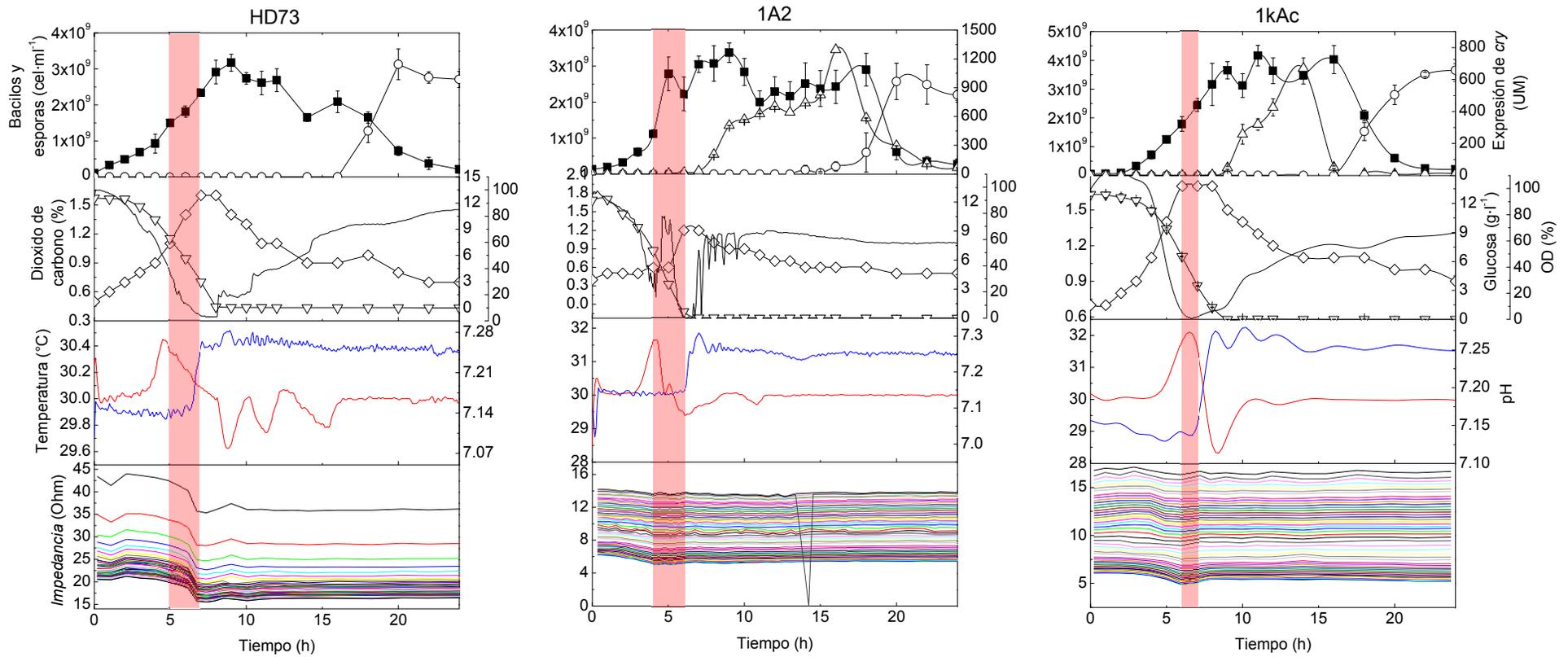
número de bacilos, eficiencia de esporulación y velocidad de consumo de glucosa ( $Q_{\text{glucosa}}$ ).

- **Fermentaciones de *B. thuringiensis* pHTcry1A2**

Algunas diferencias utilizando la misma cepa: la  $\mu$  fue mayor, con  $0.94 \text{ h}^{-1}$  en  $\text{ML}^{\text{pc}}$  (medio limpio con peptona de caseína) a comparación del obtenido con MF de  $0.54 \text{ h}^{-1}$ . La glucosa fue consumida hasta las 14 h en MF en comparación del  $\text{ML}^{\text{pc}}$  con peptona de caseína que concluyo a las 7 h, así como sus velocidades de consumo ( $Q_{\text{glucosa}}$ ) en cada medio respectivamente fueron  $0.18$  y  $0.51 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\text{h}^{-1}$ .

- **Fermentaciones de *B. thuringiensis* pHTcry1kAc**

En la utilización de esta cepa, el crecimiento fue mayor utilizando MF y menor al utilizar  $\text{ML}^{\text{pc}}$  y MHySoy. En cuanto a la expresión de *cry1A*, el valor mayor se obtuvo con MF y ML con doble pase del inculo. En cuanto a la glucosa residual, ésta se consume más rápido si tenemos una mejor transferencia de  $\text{O}_2$  como sucede en la fermentación en ML empleando baffles y las otras tres fermentaciones realizadas en ML seguido del consumo en  $\text{ML}^{\text{pc}}$  y finalmente la glucosa del medio se consume más lento utilizando MF y MHySoy. La fermentación realizada con baffles se descartó para la correlación y análisis de datos dieléctricos pues se observó que las señales dieléctricas mostraron una oscilación permanente debido a que los baffles hechos de acero inoxidable tuvieron un efecto sobre el flujo de corriente que se aplica en la utilización de esta técnica.



**Figura 9.** Perfiles cinéticos de fermentaciones en ML de cepas HD73, 1A2 y 1kAc. Área sombreada corresponde a fase de transición establecida con análisis convencionales. Bacilos (■), esporas (○), expresión de *cry* (△), CO<sub>2</sub> (◇), glucosa (▽), OD (—), temperatura (—) y pH (—).

**Tabla 9.** Comparación de parámetros cinéticos de fermentaciones en diferentes medios de cultivo.

Cepa	Medio de cultivo	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	t <sub>fase</sub> transición (h)	Eficiencia de esporulación (%)	No. de bacilos máximo (cel·ml <sup>-1</sup> )	Actividad de $\beta$ -galactosidasa (MU)	Q <sub>glucosa</sub> (g·l <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	CO <sub>2</sub> max (%)
<b><i>B. thuringiensis</i></b> <b>pHTcry1kAc</b>	MF	0.58	4-6	100	4.4 x 10 <sup>9</sup>	980	0.17	1.6
	MF <sup>2P</sup>	0.73	4-6	100	3.4 x 10 <sup>9</sup>	1096	0.06	1.5
	ML <sup>PC</sup>	0.68	4-6	77	2.6 x 10 <sup>9</sup>	802	0.47	1.6
	ML <sup>1</sup>	0.47	5-7	100	4.0 x 10 <sup>9</sup>	265	0.13	1.4
	ML <sup>2</sup>	0.77	4-6	100	3.5 x 10 <sup>9</sup>	953	0.63	1.7
	ML <sup>3</sup>	0.67	6-7	100	4.2 x 10 <sup>9</sup>	670	0.25	1.7
	ML <sup>CB</sup>	0.59	4-6	100	3.4 x 10 <sup>9</sup>	697	0.32	1.7
	ML <sup>2P</sup>	0.69	4-6	84	4.6 x 10 <sup>9</sup>	1354	0.02	1.6
MHySoy	0.54	4-6	100	2.6 x 10 <sup>9</sup>	684	0.02	1.5	
<b><i>B. thuringiensis</i></b> <b>pHtcry1A2</b>	MF	0.94	5-7	82	3.6 x 10 <sup>9</sup>	1090	0.18	1.5
	ML <sup>PC</sup>	0.54	4-6	100	3.4 x 10 <sup>9</sup>	1297	0.51	1.2
<b><i>B. thuringiensis</i></b> <b>HD73</b>	MF	0.48	4-6	100	3.9 x 10 <sup>9</sup>	NM	0.33	1.7
	ML	0.37	5-7	100	3.2 x 10 <sup>9</sup>	NM	0.14	1.6

NM - No medido

<sup>2P</sup> – Doble pase en inoculo

<sup>PC</sup> – Medio de cultivo preparado con peptona de caseína

<sup>CB</sup> – Fermentación realizada con baffles

<sup>1,2,3</sup> – Numero secuencias de fermentación en mismo medio para cepa 1kAc

Como se mencionó anteriormente, solo las fermentaciones de *B. thuringiensis* pHTcry1kAc se utilizaron para correlacionar con los datos dieléctricos obtenidos en dichos procesos. Los datos obtenidos en estas fermentaciones, así como los tiempos en los cuales se establecieron las fases de crecimiento, sirvieron para tomar los grupos de datos por periodos de tiempo y realizar las correlaciones con los perfiles de parámetros dieléctricos con sus periodos de tiempo correspondientes como se muestra en la Tabla 6.

#### **VII.4 Medición de parámetros dieléctricos por medio de espectroscopía de impedancia en las fermentaciones**

Las fermentaciones por lote de *B. thuringiensis* HD73pHT1kAc fueron monitoreadas en línea por espectroscopía de impedancia adquiriendo los datos de  $Z$ ,  $C_s$ ,  $D$ ,  $Deg$ ,  $V$  y  $I$  así como los parámetros calculados  $R$ ,  $X$  y  $G$ . En la Figura 10 se muestra un ejemplo de una de las fermentaciones realizadas en donde se observan los perfiles de parámetros cinéticos y dieléctricos de un cultivo por lote en ML. En este ejemplo la fase de crecimiento exponencial se estableció de 0 a 4 h, seguida de una fase de crecimiento lineal que corresponde a la fase de transición (4 a 6 h) marcada por una área sombreada, la fase de esporulación se estableció a las 6 h y posteriormente a las 14 h se detectaron esporas libres en el medio de cultivo. En esta fermentación así como en las realizadas en ML, la mayoría de la glucosa fue consumida durante la fase de crecimiento exponencial y fase de transición. En esta figura también se muestran 50 perfiles de datos directos de cada uno de los parámetros dieléctricos obtenidos del barrido en el rango de 42 Hz a 5 MHz. Todos los perfiles dieléctricos medidos en cada frecuencia muestran un patrón de decrecimiento con cambios particulares a lo largo del proceso de fermentación, siendo evidente de 0 a 1 h y de 1 a 4 h que coincidió con la fase de crecimiento exponencial, de 4 a 6 h que

correspondió a la fase de transición y de 6 a 14 h prácticamente a la duración de fase de esporulación. Todos los perfiles de los parámetros dieléctricos de los experimentos mostrados en la Tabla 9 mostraron el comportamiento alrededor de la fase de transición; los perfiles de *Impedancia*, *Voltaje* y *Factor de disipación* muestran una tendencia relacionada a consumo; y los de *Conductancia*, *Angulo de fase* y *Corriente* con el crecimiento celular, mientras que las oscilaciones mostradas en *Resistencia* y *Reactancia* así como las pendientes pronunciadas de los otros parámetros dieléctricos alrededor de la fase de transición, sugerimos que son referidos a la actividad molecular, celular y metabólica que tiene el bacilo en esta fase, requerida para iniciar el proceso de diferenciación celular, que corresponde a que el flux de glicolisis es disminuido y los metabolitos producidos durante el crecimiento vegetativo son consumidos; los ciclos de Krebs y glioxilato están activos (Aronson et al. 1975) y también el citrato y butirato pueden ser producidos (López y López y de la Torre, 2005); así como también que en esta fase el bacilo expresa varias proteasas extracelulares y otras enzimas degradativas, funciones de transporte y numerosas rutas alternas para buscar y maximizar la utilización de nutrientes (Phillips y Strauch 2002). En la fase de esporulación, los ciclos de Krebs, glioxilato y  $\gamma$ -aminobutírico están activos. Por otro lado, conforme el quorum sensing de la población crece, generando un incremento proporcional en la concentración extracelular de moléculas señalizadoras se lleva a cabo, estas moléculas son péptidos autoinductores para comunicarse, son AHL (N-Acyl-homoserine lactones) (Bassler y Losick 2006), que hasta que cierta concentración se alcanza y las células las detectan respondiendo con una alteración en la expresión genética de la población, siendo quorum sensing fundamental para toda la comunicación intercelular (Bassler y Losick 2006) que describe la colección de mecanismos

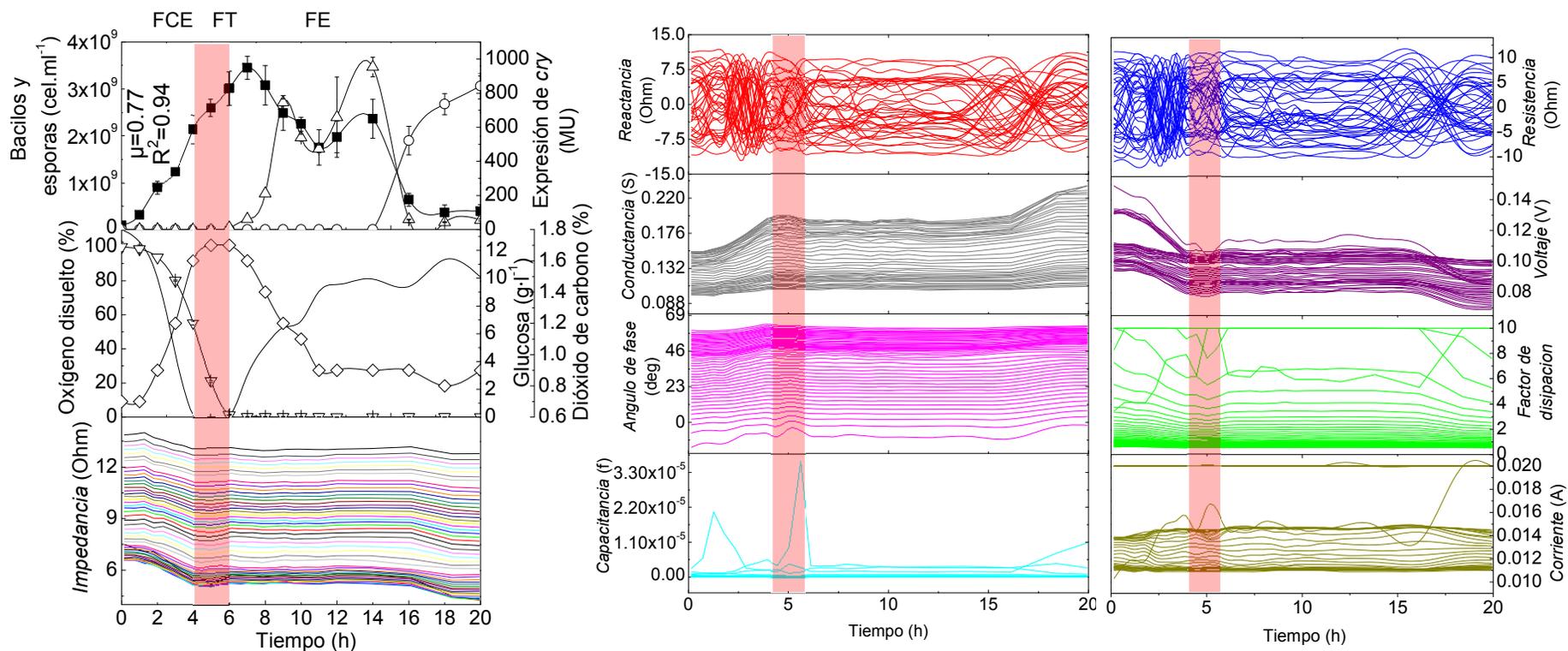
moleculares que son empleados por la bacteria para monitorear la densidad, haciendo de esta manera la comunicación y la decisión de hacer capaz a la población de bacterias para coordinar el crecimiento, movimiento y actividades bioquímicas para especies sobrevivientes y diferenciación (Rocha et al. 2010).

Por otro lado, la proteína AbrB que es un regulador de la fase de transición y está involucrado en la prevención de la expresión inapropiada de los genes en células en crecimiento que durante la fase de esporulación, reorganiza la expresión de más de 100 genes post-crecimiento exponencial con diferentes funciones genéticas incluyendo: formación de biopelículas, producción de antibióticos, movilidad, desarrollo de competencia para captación de DNA, síntesis de enzimas extracelulares y esporulación (Strauch y Hoch 1993, Chumsakul et al. 2011). Adicionalmente, algunos reportes indican que la expresión máxima de AbrB ocurre durante la fase de crecimiento exponencial temprana en *B. subtilis* (Fürbaß et al. 1991, O'Reilly y Devine 1997) y *B. thuringiensis* (Lozano et al. 2014). La regulación de AbrB durante el crecimiento es atribuido a la baja concentración de Spo0A fosforilado (Spo0A~P) (O'Reilly y Devine 1997, Fujita y Sadaie 1998, Fujita et al. 2005, Mirouze et al. 2011), mientras que una alta concentración es necesaria para iniciar la esporulación. Spo0A~P reprime la transcripción del gen *abrB*, causando que la concentración de AbrB caiga por debajo de su límite para la efectividad y disminución de su efecto represivo (Strauch et al. 1989, Fujita et al. 2005) y Spo0A~P también desreprime un número de genes de la fase estacionaria/esporulación, incluyendo *kinA*, *spo0E* y *spo0H* (Sonenshein 2000). En *B. subtilis*, cuando los cultivos celulares alcanzan altas densidades poblacionales, la concentración de los péptidos señal secretados es suficiente para inducir la síntesis de un bajo nivel de

Spo0A~P; dicha síntesis a través del fosforelay es iniciada por KinB y KinC, e involucra las proteínas intermedias Spo0F y Spo0B.

Durante la esporulación hay cambios en la membrana (permeabilidad), el sistema de transferencia asociado a la membrana de glucosa-fosfoenol piruvato y hay cambios en la composición de lípidos de la membrana de transporte activo de cationes que provoca cambios en la densidad electrónica; la actividad de la bomba Ca y K es alta (uptake), así también cambios metabólicos como la elaboración de sistemas de oxidación de acetato ocurren en la fase de transición (Bulla et al. 1980). Tales eventos celulares conducen a un aumento del número de reacciones que pueden incluir: síntesis de genes, moléculas de señalización metabólicas y estructurales de las células, algunas de ellas independientes del crecimiento *per se*, pero relacionadas a la programación del ciclo celular de *B. thuringiensis*.

Con estas referencias de lo que sucede con *B. thuringiensis* específicamente durante el proceso de diferenciación celular, es que sugerimos que las señales respuesta de los parámetros dieléctricos que evaluamos en todas las fermentaciones nos proporcionan información relevante de este evento celular, al notar cambios en pendientes alrededor de la fase de transición.



**Figura 10.** Cinética de fermentación de *B. thuringiensis* HD73 pHT1kAc en ML monitoreada en el rango de 42 Hz a 5 MHz con 25 mediciones.

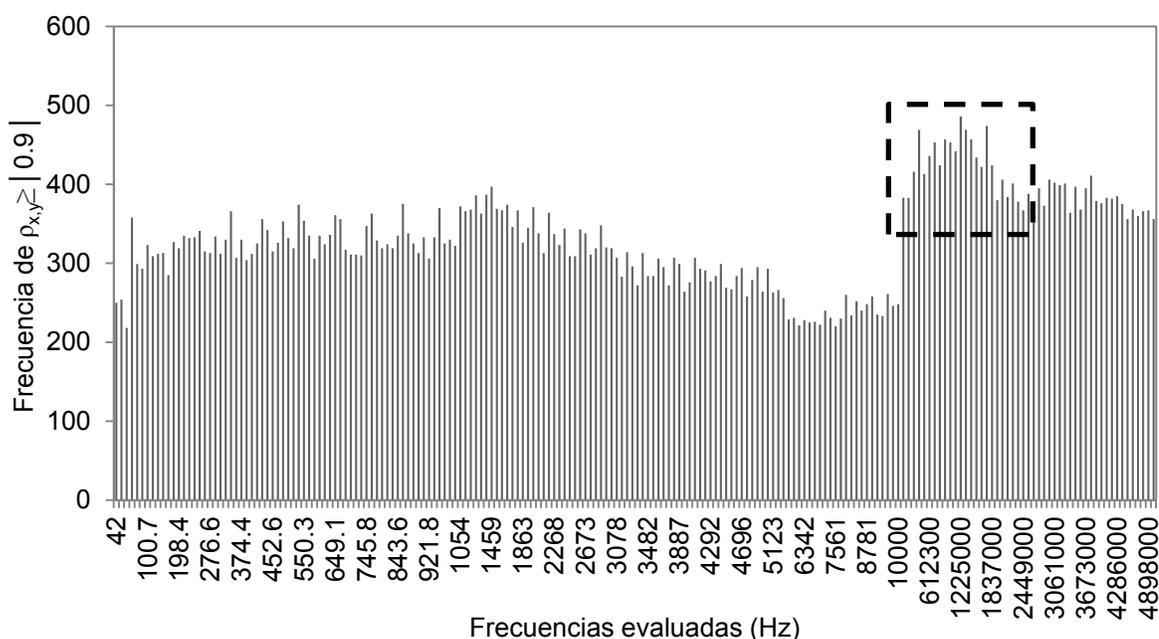
El área sombreada corresponde a la fase de transición determinada por técnicas convencionales. Bacilos (■), Esporas (○), expresión de gen *cry* (Δ), perfil de producción de CO<sub>2</sub> (◇), glucosa residual (▽), OD (-), Perfiles de 50 frecuencias (42 Hz-5 MHz) de *Impedancia* (líneas de colores), *Reactancia* (-), *Resistencia* (-), *Conductancia* (-), *Voltaje* (-), *Angulo de fase* (-), *Factor de disipación* (-), *Capacitancia* (-) y *Corriente* (-).

### **VII.5 Correlaciones de perfiles cinéticos con perfiles de parámetros dieléctricos para selección de frecuencias**

La correlación de datos nos ayudó a identificar y seleccionar las mejores frecuencias que nos proporcionaron mayor y/o mejor información del cultivo evaluado, esto se realizó correlacionando con la Ecuación 9 los datos cinéticos y dieléctricos obtenidos para 8 fermentaciones de *B. thuringiensis* pHTcry1kAc de acuerdo a los parámetros expuestos en la Tabla 6. Por otro lado de las cinéticas de *B. thuringiensis* pHTcry1kAc presentadas en la Tabla 9, de las cuales se excluyó en la que se usaron baffles ya que provocaron interferencia en las señales medidas pues estos están hechos de metal. Las mediciones de espectroscopía de impedancia se obtuvieron sobre 4 rangos de frecuencia desde 42 Hz hasta 5 MHz y tomando los valores directos que nos fue tabulando en Excel<sup>®</sup> el programa Hioki LCR versión 4.03E. De esta manera 200 perfiles de frecuencias fueron correlacionados con cada uno de los perfiles cinéticos y considerando grupos de datos (periodos de tiempo) que corresponden a cada fase de crecimiento y toda la fermentación (Tabla 6).

El criterio de selección de estas correlaciones correspondientes a cada frecuencia evaluada, fue bajo la condición de:  $\rho_{x,y} \geq |0.9|$ , donde 0.9 indica una buena correlación y por el signo resultante de la correlación, el valor se considero absoluto para correlaciones directa (+) o inversamente (-) proporcionales. El fin de seleccionar dichas frecuencias, es para identificar las que nos proporcionen mejor información referente a algún estadio metabólico, fisiológico o celular evaluado con el consumo de sustratos, producción de metabolitos,  $\mu$  y expresión del gen *cry*, englobando relación con el proceso de diferenciación celular.

La selección de las frecuencias que nos proporcionan información resaltable referente al proceso de diferenciación celular se realizó en base al análisis de las correlaciones hechas en las fermentaciones de *B. thuringiensis* pHTcry1kAc de acuerdo a la Ecuación 9 y Tabla 6, de donde se obtuvieron 1,197,000 correlaciones para cada fermentación, consecuentemente, para las 8 fermentaciones dio un total de 9,576,000 correlaciones que fueron evaluadas en el programa Excel®, de las cuales solo el 0.69% cumplieron la condición del coeficiente de correlación:  $\rho_{x,y} \geq |0.9|$  (Figura 11) y de ese grupo de correlaciones, el 10.76% corresponde al rango de frecuencias entre 306.2 y 1837 KHz (Recuadro en Figura 11).



**Figura 11.** Incidencia por correlaciones igual o mayores a 0.9 absoluto de frecuencias evaluadas con espectroscopía de impedancia (200 frecuencias entre 42 Hz y 5 MHz).

En base a estas correlaciones, dos frecuencias se seleccionaron para ser aplicadas como valor fijo en posteriores CL: 1.225 y 0.5 MHz que representan 0.73% y 0.62% que cumplieron con la condición de la Ecuación 9. Adicionalmente, seleccionamos una tercera frecuencia de 0.1 MHz que representa el 0.58% de dichas correlaciones

y que ha sido reportada en otros estudios (Gou et al. 2011, Schwarzenberger et al. 2011).

Otros trabajos que midieron en línea un cultivo celular con espectroscopía de impedancia, han establecido el uso del cambio de capacitancia ( $\Delta C$ ) o permitividad relativa ( $\epsilon$ ) como indicadores de crecimiento de biomasa y usualmente las frecuencias de medición convenientes son de 0.5 a 3.0 MHz en el rango de radio frecuencias (Kiviharju et al. 2008). Interesantemente, el trabajo de Sarrafzadeh et al. (2005), menciona que la fase de transición puede ser detectada en tiempo real con permitividad dieléctrica en CLA de *B. thuringiensis*. La fase de transición se presentó de 14 a 24 h del proceso en donde los autores detectaron células vegetativas y esporas maduras, pero como se mencionó anteriormente, durante la fase de transición a la fase de esporulación una red compleja regulatoria determina si la bacteria inicia con el proceso de esporulación, sugiriendo que no existen esporas durante la fase de transición.

Otros estudios acerca del proceso de diferenciación celular con diferentes sistemas celulares, utilizaron la *Impedancia* normalizada calculada, donde toman como medición de referencia al medio de cultivo antes de ser inoculado o la medición hecha a una frecuencia específica, o una medición particular de una condición del sistema o valores iniciales del proceso. Algunos ejemplos son: el estudio sobre una línea celular de células madre de cáncer embrionario aplicada a la inducción de diferenciación por tratamiento de drogas aplicando monitoreo de impedancia eléctrica célula-sustrato (ECIS por sus siglas en inglés) a 45 KHz (Öz et al. 2013); el estudio de diferenciación neuronal de células madre humanas mesenquimales aplicando ECIS a 16 KHz (Park et al. 2011); el monitoreo del proceso de diferenciación

osteogénico de células madre mesenquimales usando un electrodo planar-base chip a un rango de frecuencia de 100 Hz a 1 MHz (Hildebrandt et al. 2010); y el monitoreo de efectos tóxicos durante la diferenciación adipogénica de células madre mesenquimales usando un electrodo-base chip a un rango de frecuencia de 100 Hz a 1 MHz (Cho et al. 2009).

Con estas referencias se resalta la utilización de frecuencias de entre 100 Hz a 1 MHz independientemente de que se trata de otro sistema celular y manejo de datos a comparación de las frecuencias que se seleccionaron hasta este punto de 0.1, 0.5 y 1.225 MHz y el manejo de datos directos de no solamente *Impedancia*, si no también *Capacitancia*, *Angulo de fase*, *Conductancia*, *Corriente*, *Factor de disipación*, *Voltaje*, *Reactancia* y *Resistencia*.

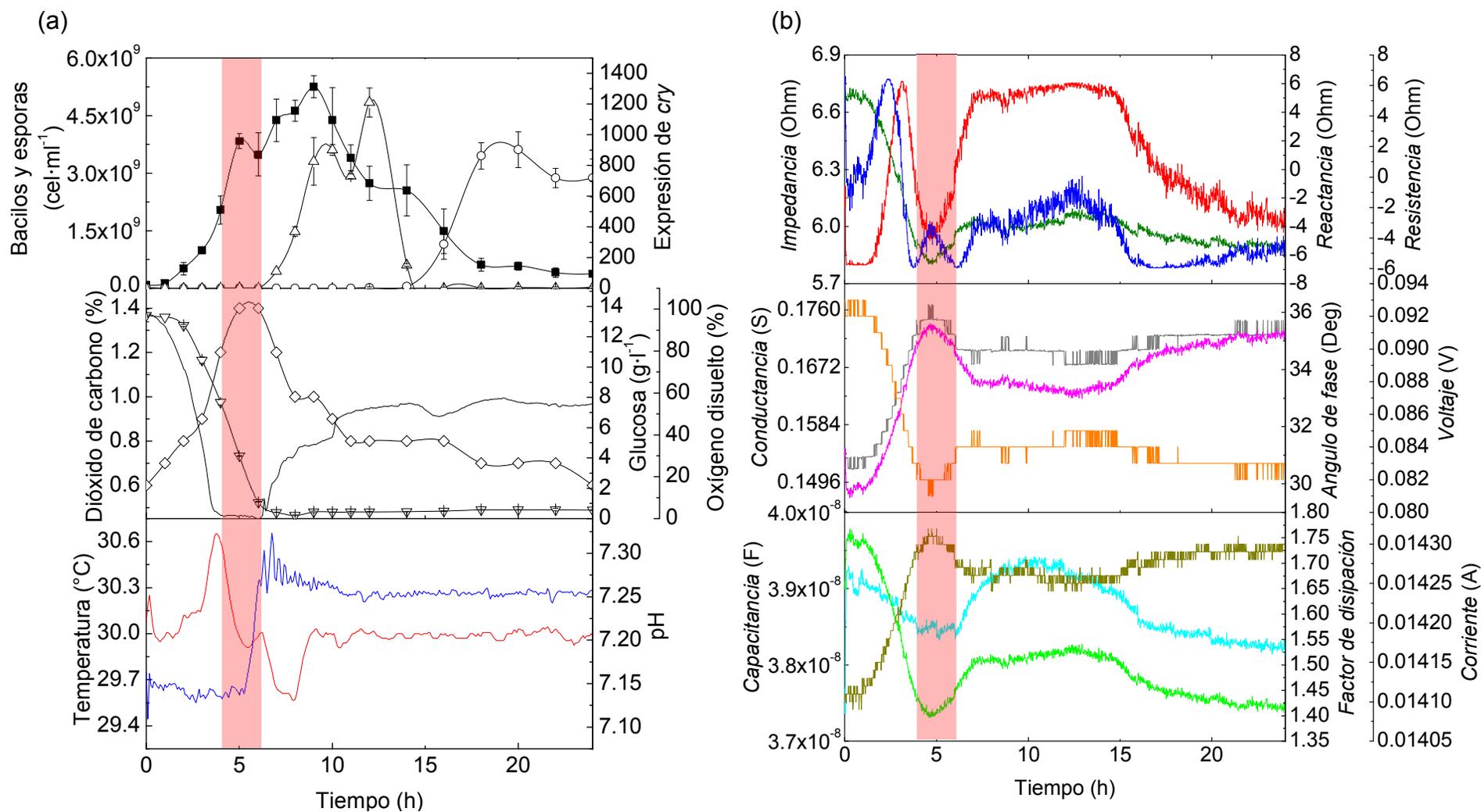
#### **VII.6 Medición en cultivos por lote de *B. thuringiensis* pHTcry1kAc monitoreados a frecuencias fijas de 1.225, 0.5 y 0.1 MHz**

La medición de espectroscopía de impedancia a una frecuencia fija se realizó de manera continua durante todo el proceso, a modo de ejemplo en la Figura 12 y Tabla 10 se muestran los resultados de cuentas celulares de bacilos y esporas, expresión del gen *cry*, consumo de glucosa y OD, perfil de CO<sub>2</sub>, temperatura y pH de una fermentación por lote de *B. thuringiensis* pHTcry1kAc en ML en donde se midió espectroscopía de impedancia a una frecuencia de 1.225 MHz. También se determinaron las diferentes fases de crecimiento como se describió en la sección VI.7.1.

En la Figura 12a, se observa que la fase de crecimiento exponencial se estableció de 0-h a 4-h; la fase de transición de 4-h a 6-h, resaltando que es la fase en donde inicia

el proceso de diferenciación celular desde nivel molecular y metabólico. A las 3.75 h el perfil de OD disminuye su velocidad de consumo y se mantiene bajo hasta las 6.25 h. Con el perfil de CO<sub>2</sub> se observaron valores máximos de 5-h y 6-h. El perfil de pH cambio a las 5.75 h a un valor mayor. El perfil de expresión del gen *cry* mostro actividad a las 7-h, corroborándose el inicio de la fase estacionaria o de esporulación a las 6-h.

Respecto a los perfiles dieléctricos resultantes de esta fermentación ejemplo, se muestran en la Figura 12b en donde con la fase de transición establecida de 4 a 6 h mediante técnicas convencionales, se pueden observar cambios alrededor de esta fase de crecimiento muy evidentes e incluso que se sugiere indican de manera más puntual el inicio de la fase de transición. Corroborando lo anteriormente mencionado, los perfiles de *Impedancia*, *Voltaje* y *Factor de disipación* muestran una tendencia relacionada a consumo; y los de *Conductancia*, *Angulo de fase* y *Corriente* con el crecimiento celular, mientras que las oscilaciones mostradas en *Resistencia* y *Reactancia* así como las pendientes pronunciadas de los otros parámetros dieléctricos alrededor de la fase de transición, los referimos a la actividad molecular, celular y metabólica que tiene el bacilo en esta fase para iniciar el proceso de diferenciación celular, específicamente se observa en el perfil de *Reactancia* a la hora 3.11 un máximo valor relacionado con el inicio real de la fase de transición y su posterior descenso durante esta fase para finalizar a las 7.01 h (Tabla 11), posteriormente el perfil se mantiene estable durante la fase de esporulación hasta las 14.83 h.

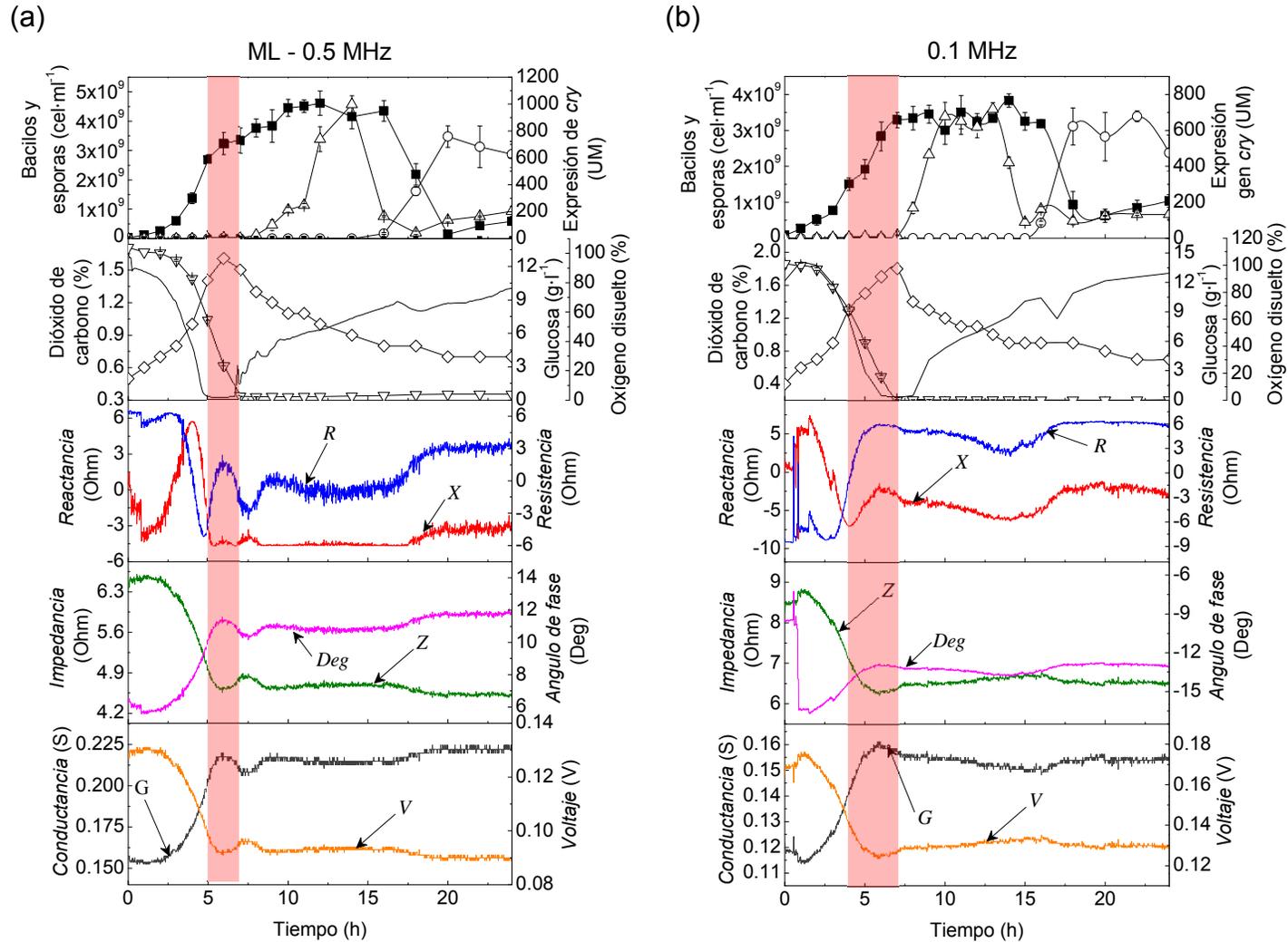


**Figura 12.** Fermentación de *B. thuringiensis* pHTcry1kAc en ML con medición de espectroscopía de impedancia a 1.225 MHz. (a) Bacilos (■), esporas (○), expresión de cry (△), OD (—), temperatura (—), pH (—), glucosa (▽) y CO<sub>2</sub> (◇) (b) Z (—), X (—), R (—), G (—), Deg (—), V (—), Cs (—), D (—) y I (—).

En la Figura 12b también se pueden observar tendencias o valores máximos de parámetros como *Capacitancia*, *Angulo de fase* y *Corriente* indicándonos un mayor flujo de corriente o electrones justo en la fase de transición a diferencia de lo que se observa con los parámetros *Cs*, *R*, *X*, *D*, *V* y *Z*, que muestran una tendencia hacia valores menores, esto se relaciona con un máximo flujo de electrones a través del cultivo y a su vez a través de la membrana celular, que es la principal opositora al paso de la corriente eléctrica al fungir como capacitor. Los tiempos establecidos en esta fermentación por medio de los parámetros dieléctricos (Tabla 11) son: de 0 a 3.11 h para fase de crecimiento exponencial, de 3.11 a 7.01 h para fase de transición y de 7.01 a 14.83 h aproximadamente para la fase de esporulación mostrando un decremento en las señales dieléctricas de *Capacitancia*, *Resistencia*, *Reactancia* y *Factor de disipación*.

Este procedimiento de análisis de datos se realizó para las demás fermentaciones mostradas en las Tablas 10 y 11 utilizando el medio de cultivo ML.

De manera general, en las Figuras 12 y 13 se observan los perfiles dieléctricos medidos en las fermentaciones por lote a una frecuencia fija de 1.225, 0.5 y 0.1 MHz en tiempo real, en donde se ve nuevamente la tendencia que tiene cada perfil con consumo, producción o crecimiento y el proceso de diferenciación celular. De estas propiedades dieléctricas resalta la *Reactancia*, por los cambios que se observan en sus pendientes alrededor de la fase de transición (Tabla 11) indicándonos previamente al tiempo establecido con técnicas convencionales el inicio real de la fase de transición.



**Figura 13.** Cinéticas de fermentaciones de *B. thuringiensis* HD73 pHT1kAc en ML monitoreadas a (a) 0.5 y (b) 0.1 MHz. Bacilos (■), esporas (○) y expresión de gen *cry* (Δ), perfil de producción de CO<sub>2</sub> (◇), glucosa residual (▽) y OD OD (—), X (—), R (—), Z (—), Deg (—), G (—) y V (—).

En la Tabla 12 se muestran las comparaciones de los datos cinéticos obtenidos de los experimentos mencionados más una fermentación sin medición de impedancia, así como los tiempos en los que se establecieron las fases de crecimiento.

El perfil de *Resistencia* a 1.225 MHz presentó cambios particulares durante la fase de crecimiento exponencial, fase de transición, fase de esporulación y liberación de esporas. Durante la fase de crecimiento exponencial un incremento súbito se observó al inicio del proceso de fermentación a las 2.3 h, este valor decreció hasta las 3.71 h, este tiempo se relacionó con el establecimiento de la fase de transición fuera de línea (4 h). Posteriormente, la *Resistencia* incrementó su valor a las 4.66 h y decreció a las 5.95 h que coincidió con el establecimiento de la fase de esporulación que incrementó nuevamente hasta las 7.01 h, donde la actividad de  $\beta$ -galactosidasa se comenzó a detectar. Entre las 7.01 h hasta las 15 h el comportamiento de la señal de *Resistencia* se relacionó con la fase de esporulación (o proceso de diferenciación celular) pero no en un patrón constante. Tal periodo ajustó con el tiempo reportado (alrededor de 6-8 h) necesario para completar la fase de esporulación en *B. subtilis* (Losick et al. 1986, Phillips y Strauch 2002). El tiempo del cambio abrupto en la señal de *Resistencia* de la fase de crecimiento exponencial hasta el establecimiento de la fase de esporulación fue de 4.72 h, mientras el comportamiento sinusoidal dentro de la fase de transición evaluada fuera de línea correspondió al periodo de 2.24 h. Por otro lado, *Reactancia* tuvo un incremento en su señal hasta un máximo de 3.15 h, posteriormente la señal decreció hasta las 4.66 h. Después de esto, la señal de *Reactancia* tuvo un incremento hasta las 7.01 h. Posteriormente, el comportamiento de *Reactancia* fue constante en un periodo de 7.85 h. En ambas propiedades,

*Resistencia* y *Reactancia* aproximadamente a las 14.8 h se observó un decremento de la señal del perfil que fue relacionado con el inicio de la liberación de esporas, aunque las esporas libres se detectaron microscópicamente a las 16 h.

En el caso del CL monitoreado a 0.5 MHz (Figura 13a), *Resistencia* tuvo un comportamiento similar al que se observó con 1.225 MHz (Figura 12), pero los cambios ocurrieron a diferentes tiempos. La señal de *Resistencia* decreció a las 3.11 h hasta 4.7 h, después se presentó un comportamiento sinusoidal durante la fase de transición incrementó, disminuyó y volvió a elevarse su valor a las 5.9, 7.16 y 8.7 h respectivamente. Entre el cambio de *Resistencia* en la fase de crecimiento exponencial y fase de esporulación pasaron 5.59 h donde el comportamiento sinusoidal durante la fase de transición duro 2.46, 0.87 y 0.22 h más que en el CL a 1.225 MHz, respectivamente. Tales diferencias en tiempo sugieren ser específicas para cada CL a pesar de tener las mismas condiciones experimentales. La *Reactancia* también presentó un cambio resaltado durante la fase de crecimiento exponencial, después el comportamiento fue relacionado a la fase de transición, fase de esporulación y liberación de esporas pero la señal respuesta fue menos evidente. Por otro lado, para el análisis de 0.1 MHz (Figura 13b), los perfiles de *Resistencia* y *Reactancia* fueron más difíciles de relacionar con las diferentes etapas de crecimiento de *B. thuringiensis*.

A pesar de la frecuencia aplicada (0.1, 0.5 y 1.225 MHz) los perfiles de los parámetros dieléctricos *Z*, *Deg*, *G* y *V* fueron relacionados con el crecimiento y cambio cuando la bacteria alcanzó la fase de transición. Sin embargo, las señales no mostraron una buena correlación con las distintas fases de crecimiento como se observó para *R* y *X* (Figuras 12 y 13). Además, *Z* y *V* tuvieron una tendencia a

decrecer su señal durante la fase de crecimiento exponencial, parecido al perfil de consumo de sustrato (ver perfiles de glucosa y OD) y fue más pronunciada a 0.5 y 0.1 MHz. *Deg* y *G* tuvieron la tendencia de incrementar su señal con características parecidas a la curva de crecimiento o perfil de producción de CO<sub>2</sub> y es más notable en el perfil de *G* a 0.5 MHz (Figura 13a).

Del análisis de parámetros cinéticos de fermentaciones enlistadas en Tabla 10, notamos diferencias entre cultivos,  $\mu$  en experimentos a 1.225 y 0.5 MHz fueron más altos que la que se obtuvo a 0.1 MHz y en la fermentación sin medición de impedancia; la eficiencia de esporulación se consideró aceptable para la producción de *B. thuringiensis*; y la expresión de *cry1A* evaluada por medio de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, fue más grande en la fermentación evaluada a 1.225 MHz seguida por la de 0.5 MHz, y la expresión del gen *cry1A* fue comparable entre los experimentos a 0.1 MHz con la fermentación sin medición de impedancia. En la Tabla 11 se observa que el tiempo de establecimiento de la fase de transición fue el mismo para experimentos evaluados a 1.225 y 0.1 MHz así como para el cultivo sin medición de espectroscopía de impedancia y el evaluado a 0.5 MHz. El tiempo en donde se estableció la fase de esporulación, 1 h antes en el cultivo evaluado a 1.225 MHz que el resto de los cultivos. En la Tabla 12 se observa que las cuentas celulares fueron distintas entre los experimentos y el cambio de  $\mu$  (análisis de la varianza con un factor, ANOVA). Las cuentas celulares evaluadas en los experimentos a 1.225 y 0.5 MHz son comparables al cambio de *Resistencia*, pero diferentes al cambio de *Reactancia*. Interesantemente las cuentas celulares en la fase de esporulación no mostraron diferencia significativa (ANOVA); y la concentración de glucosa residual no se consideró limitante a los cambios de *Resistencia* y *Reactancia* a 1.225 y 0.5 MHz.

**Tabla 10.** Parámetros cinéticos de fermentaciones realizadas de *B. thuringiensis* pHTcry1kAc aplicando una frecuencia fija para monitorear en línea con espectroscopía de impedancia.

Medio de cultivo / Frecuencia de medición	Bacilos máximos	$\mu$	Expresión máxima de cry	Eficiencia de esporulación	Dióxido de carbono máximo
	(cel·ml <sup>-1</sup> )	(h <sup>-1</sup> )	(UM)	(%)	(%)
ML 0.1 MHz <sup>g</sup>	3.83x10 <sup>9</sup> (±1.89x10 <sup>8</sup> )	0.68 (R <sup>2</sup> =0.96)	718 (±37)	72.2	1.8
ML 0.1 MHz	6.25x10 <sup>9</sup> (±8.66 x10 <sup>8</sup> )	0.83 (R <sup>2</sup> =0.97)	935 (±165)	100.0	1.1
ML 0.5 MHz <sup>g</sup>	4.61x10 <sup>9</sup> (±4.15x10 <sup>8</sup> )	0.84 (R <sup>2</sup> =0.99)	996 (±65)	86.1	1.6
ML 1.225 MHz* <sup>g</sup>	5.25x10 <sup>9</sup> (±2.89x10 <sup>8</sup> )	0.83 (R <sup>2</sup> =0.98)	1210 (±95)	82.7	1.4
ML 1.225 MHz	4.16x10 <sup>9</sup> (±3.90x10 <sup>8</sup> )	0.70 (R <sup>2</sup> =0.99)	2711 (±371)	91.6	1.5
ML <sup>NMED</sup>	4.38x10 <sup>9</sup> (±3.80x10 <sup>8</sup> )	0.76 (R <sup>2</sup> =0.93)	722 (±3)	80.1	1.3
ML <sup>NMED</sup>	3.94x10 <sup>9</sup> (±4.27x10 <sup>8</sup> )	0.76 (R <sup>2</sup> =0.99)	1469 (±133)	100.0	1.5

\*Fermentación ejemplo de análisis y datos determinados en cada proceso

<sup>g</sup> – Datos de fermentación graficada

<sup>NMED</sup> – No medido por espectroscopia de impedancia

**Tabla 11.** Establecimiento del tiempo de fases de crecimiento en fermentaciones realizadas de *B. thuringiensis* pHTcry1kAc aplicando una frecuencia fija para monitorear en línea con espectroscopía de impedancia.

Medio de cultivo / frecuencia de medición	t fase de crecimiento exponencial (h)		t fase de transición (h)		t fase de esporulación (h)	
	cinéticos	dieléctricos	cinéticos	dieléctricos	cinéticos	dieléctricos
ML 0.1 MHz <sup>g</sup>	0-4	0-1.56	4-7	1.56-5.88	7-15	5.88-17.44
ML 0.1 MHz	0-6	0-4.83	6-7	4.83-7.77	7-18	7.77-17.25
ML 0.5 MHz <sup>g</sup>	0-5	0-4.08	5-7	4.08-7.50	7-16	7.05-17.51
ML 1.225 MHz* <sup>g</sup>	0-4	0-3.11	4-6	3.11-7.01	6-14	7.01-14.83
ML 1.225 MHz	0-5	0-3.70	5-7	3.70-7.10	7-16	7.10-16.80
ML <sup>NMED</sup>	0-5	-	5-7	-	7-16	-
ML <sup>NMED</sup>	0-7	-	7-9	-	9-18	-

\*Fermentación ejemplo de análisis y datos determinados en cada proceso

ND – No definido

<sup>g</sup> – Datos de fermentación graficada

<sup>NMED</sup> – No medido por espectroscopia de impedancia

**Tabla 12.** Parámetros cinéticos de cultivos por lote de *B. thuringiensis* pHT1kAc en ML monitoreado a 1.225, 0.5 y 0.1 MHz.

	Frecuencia (MHz)			Sin medición de impedancia
	1.225	0.5	0.1	
Cuentas de bacilos (cel ml <sup>-1</sup> )				
Al tiempo 0 h	8.17 x 10 <sup>7</sup> (±2.04 x 10 <sup>7</sup> )	3.67 x 10 <sup>7</sup> (±4.79 x 10 <sup>6</sup> )	9.00 x 10 <sup>7</sup> (±1.47 x 10 <sup>7</sup> )	6.17 x 10 <sup>7</sup> (±1.58 x 10 <sup>7</sup> )
Al cambio en $\mu$	2.04 x 10 <sup>9</sup> (±3.66 x 10 <sup>8</sup> )	2.69x10 <sup>9</sup> (±1.49 x 10 <sup>8</sup> )	1.50x10 <sup>9</sup> (±1.78 x 10 <sup>8</sup> )	2.16 x10 <sup>9</sup> (±3.79 x 10 <sup>8</sup> )
Al tiempo del establecimiento de la fase de esporulación	3.40 x 10 <sup>9</sup> (±5.61 x 10 <sup>8</sup> )	3.34x10 <sup>9</sup> (±4.29 x 10 <sup>8</sup> )	3.29x10 <sup>9</sup> (±2.14 x 10 <sup>8</sup> )	3.58 x10 <sup>9</sup> (±4.27 x 10 <sup>8</sup> )
Al cambio de $R^c$	5.13 x10 <sup>8</sup> (±1.65 x 10 <sup>8</sup> )	6.00x10 <sup>8</sup> (±7.07 x 10 <sup>7</sup> )	No definido	No medido
Al cambio de $X^c$	9.88 x10 <sup>8</sup> (±4.79 x 10 <sup>7</sup> )	1.38x10 <sup>9</sup> (±1.85 x 10 <sup>8</sup> )	No definido	No medido
Glucosa al cambio de $\mu$ (g·l <sup>-1</sup> )	7.6	7.1	9.17	7.67
Glucosa al cambio de $R^c$ (g·l <sup>-1</sup> )	12.7	12.5	No definido	No medido
Glucosa al cambio de $X^c$ (g·l <sup>-1</sup> )	10.4	10.9	No definido	No medido

<sup>a</sup>Valores determinados al tiempo de establecimiento de fase de transición

<sup>b</sup>Valores calculados con cuentas de bacilos determinadas en el establecimiento de la fase de esporulación y conteo final de esporas

<sup>c</sup>Valores determinados al cambio de durante la fase de crecimiento exponencial

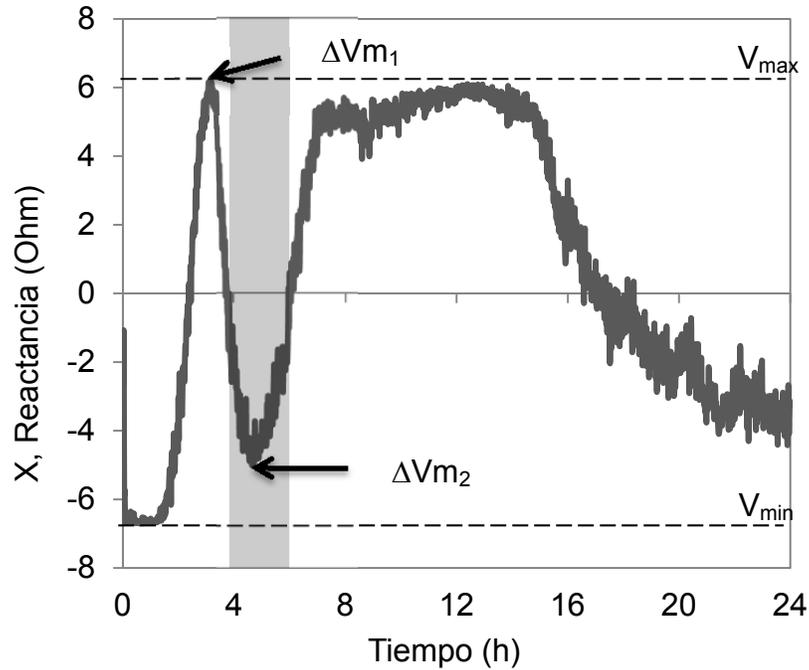
## VII.7 Porcentaje de diferencia de cambio de perfil dieléctrico

Este cálculo se realizó con la intención de identificar qué perfil obtenido de las propiedades dieléctricas medidas durante el proceso, muestran un cambio más evidente alrededor de la fase de transición y referidas al proceso de diferenciación celular, lo cual también se sugiere que sería la propiedad dieléctrica más sensible para identificar este evento celular. Aplicando la Ecuación 10, se consideraron los valores máximo y mínimo de todo el perfil, siendo esta diferencia la representación del 100% de un rango en el que se obtuvieron dichos resultados, y la diferencia específica se relaciona al proceso de diferenciación celular, y fue obtenida de los cambios de los valores de la propiedad dieléctrica alrededor de la fase de transición, representando estos un porcentaje de todo el rango dieléctrico en el que se obtuvieron resultados.

Se observaron cambios de pendiente alrededor de la fase de transición (flechas en Figura 14) en los perfiles dieléctricos, con los que se calculó el porcentaje de diferencia de cambio ( $\% \Delta$ ) que estos presentaron aplicando la Ecuación 10 para cada propiedad dieléctrica.

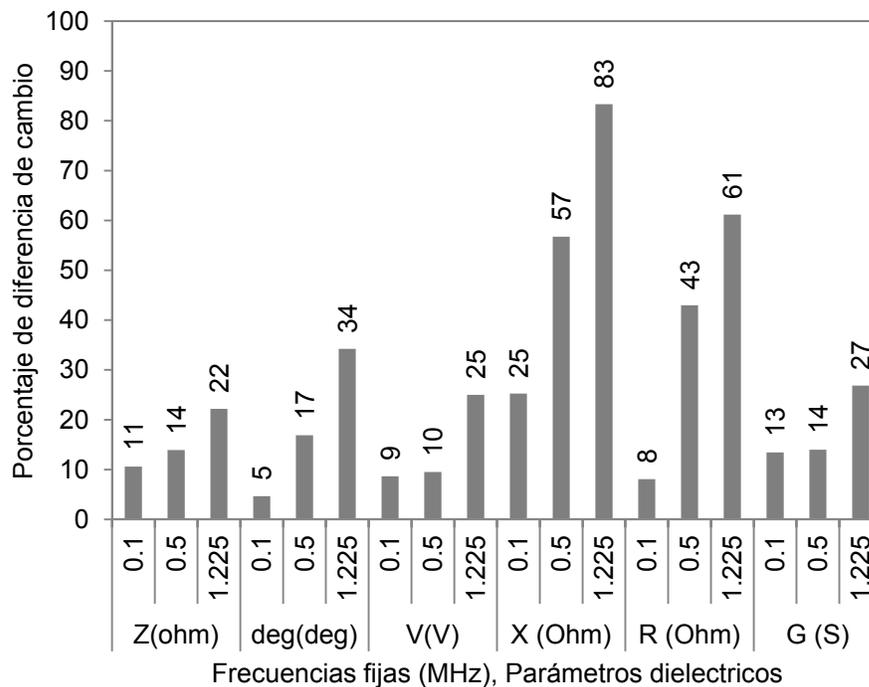
$$\% \Delta = \frac{|\Delta m_1 - \Delta m_2|}{|V_{\max} - V_{\min}|} \times 100 \quad (10)$$

Dónde:  $\Delta m_1$  es valor al primer cambio de pendiente,  $\Delta m_2$  es el valor al segundo cambio de pendiente (flechas en Figura 14, respectivamente),  $V_{\max}$  y  $V_{\min}$  son el valor máximo y mínimo de la propiedad en todo el bioproceso (líneas punteadas superior e inferior en Figura 14).



**Figura 14.** Ejemplo de perfil dieléctrico (*Reactancia*) obtenido en una fermentación a frecuencia fija para calcular el porcentaje de diferencia de cambio ( $\% \Delta$ ). Área sombreada corresponde a fase de transición establecida por técnicas convencionales.

Para esto se consideraron las fermentaciones evaluadas a 0.1, 0.5 y 1.225 MHz mostradas en Tabla 12. Los resultados se muestran en la Figura 15, en donde es evidente que la *Reactancia* es el parámetro que muestra mayor diferencia y porcentaje de cambio del perfil referenciada al proceso de diferenciación celular junto con la *Resistencia*, ambos grupos de perfiles obtenidos a 1.225 MHz, a los cuales les siguen los obtenidos con 0.5 MHz.



**Figura 15.** Diferencia de porcentaje del perfil dieléctrico alrededor de la fase de transición adquirida en un bioproceso.

## VII.8 Medición de cultivos bajo diferentes condiciones monitoreados a 0.5 y 1.225 MHz

Estos experimentos se realizaron para corroborar la información obtenida al monitorear un cultivo de *B. thuringiensis* bajo diferentes medios de cultivo, en este caso el MF a distintas concentraciones de sólidos totales ( $C_{ST}$ ) 40 y 90  $g \cdot l^{-1}$  y aplicando ML en cultivos por lote alimentado con las frecuencias que mejor información nos dieron: 0.5 y 1.225 MHz.

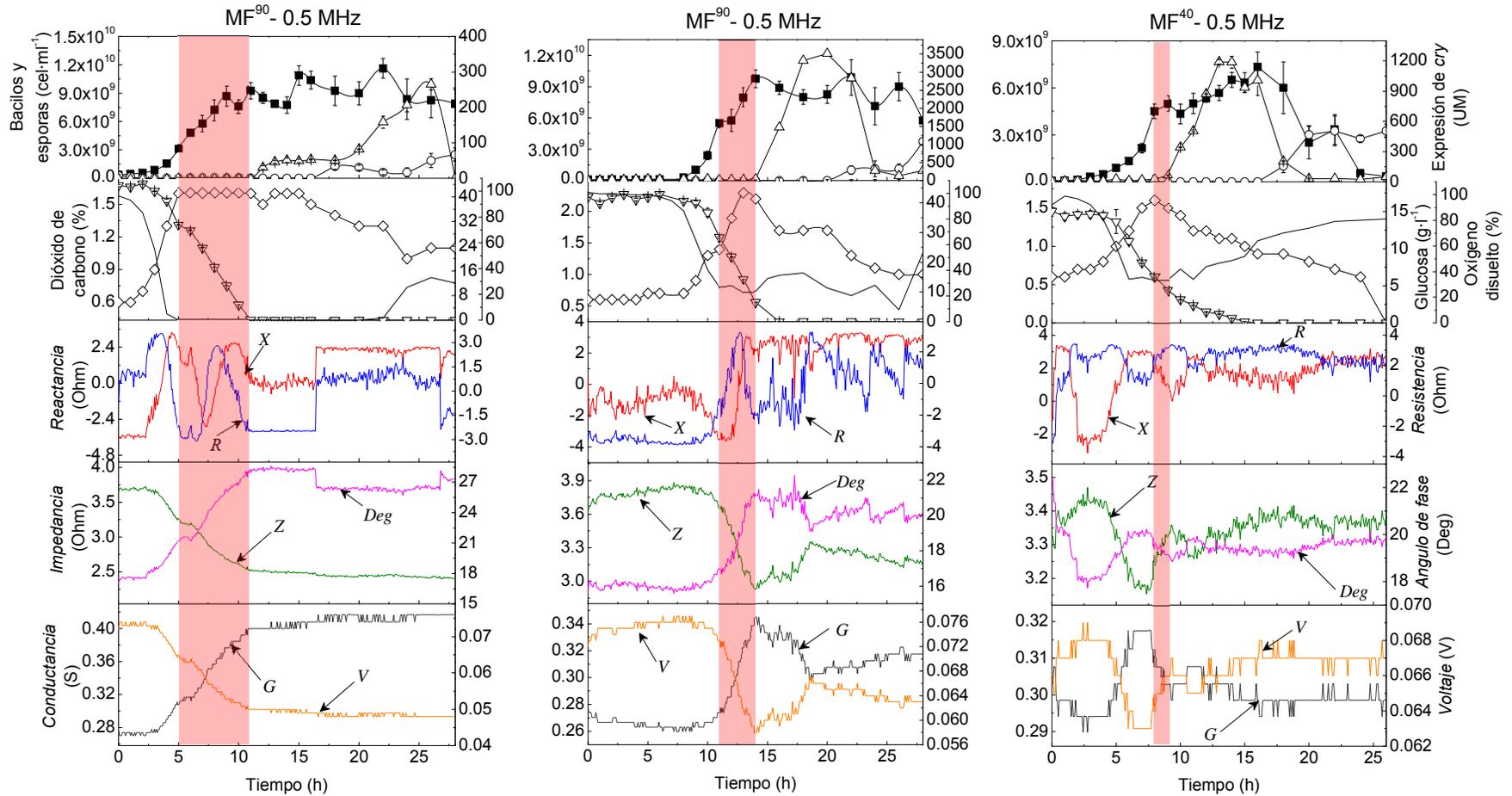
### VII.8.1 Cultivos por lote de *B. thuringiensis* pHT1kAc en medios con diferente $C_{ST}$

Se realizaron fermentación con  $C_{ST}$  de 40 y 90  $g \cdot l^{-1}$  MF<sup>40</sup> y MF<sup>90</sup> respectivamente del MF aplicando una frecuencia de 0.5 MHz. Los perfiles cinéticos y dieléctricos obtenidos se observan en la Figura 16, y la identificación de cada fase de crecimiento junto con los parámetros cinéticos y se observan en la Tabla 13. En donde se

observa que en dos de ellas se mantuvo el OD mayor a 20% modificando las rpm de la agitación y el vvm de aireación con el objetivo de que el oxígeno no fuera limitante en la fermentación y esto no provoque que el bacilo pase a la fase de transición.

En la fermentación en MF<sup>90</sup> donde no se controló el OD, se obtuvo una eficiencia de esporulación de 38.5%. En la Tabla 13 se muestran también las cantidades de bacilos máximos con valores más altos en las fermentaciones en MF<sup>90</sup>. Respecto a la expresión de *cry*, resalta la obtenida en la fermentación en MF<sup>90</sup> con control de OD con 3512 UM a las 20 h. Y finalmente, con las cantidades máximas de CO<sub>2</sub> obtenidas, resalta también esta fermentación con 2.3%. Los perfiles de bacilos, esporas, CO<sub>2</sub>, OD y con perfiles dieléctricos con MF<sup>90</sup> específicamente no mostraron los cambios característicos referentes a la fase de transición. La expresión del gen *cry* resalta en MF<sup>40</sup> y MF<sup>90</sup> donde el OD se mantuvo por arriba de 20% a diferencia de la otra fermentación mostrada en la Figura 16.

En la Tabla 13 también se muestran los tiempos en los cuales fueron establecidas las fases de crecimiento para cada fermentación por técnicas convencionales y se comparan con los tiempos en los cuales hubo un cambio de perfil de las propiedades dieléctricas; se observa que mediante perfiles dieléctricos específicamente de *Reactancia* y *Resistencia*, el tiempo para la fase de transición es más grande, acortando la fase de crecimiento exponencial y recorriendo la fase de esporulación, con lo que se corrobora la sugerencia de que con la medición en línea con espectroscopía de impedancia, la respuesta es puntual y sensible para cuando en los bacilos se presenta la fase de transición y su preparación para iniciar su proceso de diferenciación celular.



**Figura 16.** Fermentaciones en CL de *B. thuringiensis* pHT1kAc en MF con diferentes  $C_{ST}$ . Bacilos (■), esporas (○), expresión de *cry* (△),  $CO_2$  (◇), glucosa (▽), OD (—), X (—), R (—), Z (—), Deg (—), G (—), V (—).

**Tabla 13.** Parámetros cinéticos de fermentaciones con MF con diferente  $C_{ST}$  monitoreadas a una frecuencia de 0.5 MHz.

		MF <sup>90</sup> 0.5 MHz	MF <sup>90</sup> OD>20% 0.5 MHz	MF <sup>40</sup> OD>20% 0.5 MHz
Bacilos máximos (cel·ml <sup>-1</sup> )		1.09x10 <sup>10</sup> (±1.03x10 <sup>9</sup> )	9.88x10 <sup>9</sup> (±1.70x10 <sup>9</sup> )	7.33x10 <sup>9</sup> (±9.57x10 <sup>8</sup> )
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )		0.42 (R <sup>2</sup> =0.96)	0.81 (R <sup>2</sup> =0.97)	0.54 (R <sup>2</sup> =0.99)
Expresión máxima de cry (UM)		265 (±16)	3512 (±25)	1189 (±21)
Eficiencia de esporulación (%)		27.0	38.5	65.0
Dióxido de carbono máximo (%)		1.6	2.3	1.6
$t_{\text{fase de crecimiento exponencial}}$ (h)	cinéticos	0-5	6-11	0-8
	dieléctricos	0-4.39	0-7.17	0-7.78
$t_{\text{fase de transición}}$ (h)	cinéticos	5-11	11-14	8-9
	dieléctricos	4.39-10.94	7.17-13.17	7.78-10.54
$t_{\text{fase de esporulación}}$ (h)	cinéticos	11-ND	14-ND	9-20
	dieléctricos	10.94- ND	13.17- ND	10.54-21.08

### VII.8.2 Cultivos por lote alimentado de *B. thuringiensis* pHT1kAc en ML

Finalmente se realizaron dos CLA (Figuras 17 y 18) para monitorearlos en tiempo real aplicando la frecuencia de 1.225 MHz. Las condiciones de operación y estrategia de alimentación se calcularon aplicando las Ecuaciones (2, 3, 4 y 5) para mantener una  $\mu$  constante de 0.8 h<sup>-1</sup> y donde:

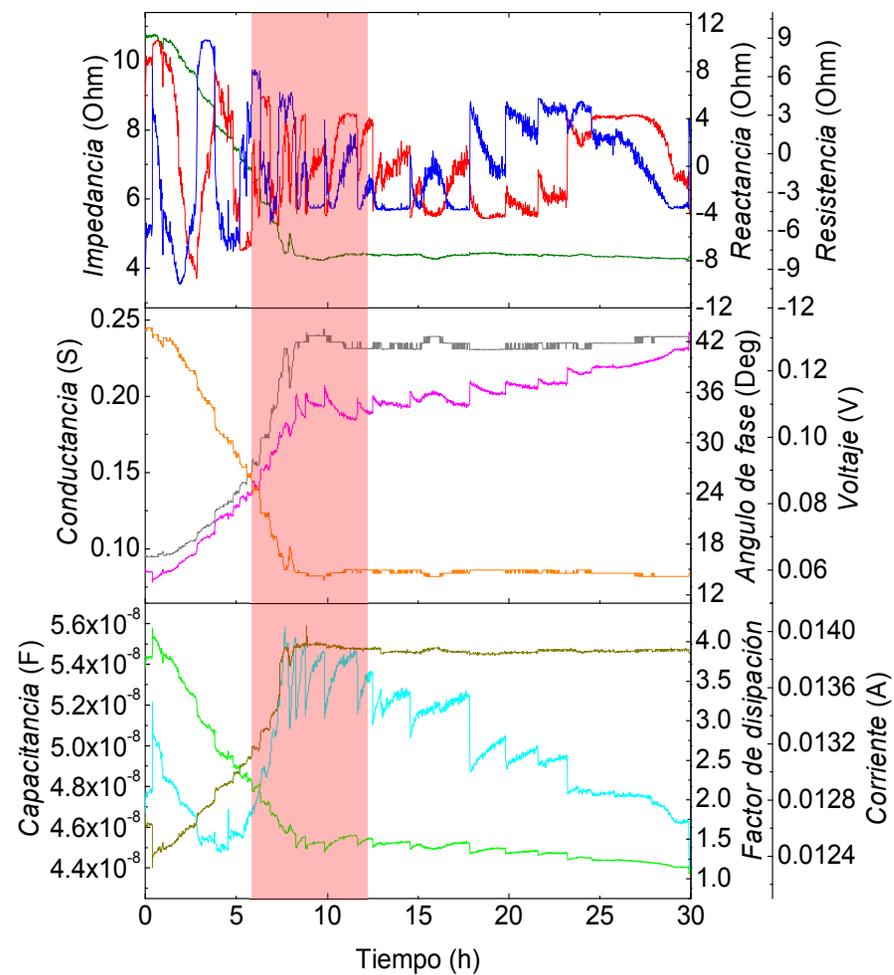
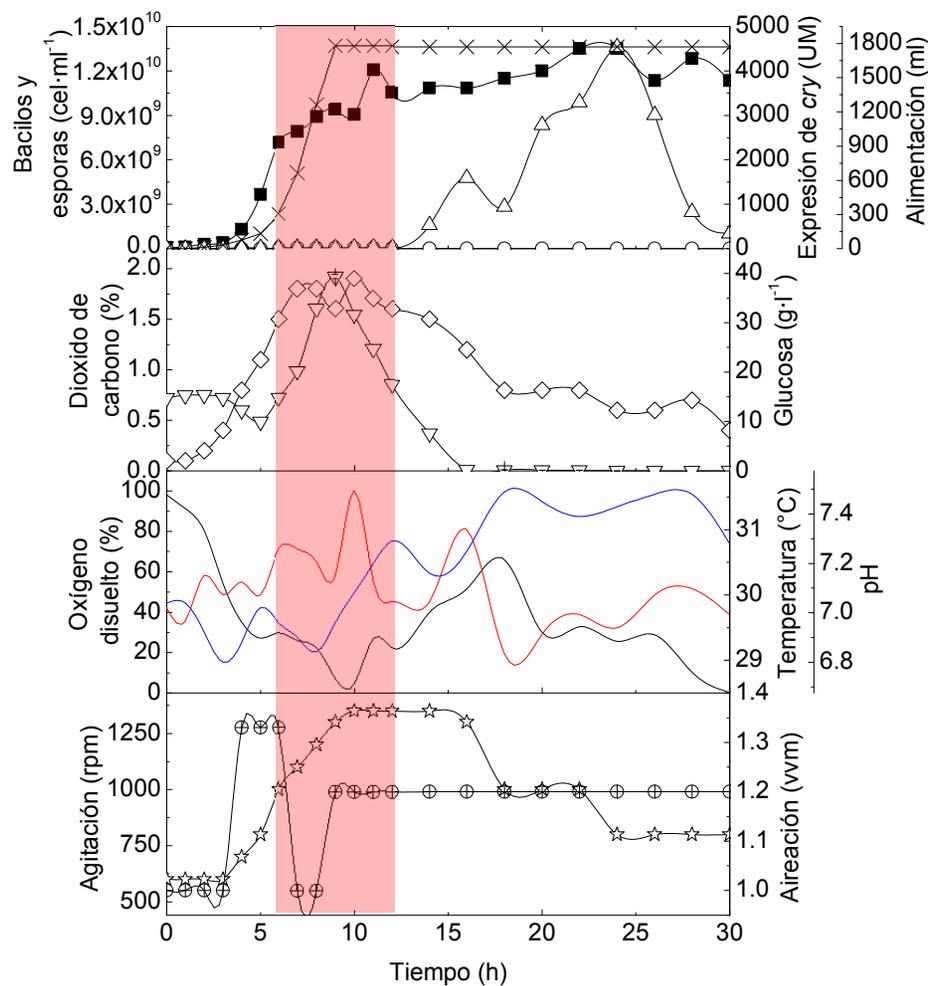
$$\begin{aligned}
 V_0 &= 3 \text{ l} \\
 \mu &= 0.8 \text{ h}^{-1} \\
 S_0 &= 225 \text{ g}_s \cdot \text{l}^{-1} \\
 S &= 12 \text{ g}_s \cdot \text{l}^{-1} \\
 q_s &= 2.4 \text{ g}_s \cdot (\text{g}_x \cdot \text{h})^{-1} \\
 Y_{x/S} &= 0.58 \text{ g}_x \cdot \text{g}_s^{-1}
 \end{aligned}$$

La alimentación exponencial se inició a las 2-h y 1-h para las fermentaciones CLA<sub>1</sub> y CLA<sub>2</sub> en Figuras 17 y 18 respectivamente, y se detuvo alrededor de las 9-h; al igual

que en los CL se determinaron las fases de crecimiento en función de los resultados de los análisis convencionales. En la Tabla 14 se puede observar que los tiempos establecidos en base a los perfiles cinéticos de bacilos del crecimiento exponencial de las 0-h hasta las 6 y 7-h y las  $\mu$  obtenidas para las fermentaciones fue de 0.78 y 0.66 h<sup>-1</sup> para CLA<sub>1</sub> y CLA<sub>2</sub>, con lo que se sugiere que la fase de transición se estableció durante la alimentación en ambos cultivos. Se consideraron los perfiles de CO<sub>2</sub> y OD para confirmar el inicio de la fase de transición y para la finalización de esta fase de crecimiento usamos a la expresión del gen *cry* observada en ambos cultivos a las 14 h y en donde se tuvo un decremento en la producción de CO<sub>2</sub>; por otro lado, para mantener la concentración de OD en el cultivo, se manejaron agitaciones de 600 hasta 1300 rpm y aireación de 1.0 a 1.8 vvm; la expresión del gen *cry* fue de 4531.0 y 9233.0 UM para CLA<sub>1</sub> y CLA<sub>2</sub> respectivamente, cuyos valores de expresión del gen *cry* no se alcanzaron en cultivos por lote; el valor de expresión máxima de *cry* que se había logrado fue de 2711.0 para un CL con ML medido a 1.225 MHz; en el CLA<sub>1</sub> no se observaron bacilos esporulados ni esporas al final de la fermentación, lo cual es característico de este tipo de cultivo en *B. thuringiensis* pero si en el CLA<sub>2</sub> obteniéndose una eficiencia de esporulación de 100%; se observó que la fase de transición se extendió por 6 y 4 h en CLA<sub>1</sub> y CLA<sub>2</sub> respectivamente. Las especies de *Bacillus* generalmente requieren la actividad del ciclo de ácidos tricarbóxicos para una exitosa esporulación (Aronson et al. 1975) aunque la función de este ciclo varía de acuerdo a los sustratos usados para cultivar las células, sus funciones son la producción de energía vía la secuencia de reacciones catabólicas y el suministro de esqueletos de carbón para la síntesis de glutamato por medio de diferentes enzimas (Hanson y Cox 1967). Por otro lado, una alta concentración de sólidos totales (nutrientes) inhibe el número de esporas y producción de  $\delta$ -

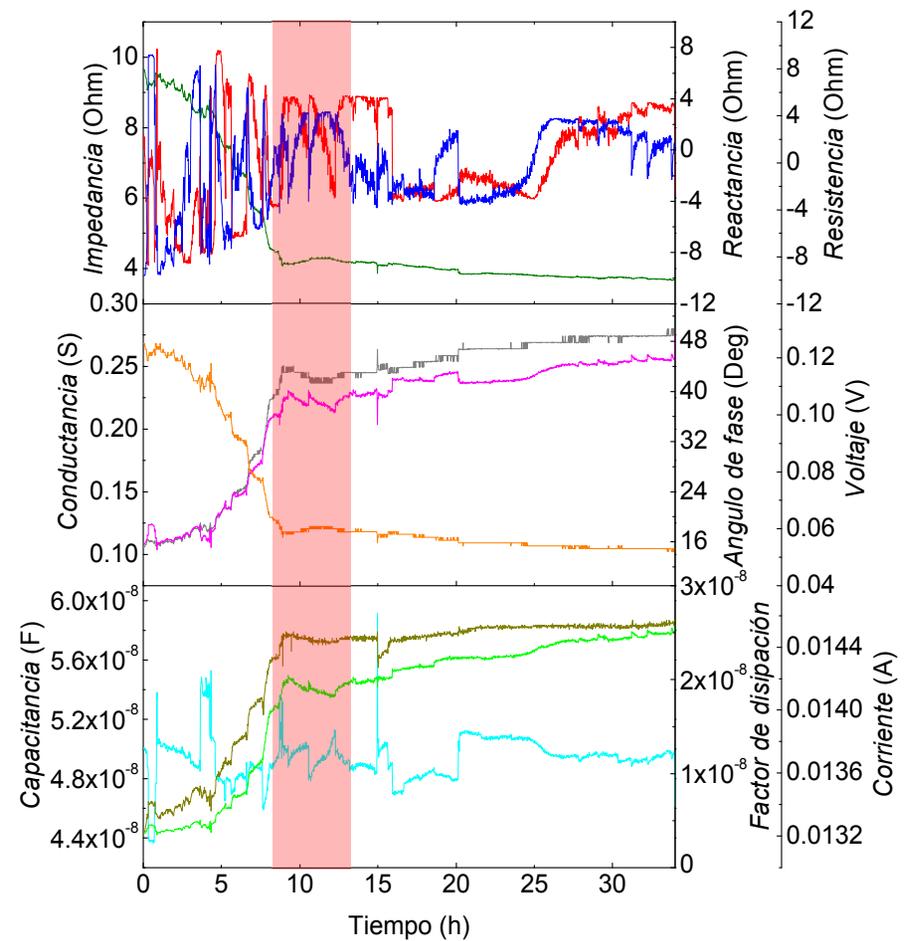
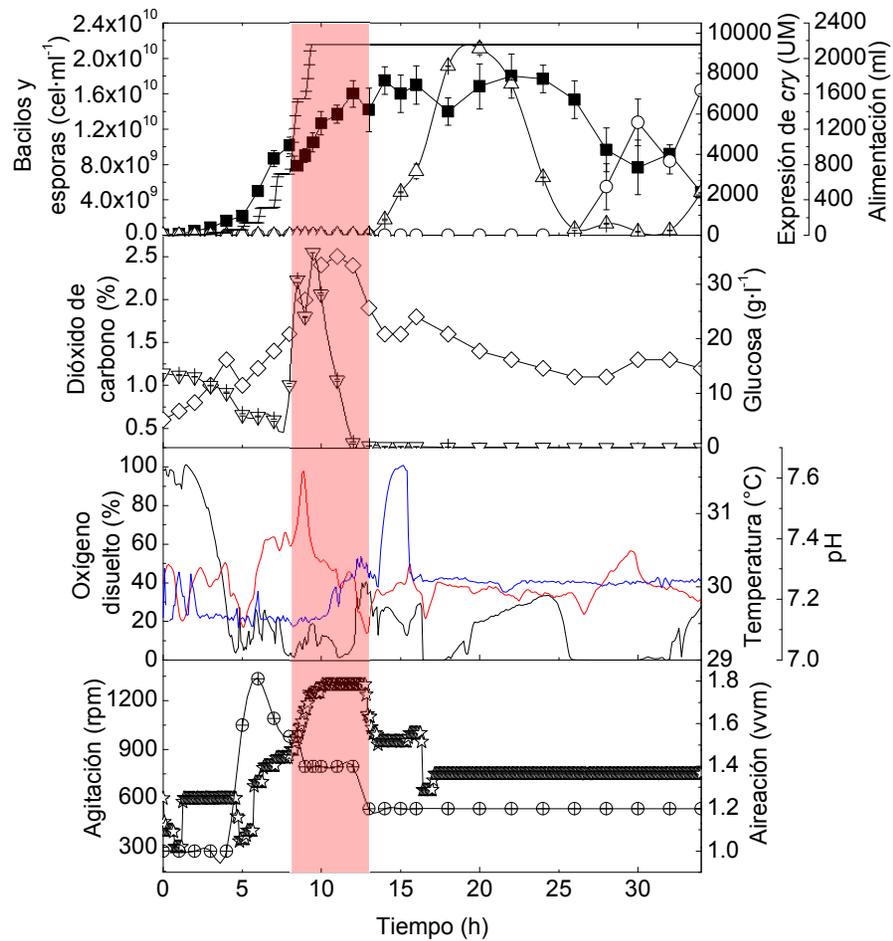
endotoxina (Arcas et al. 1987) y junto con la glucosa disponible en una temprana esporulación, puede causar la desincronización de la esporulación y aumentar el tiempo de fermentaciones y de esporas (Farrera et al. 1998).

Respecto a los perfiles dieléctricos, se observan las tendencias similares para los perfiles dieléctricos de *Impedancia*, *Conductancia*, *Angulo de fase*, *Voltaje*, *Capacitancia*, *Factor de disipación* y *Corriente* relacionados previamente a consumo y crecimiento al igual y de manera puntual cambios evidentes en la pendiente de estos perfiles dieléctricos referidos al proceso de diferenciación celular. Para el caso de *Reactancia* y *Resistencia* se observan oscilaciones que sugerimos relacionar con la cantidad de reacciones presentes en esta etapa debidas a la actividad metabólica y molecular relacionadas con el proceso de diferenciación celular, adicional al efecto que causa la alimentación realizada durante el crecimiento exponencial en estos cultivos, provocando una sobreactividad para el aprovechamiento de los recursos por parte de *B. thuringiensis* para su crecimiento, desincronización y desorden metabólico, corroborado con lo citado en antecedentes referente a un CLA, donde se mencionó que el metabolismo de la bacteria es redirigido, la  $\mu$  disminuye durante la fase de alimentación, indicando que la fase de transición se establece durante la alimentación lo cual afecta la esporulación y expresión del gen *cry* debidas a una producción diferente a la que se presente en CL de los reguladores de transición y otras moléculas características de esta fase de crecimiento de *B. thuringiensis*.



**Figura 17.** Fermentación en CLA de *B. thuringiensis* pHT1kAc en ML.

Bacilos (■), esporas (○), expresión de *cry* (△), alimentación (X), CO<sub>2</sub> (◇), glucosa (▽), OD (—), temperatura (—), pH (—), agitación (☆) y (aireación (⊕), Z (—), X (—), R (—), G (—), Deg (—), V (—), Cs (—), D (—) y I (—).



**Figura 18.** Fermentación en CLA de *B. thuringiensis* pHT1kAc en ML. Bacilos (■), esporas (○), expresión de cry (△), alimentación (-), CO<sub>2</sub> (◇), glucosa (▽), OD (-), temperatura (-), pH (-), agitación (☆) y (aireación (⊕), Z (-), X (-), R (-), G (-), Deg (-), V (-), Cs (-), D (-) y I (-).

**Tabla 14.** Parámetros cinéticos de cultivo por lote alimentado de *B. thuringiensis* pHT1kAc en ML monitoreado a 1.225 MHz.

	CLA <sub>1</sub>	CLA <sub>2</sub>
$\mu^a$ (h <sup>-1</sup> )	0.78 (R <sup>2</sup> =0.98)	0.66 (R <sup>2</sup> =0.98)
Cuentas de bacilos (cel ml <sup>-1</sup> )		
Al tiempo 0 h	8.00 x 10 <sup>7</sup> (±1.08 x 10 <sup>7</sup> )	8.67 x 10 <sup>7</sup> (±6.45 x 10 <sup>6</sup> )
Al cambio en $\mu$	7.17 x 10 <sup>9</sup> (±9.13 x 10 <sup>8</sup> )	8.67 x 10 <sup>9</sup> (±9.13 x 10 <sup>8</sup> )
Al tiempo del establecimiento de la fase de esporulación	1.05 x 10 <sup>10</sup> (±1.32 x 10 <sup>9</sup> )	1.37 x 10 <sup>10</sup> (±1.03 x 10 <sup>9</sup> )
Tiempo de establecimiento de fase de transición (h)	6	7
Tiempo de establecimiento de fase de esporulación (h)	12	11
Glucosa al cambio de $\mu$ (g.l <sup>-1</sup> )	14.8	5.04
Máxima actividad de $\beta$ -galactosidasa (MU)	4531 (±100)	9233 (±295)
Eficiencia de esporulación <sup>b</sup> (%)	0	100

<sup>a</sup> Valores determinados al tiempo de establecimiento de fase de transición

<sup>b</sup> Valores calculados con cuentas de bacilos determinadas en el establecimiento de la fase de esporulación y conteo final de esporas

<sup>c</sup> Valores determinados al cambio de durante la fase de crecimiento exponencial

En las Figuras 12, 13, 17 y 18 y Tablas 10, 12 y 14 se observa la comparación de perfiles y datos obtenidos en cultivo por lote y lote alimentado de *B. thuringiensis* en ML. En principio se nota una diferencia en cantidad de bacilos obtenidos a consecuencia de la cantidad de nutrientes en el cultivo por lote alimentado a diferencia del cultivo por lote. La alimentación exponencial se realizó desde la hora 1

y 2 hasta las 9-h, lo cual repercutió en la asincronía del cultivo reflejado en las cuentas de bacilos, expresión de *cry* y señales de *X* y *R* principalmente, con lo que se observó prolongamiento tanto en la fase de transición como en la fase de esporulación.

Englobando los resultados mostrados en este trabajo, se comprueba que la *Impedancia* es la resistencia de la corriente eléctrica a través de un dieléctrico (células, medio de cultivo) (Valero et al. 2010, Pänke et al. 2011, Whulanza et al. 2011, Gou et al. 2011, Justice et al. 2011), observándose que los perfiles de *Impedancia* tienden a decrecer en todos los experimentos. Inversamente proporcional a *Impedancia*, la *Conductancia* indica la facilidad que un material tiene al paso de la corriente eléctrica (Ramírez et al. 2009), tal efecto es evidente durante la fase de crecimiento exponencial y fase de transición, pero en la fase de esporulación casi queda constante denotando que los esfuerzos metabólicos y genéticos conducen a completar el proceso de esporulación. En el caso del *Angulo de fase*, es un parámetro utilizado en la clínica como indicador de la salud celular, integridad de la membrana celular y función celular (Abad et al. 2011, Tanabe et al. 2012, Norman et al. 2012); por otro lado, Azevedo et al. (2013) relaciona la *Reactancia* con la integridad funcional de la membrana celular; y de acuerdo a ellos, nosotros referimos con los perfiles obtenidos en este trabajo, que los incrementos para *Angulo de fase* son debido al crecimiento y proliferación de las células al generarse nuevas células cuyas membranas son saludables e integra. En ambos parámetros dieléctricos, los perfiles obtenidos en función del tiempo muestran incremento en su señal durante el crecimiento, corroborando al avance de la

fermentación existe una relación con el crecimiento celular e incremento de actividad metabólica de *B. thuringiensis*.

Para el caso de  $X$  y  $R$  medidas a específicamente a 1.225 MHz, validamos que se pueden obtener señales respuesta que indican cambios metabólicos, fisiológicos, moleculares debidos a eventos celulares como el de diferenciación celular en un cultivo de *B. thuringiensis* de manera más certera resaltando que la fase de crecimiento exponencial y fase de transición que no fueron elucidados con técnicas convencionales pero si aplicando esta técnica. Por definición la *Resistencia*, es el impedimento del flujo de una corriente eléctrica a través de un componente o circuito, un medio o una sustancia (Cammack et al. 2006), y la *Reactancia* es el componente no resistivo de *Impedancia* en un circuito de corriente alterna (Cammack et al. 2006); con lo que se sugiere que las células pueden oponer mayor o menor resistencia a la corriente, dependiendo de las reacciones bioquímicas y respuestas genéticas a resultado de algunos eventos celulares. Las reacciones bioquímicas dentro de las células pueden provocar una alta actividad iónica a través de la membrana celular llevando a cambios (reducción) en perfiles de *Resistencia* y *Reactancia* debido a un mejor transporte de electrones (Luong et al. 2001, November y Van Impe 2002, Bonmassar et al. 2010, Pänke et al. 2011) como resultado del crecimiento vegetativo de *B. thuringiensis*, donde hay un consumo simultáneo de glucosa y aminoácidos (Farrera et al. 1998), una actividad del ciclo de Krebs casi nula y por consiguiente una producción de piruvato, acetato y lactato en las células (Anderson 1990, Rowe 1990). Para lo cual, en este trabajo en el caso de cultivo por lote alimentado, la oscilación observada en los perfiles de *Resistencia* y *Reactancia* los referimos al desorden de crecimiento que se generan en el cultivo cuando se realiza una

alimentación exponencial durante su fase de crecimiento exponencial y fase de transición que se sugiere es debida a la gran actividad metabólica, fisiológica y molecular durante estas fases de crecimiento descritas anteriormente para *B. thuringiensis*. Los cambios durante la fase de crecimiento exponencial en perfiles de *Resistencia* y *Reactancia* podrían sugerir que son a causa de eventos celulares que no pueden ser notados mediante análisis con técnicas convencionales, indicando transporte de electrones más fácil tanto en el medio de cultivo como dentro de las células. Por lo que se sugiere que los cambios de pendiente y magnitud de los parámetros dieléctricos mostrados establecieron un tipo de fase de transición previo al que se establece por técnicas convencionales, adicionalmente el uso de una frecuencia utilizada a un valor fijo, fue importante para obtener una mejor relación entre propiedades dieléctricas y fases de crecimiento, cuyos valores adquiridos para cada propiedad dieléctrica fueron dependiente de la frecuencia utilizada; lo cual es importante pues a la fecha no hay reportes que se refieran a *Resistencia* y *Reactancia* como propiedades individuales para seguir en tiempo real e *in-situ* el comportamiento celular en cultivos celulares.

Con este estudio se demostró que la espectroscopía de impedancia puede ser utilizada para monitorear en línea y libre de marcadores, eventos celulares del ciclo celular incluyendo el proceso de diferenciación celular en *B. thuringiensis*, así como el inicio y término de la fase de transición. De esta manera se sugiere que las bases de utilización planteadas en este trabajo servirán para ayudar a identificar el momento cuando el proceso de diferenciación celular comienza, evento crucial en la obtención de rápidos, sensibles y mejores respuestas en futuros estudios a nivel celular de diferentes organismos y cultivos celulares comprobando la efectividad,

inocuidad, sensibilidad y rapidez de esta técnica de medición permitiéndonos un entendimiento en tiempo real de las características de crecimiento de los microorganismos como paso esencial en bioprocesos con repercusión en la fisiología celular y calidad de productos (Schuler y Marison 2012).

## VIII. CONCLUSIONES

- ✓ Se definieron las condiciones para obtener inóculos idóneos para utilizarse en las fermentaciones y obtener cultivos sincrónicos bajos las siguientes condiciones: medio de Farrera a 200 rpm y 30°C con un tiempo de incubación de 13 h para *B. thuringiensis* pHTcry1kAc y de 14 h para *B. thuringiensis* pHTcry1A2 y *B. thuringiensis* HD73.
- ✓ Se estandarizaron las condiciones de medición con espectroscopía de impedancia con una corriente de 20 mA, 5 V y evaluando los parámetros dieléctricos de:  $Z$ ,  $C$ ,  $Deg$ ,  $D$ ,  $V$  y  $I$  para calcular  $X$ ,  $R$  y  $G$  en diferentes rangos de frecuencia entre 42 Hz – 5 MHz mediante un escaneo y poder seleccionar las frecuencias adecuadas para el sistema celular a monitorear.
- ✓ Se caracterizaron los parámetros dieléctricos en diferentes rangos de frecuencia de los medios de cultivo utilizados en las fermentaciones, donde algunos de sus componentes por separado generaron mayores valores en las propiedades dieléctricas que las obtenidas en el medio de cultivo formulado, con lo que se concluyó que el medio de cultivo no representa valores tales que puedan interferir con señales correspondientes al sistema celular.
- ✓ La magnitud de los parámetros dieléctricos del sobrenadante al final de la fermentación y las esporas no representaron gran diferencia ni influencia con la magnitud correspondiente al medio de cultivo antes de ser inoculado y su fermentación correspondientemente.
- ✓ Mediante las correlaciones de los perfiles dieléctricos con valores cinéticos de fermentación de *B. thuringiensis* durante las etapas de fase de crecimiento exponencial, fase de transición y fase de esporulación de la bacteria en rangos específicos de frecuencia, se pudo hacer una adecuada selección de

frecuencias que nos proporcionarían mayor información de nuestro sistema modelo.

- ✓ Los parámetros dieléctricos de  $Z$  y  $V$  se relacionaron con consumo de sustratos; con crecimiento:  $C$ ,  $G$ ,  $R$ ,  $X$  y  $Deg$ ; y con fase de transición:  $Z$ ,  $V$ ,  $C$ ,  $G$ ,  $R$ ,  $X$  y  $Deg$ .
- ✓ Se determinó que la mejor frecuencia evaluada para monitorear en tiempo real procesos celulares específicamente el de diferenciación celular de *B. thuringiensis* mediante espectroscopía de impedancia, fue aplicando una frecuencia de 1.225 MHz.
- ✓ Las propiedades dieléctricas de *Resistencia* y *Reactancia* mostraron mayor sensibilidad al monitorear en línea las fases de crecimiento y específicamente el proceso de diferenciación celular de *B. thuringiensis* por lo que se sugirió referirlas a la actividad metabólica y molecular implicada en este proceso.
- ✓ independientemente de la técnica y medio de cultivo empleado en la fermentación se sugiere que esta técnica es sensible a los cambios metabólicos que se presentan en procesos celulares característicos de las diferentes fases de crecimiento de *B. thuringiensis*.

## IX. PERSPECTIVAS

Con los inóculos establecidos para estas cepas se pueden obtener cultivos sincrónicos para realizar estudios aplicando esta técnica con las dos cepas descartadas y para otros fines de investigación.

Con este estudio se evaluó al medio de cultivo y sus componentes por separado, con lo que se podrá descartar en futuro el monitoreo del medio de cultivo cuando el objetivo sea determinar lo que sucede en la fermentación debido a la presencia del microorganismo cultivado.

Con las base establecidas en este trabajo, desde la evaluación de los medios de cultivo y sus componentes, diferentes condiciones de operación y aplicando diferentes técnicas de cultivo, se podrá estandarizar la utilización de esta técnica de manera eficiente y rápida a cualquier sistema celular mediante solo un cultivo donde se realicen escaneos para identificar la frecuencia adecuada que nos proporcione mayor información.

Se podrán hacer mediciones en línea a una frecuencia fija de los parámetros dieléctricos más relevantes:  $Z$ ,  $Deg$ ,  $C$ ,  $I$ ,  $V$ ,  $X$ ,  $R$  y  $G$ ; aunque sugeriría evaluar mediante correlaciones otros parámetros dieléctricos, con parámetros característicos del cultivo otros evaluaciones convencionales de

La aplicación de esta herramienta será útil para hacer mediciones en tiempo real del proceso y tomar decisiones oportunas para obtener un producto de calidad y/o con buena eficiencia.

La utilización de esta técnica permitirá establecer estudios más finos sobre los cultivos, como: quorum sensing para explicar los cambios respuesta sobre los parámetros dieléctricos que se presentan antes que los determinados convencionalmente para fase de transición y el proceso de diferenciaciones celular.

## X. BIBLIOGRAFIA

Abad S, Sotomayor G, Vega A, Pérez de José A, Verdalles U, Jofré R, López-Gómez JM (2011) El ángulo de fase de la impedancia eléctrica es un predictor de supervivencia a largo plazo en pacientes en diálisis. *Nefrología*. 31(6):670-6. doi:10.3265/Nefrologia.pre2011.Sep.10999

Agaisse H, Lereclus D (1994) Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the *cryIIIA* toxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol* 13:97–107

Agaisse H, Lereclus D (1995) How Does *Bacillus thuringiensis* Produce So Much Insecticidal Crystal Protein?. *J Bacteriol* 177(21): 6027–6032

Alzate G AV, Noreña O PT, Segura G B, Aristizábal B W, Rosales-Rivera A (2009) Estudio de la Manzana Mediante la Técnica de Espectroscopía de Impedancia Eléctrica. *Revista Colombiana de Física*, vol. 41, No. 1

Anderson RKI, Kunthala Jayaramana, Voisardb D, Marison IW, von Stockarb U (2002) Heat flux as an on-line indicator of metabolic activity in pilot scale bioreactor during the production of *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae*-based biopesticides. *Thermochimica Acta* 386 (2002) 127–138

Anderson TB (1990). Effects of carbon:nitrogen ratio and oxygen on the growth kinetics of *Bacillus thuringiensis* and yield of bioinsecticidal crystal protein. MSc. thesis, University of Western Ontario London, Ontario

Arcas J, Yantorno O, Ertola R (1987) Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* cultures. *Biotechnology Letters*, Volume 9, Issue 2, pp 105-110

Aronson JN, Borris DP, Doerner JF, Akers E (1975) Gamma-aminobutyric acid pathway and modified tricarboxylic acid cycle activity during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*. *Applied Microbiology*, 30: 489-492

Aronson A (2002) Sporulation and  $\delta$ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cell Mol Life Sci*. 59:417-425

Asami K, Gheorghiu E, Yonezawa T (1999) Real-time monitoring of yeast cell division by dielectric spectroscopy. *Biophys J*. 76(6):3345-8

Azevedo ZMA, DCB Cox, Alves FA, MatosV, Marques MV, Gaspar-Elsas MI, Santinoni E, dos Anjos LA, Gonçalves E (2013) Bioelectrical impedance parameters in critically ill children: Importance of reactance and resistance. *Clin Nutr*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2013.01.011>

Bagnaninchi PO, Drummond N (2011) Real-time label-free monitoring of adipose-derived stem cell differentiation with electric cell-substrate impedance sensing. *PNAS* 108: 6462–6467

Banse AV, Chastanet A, Ranh-Lee L, Hobbs EC, Losick R (2008) Parallel pathways of repression and antirepression governing the transition to stationary phase in *Bacillus subtilis*. *PNAS* 105: 15547-15552

Baptista M, Rodrigues P, Depardieu F, Courvalin P, Arthur M (1999) Single-cell analysis of glycopeptide resistance gene expression in teicoplanin-resistant mutants of a VanB-type *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol* 32(1):17-28

Bassler BL, Losick R (2006) Bacterially Speaking. Cell 125. DOI 10.1016/j.cell.2006.04.001

Barák I, Wilkinson AJ (2005) Where asymmetry in gene expression originate. Mol Microbiol. 57(3):611-20

Bejerano-Sagie M, Oppenheimer-Shaanan Y, Berlatzky I, Rouvinski A, Meyerovich M, Ben-Yehuda S (2006) A checkpoint protein that scans the chromosome for damage at the start of sporulation in *Bacillus subtilis*. Cell 125(4):679-90

Boniolo FS, Rodrigues RC, Prata AM, López ML, Jacinto T, da Silveira MM, Berbert-Molina MA (2012) Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentations: bringing new insights on their impact on sporulation and  $\delta$ -endotoxin production. Appl Microbiol Biotechnol. 3:625-36. doi: 10.1007/s00253-011-3746-9

Bonmassar G, Iwaki S, Goldmakher G, Angelone LM, Belliveau JW, Lev MH (2010) On the Measurement of Electrical Impedance Spectroscopy (EIS) of the Human Head. Int J Bioelectromagn. 1; 12(1): 32–46

Bravo A, Salamitou S, Agaisse H, Lereclus D (1996) Analysis of *cry1Aa* expressions in sigE and sigK mutants of *Bacillus thuringiensis*. Molecular Genes and Genetics, 250: 734-741

Bravo A, Likitvivanavong S, Gill S, Soberon M (2011) *Bacillus thuringiensis*: A story of successful bioinsecticide. Insect Biochem Mol Biol. 41(7):423-31. doi: 10.1016/j.ibmb.2011.02.006

Bridson EY, Gould GW (2000) Quantal microbiology. Lett Appl Microbiol, 30: 95-98

Brosseau R, Masson L (1988) Biochemistry of sporulation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal toxins: gene structure and mode action. *Biotechnology Advance*, 6: 697-724

Brú A, Albertos S, Subiza JL, García-Asenjo JL, Brú I. (2003) The universal dynamics of tumor growth. *Biophys J*, 85: 2948-2961

Bulla LA Jr, Bechtel DB, Kramer KJ, Shethna YI, Aronson AI, Fitz-James PC (1980) Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *Crit Rev Microbiol*. 8(2):147-204

Cady P, Dufour SW, Shaw J, Kraeger SJ (1978) Electrical impedance measurements: rapid method for detecting and monitoring microorganisms. *J Clin Microbiol*. 7(3):265-72

Cammack R, Atwood T, Campbell P, Parish H, Smith A, Vella F, Stirling J (2006) *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology* (2 ed.) ISBN:0198506732. Oxford University Press

Carvell JP (2003) Monitoring “Live” Cell Concentrations in Real Time. *BioProcess International*. Vendor voice

Cheung KC, Renaud P (2006) BioMEMS for medicine: On-chip cell characterization and implantable microelectrodes. *Solid-State Electronics* 50:551–557

Cho S, Gorjup E, Thielecke H. (2009) Chip-based time-continuous monitoring of toxic effects on stem cell differentiation. *Ann Anat*. 2009 Jan;191(1):145-52. doi: 10.1016/j.aanat.2008.08.005

Choi S, Murphy WL (2013) A screening approach reveals the influence of mineral coating morphology on human mesenchymal stem cell differentiation. *Biotechnol J*. 8(4):496-501. doi: 10.1002/biot.201200204

Coleman B, De Silva MG, Shepherd RK (2007) The potential of Stem Cells for Auditory Neuron Generation and Replacement. *Stem Cells* 25:2685–2694

Chumsakul O, Takahashi H, Oshima T, Hishimoto T, Kanaya S, Ogasawara N, Ishikawa S (2011) Genome-wide binding profiles of the *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB and its homolog Abh reveals their interactive role in transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res* 39: 414-428

Dalmay C, Cheray M, Pothier A, Lalloué F, Jauberteau MO, Blondy P (2010) Ultra sensitive biosensor based on impedance spectroscopy at microwave frequencies for cell scale analysis. *Sensors and Actuators A* 162:189–197

Davey CL, Kell DB (1998) The influence of electrode polarisation on dielectric spectra, with special reference to capacitive biomass measurements I. Quantifying the effects on electrode polarisation of factors likely to occur during fermentations. *Bioelectrochem Bioenerg* 46:91–103

Davey HM, Kell DB (1996) Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single cell analysis. *Microbiol Rev*, 60: 641-696

Davey ME, O'Toole GA (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64: 847-867

Deák T, Beuchat LR (1993) Comparison of conductimetric and traditional plating techniques for detecting yeast in fruit juices. *J Appl Bacteriol* 75: 546-550

Desai KD, Sankhe MS (2011) Non-Invasive Detection and Treatment Methods on Tumor Growth in Body System by Resonance Frequency Method. *IJCA Proceedings on International Conference and workshop on Emerging Trends in Technology (ICWET)* (5):15-21

Dézenclos T, Ascon-Cabrera M, Ascon D, Lebeault JM, Pauss A (1994) Optimisation of the indirect impedancemetry technique; a handy technique for microbial growth measurement. *Appl Microbiol Biotechnol* 42:232-238

Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, Swain PS (2002) Stochastic gene expression in a single cell. *Science*, 297: 1183-1186

Errington J (2003) Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 1:117-126

Farrera RR, Pérez-Guevara F, de la Torre M (1998) Carbon:Nitrogen ratio with initial concentration of total solids on insecticidal cristal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:758–765

Felice CJ, Madrid RE, Olivera JM, Rotger VI, Valentinuzzi ME (1999) Impedance microbiology: quantification of bacterial content in milk by means of capacitance growth curves. *J Microbiol Methods* 35(1):37-42

Frankenhuyzen K (2009) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J Invertebr Pathol.* 101(1):1-16. doi: 10.1016/j.jip.2009.02.009

Fujita M, Sadaie Y (1998) Feedback loops involving Spo0A and AbrB in vitro transcription of the genes involved in the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. J Biochem 124: 98-104

Fujita M, Gonzalez-Pastor JE, Losick R (2005) High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 187: 1357–1368

Fürbaß R, Gocht M, Zuber P, Marahiel A (1991) Interaction of AbrB, a transcriptional regulator from *Bacillus subtilis* with the promoters of the transition state-activated genes *tycA* and *spoVG*. Mol Gen Genet 225: 347-354

Gheorghiu E (1996) Measuring living cells using dielectric spectroscopy. Bioelectrochem Bioenergetics 40(2): 133-139

Gibson DM, Coombes PC, Pimbley DW (1992) Automated conductance method for the detection of *Salmonella* in foods: collaborative study. J AOAC Int 75(2):293-302

Glare TR, O'Callaghan M (2000) *Bacillus thuringiensis*: Biology, ecology and safety. Chichester: Wiley. 350 p

Grimnes S, Martinsen OG (2000) Bioimpedance and Bioelectricity Basics. Academic PRESS. ISBN 0-12-303260-1

Gou HL, Zhang XB, Bao N, Xu JJ, Xia XH, Chen HY (2011) Label-free electrical discrimination of cells at normal, apoptotic and necrotic status with a microfluidic device. J Chromatogr A. 9; 1218(33):5725-9. doi: 10.1016/j.chroma.2011.06.102

Hahn J, Roggiani M, Dubnau D (1995) The major role of Spo0A in genetic competence is to downregulate *abrB*, an essential competence gene. *Journal of Bacteriology*, 177: 3601-3605

Hanson RS, Cox DP (1967) Effect of different nutritional conditions on the synthesis of tricarboxylic acid cycle enzymes. *J Bacteriol*; 93(6):1777-87

Hentze H, Graichen R, Colman A. (2006) Cell therapy and the safety of embryonic stem cell-derived grafts. *Trends Biotechnol*, 25: 24-32

Hilbert DW, Piggot PJ (2004) Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:234-262

Hildebrandt C, Büth H, Cho S, Impidjati, Thielecke H (2010) Detection of the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in 2D and 3D cultures by electrochemical impedance spectroscopy. *J Biotechnol.* 1;148(1):83-90. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.01.007

Hoffman RA, Britt WB (1979). Flow-System Measurement of Cell Impedance Properties. *J Histochem Cytochem.* 27(1): 234-240

Hunt RW, Zavalin A, Bhatnagar A, Chinnasamy S, Das KC (2009) Review Electromagnetic Biostimulation of Living Cultures for Biotechnology, Biofuel and Bioenergy Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 10:4515-4558; doi:10.3390/ijms10104515

Iber D, Clarkson J, Yudkin MD, Campbell ID (2006) The mechanism of cell differentiation in *Bacillus subtilis*. *Nature*. doi:10.1038/nature04666

Ireton K, Rudner DZ, Siranosian KJ, Grossman AD (1993) Integration of multiple developmental signals in *Bacillus subtilis* through the Spo0A transcription factor. *Genes Dev.* 7(2):283-94

Jenal U, Stephens C (1996) Bacterial differentiation: Sizing up sporulation. *Curr Biol.* 6(2): 111-114

Justice C, Brix A, Freimark D, Kraume M, Pfromm P, Eichenmueller B, Czermak P (2011) Process Control in Cell Culture Technology Using Dielectric Spectroscopy. *Biotechnol Adv*, 29(4), 391-401

Katsuragi T, Tani Y (2000) Screening for microorganisms with specific characteristics by flow cytometry and single-cell sorting. *J Biosci Bioeng.* 89(3):217-22

Kiviharju K, Salonen K, Moilanen U, Eerikäinen T (2008) Biomass measurement online: the performance of in situ measurements and software sensors. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35: 657-665

Kurz CM, Büth H, Sossalla A, Vermeersch V, Toncheva V, Dubruel P, Schacht E, Thielecke H (2011) Chip-based impedance measurement on single cells for monitoring sub-toxic effects on cell membranes. *Biosens Bioelectron.* 15;26(8):3405-12. doi: 10.1016/j.bios.2011.01.012

Lazazzera BA (2000) Quorum sensing and starvation: signals for entry into the stationary phase. *Curr. Opin. Microbiol* 3:177–182

López-y-López VE (2004) Redirección del metabolismo de *Bacillus thuringiensis* en cultivo por lote alimentado. Tesis doctorado, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-Zacatenco D.F.

López-y-López VE, De la Torre M (2005) Redirection of metabolism during nutrient feeding in fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 67: 254-260

Losick R, Youngman P, Piggot PJ (1986) Genetics of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet*. 20:625-69

Lozano Goné AM, Dinorín Téllez Girón J, Jiménez Montejó FE, Hidalgo-Lara ME, López Y López VE (2014) Behavior of transition state regulator AbrB in batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Curr Microbiol*. doi 10.1007/s00284-014-0650-4

Luong JHT, Habibi-Rezaei M, Meghrous J, Xiao C, Male KB, Kamen A (2001) Monitoring Motility, Spreading, and Mortality of Adherent Insect Cells Using an Impedance Sensor. *Anal. Chem*. 73:1844-1848

Mangwani N, Dash HR, Chauhan A, Das S (2012) Bacterial quorum sensing: functional features and potential applications in biotechnology. *J Mol Microbiol Biotechnol* 22(4):215-27. doi: 10.1159/000341847

Markx GH, Kell DB (1990) Dielectric spectroscopy as a tool for the measurement of the formation of biofilms and of their removal by electrolytic cleaning pulses and biocides. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* 2:211-227. doi: 10.1080/08927019009378146

Matanguihan RM, Konstantinov KB, Yoshida T (1994) Dielectric measurement to monitor the growth and the physiological states of biological cells. *Bioprocess Eng* 11(6):213-222

Matsunaga T, Karube I, Suzuki S (1979) Electrode System for the Determination of Microbial Populations. *Appl Environ Microbiol.* 37(1): 117–121

Michaelis S, Wegener J, Robelek R. (2013) Label-free monitoring of cell-based assays: combining impedance analysis with SPR for multiparametric cell profiling. *Biosens Bioelectron.* 15;49:63-70. doi: 10.1016/j.bios.2013.04.042

Mirouze N, Prepiak P, Dubnau D (2011) Fluctuations in *spo0A* transcription control rare developmental transitions in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet* 7(4): e1002048. doi:10.1371/journal.pgen.1002048

Morgan H, Sun T, Holmes D, Gawad S, Green NG. (2007) Single cell dielectric spectroscopy. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 40 61 doi:10.1088/0022-3727/40/1/S10

Norman K, Stobäus N, Pirlich M, Bosy-Westphal A (2012) Bioelectrical phase angle and impedance vector analysis - Clinical relevance and applicability of impedance parameters. *Clin Nutr.* Doi: 10.1016/j.clnu.2012.05.008

November EJ, Van Impe JF (2002) The tuning of a model-based estimator for the specific growth rate of *Candida utilis*. *Bioprocess Biosyst Eng.* 25:1-12

O'Reilly M, Devine KM (1997) Expression of *AbrB*, a transition state regulator from *Bacillus subtilis*, is growth phase dependent in a manner resembling that of *Fis*, the nucleoid binding protein from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179: 522-529

Olguín-Sánchez RA, Rojas-Rendón JA, Díaz-Campillo MJ, Salazar Y (2009) Monitorización del crecimiento de microorganismos en sistemas cerrados utilizando espectroscopia de impedancia eléctrica. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica.* XXX(2):98 - 108

Owens JD, Konírová L, Thomas DS (1992) Causes of conductance change in yeast cultures. *J Appl Bacteriol* 72(1):32-8

Öz S, Maercker C, Breiling A (2013) Embryonic carcinoma cells show specific dielectric resistance profiles during induced differentiation. *PLoS One* 8(3):e59895. doi: 10.1371/journal.pone.0059895

Pänke O, Weigel W, Schmidt S, Steude A, Robitzki AA (2011) A cell-based impedance assay for monitoring transient receptor potential (TRP) ion channel activity. *Biosens Bioelectron.* 15;26(5):2376-82. doi: 10.1016/j.bios.2010.10.015

Park HE, Kim D, Koh HS, Cho S, Sung JS, Kim JY (2011) Real-Time Monitoring of Neural Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells by Electric Cell-Substrate Impedance Sensing. *J Biomed Biotechnol*, doi:10.1155/2011/485173

Phillips ZEV, Strauch MA (2002) *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cell Mol Life Sci*, 59: 392-402

Powell CD, Van Zandycke SM, Quain DE, Smart KA (2000) Replicative ageing and senescence in *Saccharomyces cerevisiae* and the impact on brewing fermentations. *Microbiology*, 146: 1023-1034

Ramírez N, Regueiro A, Arias O, Contreras R (2009) Espectroscopía de impedancia electroquímica, herramienta eficaz para el diagnóstico rápido microbiológico. *Biotechnol Apl* 2009;26:65-71

Razo E, Pérez F, de la Torre M. (1997) Scale-up of *Bacillus thuringiensis* fermentation based on oxygen transfer. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83: 561-564

Ribeiro T, Romestant G, Depoortere J, Paus A (2003) Development, validation, and applications of a new laboratory-scale indirect impedancemeter for rapid microbial control. *Appl Microbiol Biotechnol.* 63(1):35-41

Rocha-Estrada J, Aceves-Diez AE, Guarneros G, de la Torre M. (2010) The RNPP family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 87(3):913-23. doi: 10.1007/s00253-010-2651-y

Rodríguez Arévalo AC, CLAI, Valencia Flores JI (2003) Diseño y construcción de los instrumentos de medición para un biorreactor prototipo. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, XXIV(1): 55-70

Rowe GE. 1990. Central metabolism of *Bacillus thuringiensis* during growth and sporulation. PhD thesis in The Univeristy of Western Ontario London Ontario

Rowe GE, Margaritis A (2004) Bioprocess design and economic analysis for the commercial production of environmentally friendly bioinsecticides from *Bacillus thuringiensis* HD-1 *kurstaki*. *Biotechnol Bioeng.* 20;86(4):377-88

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning a laboratory manual* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory. 16.66-16.67pp

Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P (2011) *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol J.* 9(3):283-300. doi: 10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x

Sarrafzadeh MH, Belloy L, Esteban G, Navarro JM, Ghommidh C (2005) Dielectric monitoring of growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol Lett.* 27(7):511-7

Saujet L, Monot M, Dupuy B, Soutourina O (2011) The Key Sigma Factor of Transition Phase, SigH, Controls Sporulation, Metabolism, and Virulence Factor Expression in *Clostridium difficile*. J. Bacteriol 193(13):3186. DOI: 10.1128/JB.00272-11

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. Microbiol Mol Biol Rev. 62(3): 775–806

Schuler MM, Marison IW (2012) Real-time monitoring and control of microbial bioprocesses with focus on the specific growth rate: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol. 94:1469–1482. DOI 10.1007/s00253-012-4095-z

Schwan HP, Takashima S (1991) Dielectric behavior of biological cells and membranes. Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ., 69(4):419:475

Schwarzenberger T, Wolf P, Brischwein M, Kleinhans R, Demmel F, Lechner A, Becker B, Wolf B (2011) Impedance sensor technology for cell-based assays in the framework of a high-content screening system. Physiol Meas. 32(7):977-93. doi: 10.1088/0967-3334/32/7/S18

Sierra-Martínez P, Ibarra JE, De la Torre M, Olmedo G (2004) Endospore degradation in an oligosporogenic, Crystal of *Bacillus thuringiensis*. Curr Microbiol, 48:153-158

Silley P, Forsythe S (1996) Impedance microbiology: a rapid change for microbiologists. J. Appl. Bacteriol 80, 233–243

Simões IN, Boura JS, dos Santos F, Andrade PZ, Cardoso CM, Gimble JM, da Silva CL, Cabral JM (2013) Human mesenchymal stem cells from the umbilical cord matrix: successful isolation and *ex vivo* expansion using serum-/xeno-free culture media. *Biotechnol J.* 8(4):448-58. doi: 10.1002/biot.201200340

Slamti L, Lereclus D (2002) A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO J.* 21(17):4550-9

Soberón M, Fernández LE, Pérez C, Gill SS, Bravo A (2007) Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicon.* 49(5):597-600

Sonenshein AL (2000) Control sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol* 3: 561-566

Spalding KL, Bhardwaj RD, Buchholz BA, Druid H, Frisé J (2005) Retrospective birth dating of cells in humans. *Cell* 15;122(1):133-43

Steels H, James SA, Roberts IN, Stratford M (2000) Sorbic acid resistance: the inoculum effect. *Yeast*, 16: 1173-1183

Stephanopoulos G (ed.), Rehm HJ, Reed G, Puhler A, Stadler P (1993) *Bioprocessing*, Vol. 3 of *Biotechnology*, (series eds.), VCH, Weinheim

Stewart GN (1897) Researches on the circulation time and on the influences which affect it. *J Physiol.* 22(3): 159–183

Strauch MA, Perego M, Burbulys D, Hoch JA (1989) The transition state transcription regulator *AbrB* of *Bacillus subtilis* is autoregulated during vegetative growth. *Mol Microbiol* 3: 1203-1209

- Strauch MA, Hoch JA (1993) Transition-state regulators: sentinels of *Bacillus subtilis* post-exponential gene expression. *Mol Microbiol* 7: 337-342
- Strübing C, Ahnert-Hilger G, Shan J, Wiedenmann B, Hescheler J, Wobus AM (1995) Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage *in vitro* gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mech Dev.* (2):275-87
- Suller MTE, Lloyd D (1999) Fluorescence monitoring of antibiotic induced bacterial damage using flow cytometry. *Cytometry*, 47: 8-16
- Swaminathan B, Feng P (1994) Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:401–426
- Tanabe RF, de Azevedo ZM, Fonseca VM, Peixoto MV, dos Anjos LA, Gaspar-Elsas MI, Moore DC, Ramos EG (2012) Distribution of bioelectrical impedance vector values in multi-ethnic infants and pre-school children. *Clin Nutr.* 31(1):144-8. doi: 10.1016/j.clnu.2011.08.006
- Thomson H (2007) Bioprocessing of embryonic stem cells for drug discovery. *Trends Biotechnol.* 25(5). doi:10.1016/j.tibtech.2007.03.003
- Tibayrenc P, Preziosi-Belloy L, Ghommidh C (2011) On-line monitoring of dielectrical properties of yeast cells during a stress-model alcoholic fermentation. *Process Biochem.* 46 (2011) 193–201. doi: 10.1016/j.procbio.2010.08.007
- Timms S, Colquhoun KO, Fricker CR (1996) Detection of *Escherichia coli* in potable water using indirect impedance technology. *J Microbiol Methods* 26: 125-132

Turner PJ (2000) MYSTIC Meropenem yearly susceptibility test information collection a global overview. *Antimicrob chemother*, 46:9-23

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*. 15;111(1):1-12. doi: 10.1016/j.jip.2012.05.001

Valero T, Moschopoulou G, Kintzios S, Hauptmann P, Naumann M, Jacobs T (2010) Studies on neuronal differentiation and signalling processes with a novel impedimetric biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 26:1407–1413

Valero T, Kintzios S (2011) Novel Aspects of Neuronal Differentiation In Vitro and Monitoring with Advanced Biosensor Tools. *Current Medicinal Chemistry*. 18:900-908

Wex H, Rawson DM, Zhang T (2006) Use of biosensor and impedance spectroscopy assays to investigate the influence of temperature on *E. coli* sensitivity to 3,5-dichlorophenol. *Electrochimica Acta* 51:5157–5162

Whulanza Y, Ucciferri N, Domenici C, Vozzi G, Ahluwalia A (2011) Sensing scaffolds to monitor cellular activity using impedance measurements. *Biosens Bioelectron*. 15;26(7):3303-8. doi: 10.1016/j.bios.2011.01.002

Youn B, Sen A, Behie LA (2006). Scale-up of breast cancer stem cell aggregate cultures to suspension bioreactors. *Biotechnology Progress*, 22: 801-810

Yun Y, Dong Z, Tan Z, Schulz MJ (2010) Development of an electrode cell impedance method to measure osteoblast cell activity in magnesium-conditioned media. *Anal Bioanal Chem*. 396(8):3009-15. doi: 10.1007/s00216-010-3521-2

Zavizion B, Zhao Z, Nittayajarn A, Rieder RJ (2010) Rapid microbiological testing: monitoring bacterial stress. PLoS ONE 5(10): e13374. doi:10.1371 / journal.pone.0013374

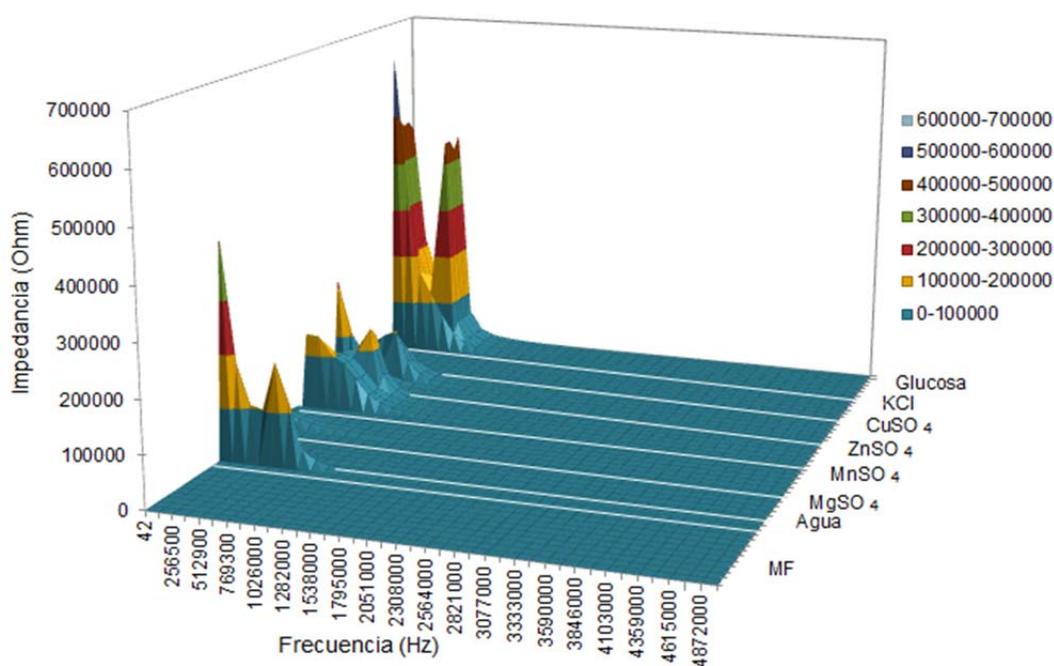
## XI. ANEXOS

### XI.1 Medición de espectroscopía de impedancia de medios de cultivo, esporas y sobrenadantes

#### XI.1.1 Determinación de valores de impedancia a diferentes frecuencias correspondientes a componentes de los medios de cultivo y agua

Se evaluaron soluciones a diferentes concentraciones de algunos componentes de los medios de cultivo (Tabla 5), las pruebas se realizaron bajo las mismas condiciones de fermentación (4 L, 600 rpm y 1 vvm), con el objetivo de registrar señales características con los diferentes parámetros dieléctricos.

En la Figura 19, se pueden observar las superficies de respuesta de *Impedancia* obtenidos en el rango de frecuencia de 42 Hz a 5 MHz que resultaron del análisis por espectroscopía de impedancia del agua, de las soluciones de los componentes citados y del MF.



**Figura 19.** Superficies de respuesta de impedancia de agua, MF y soluciones a diferentes concentraciones algunos componentes de los medios de cultivo.

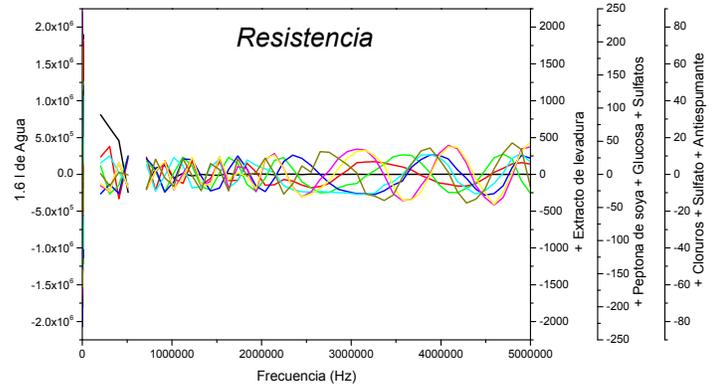
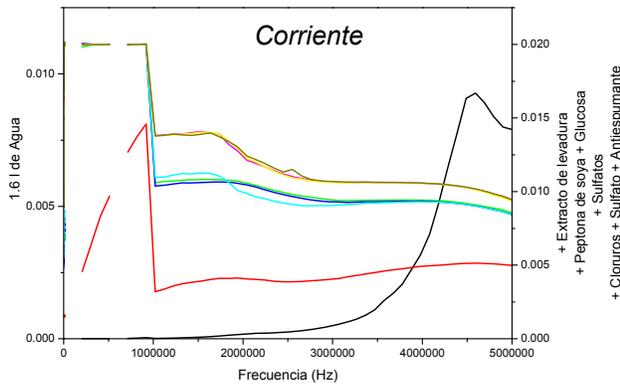
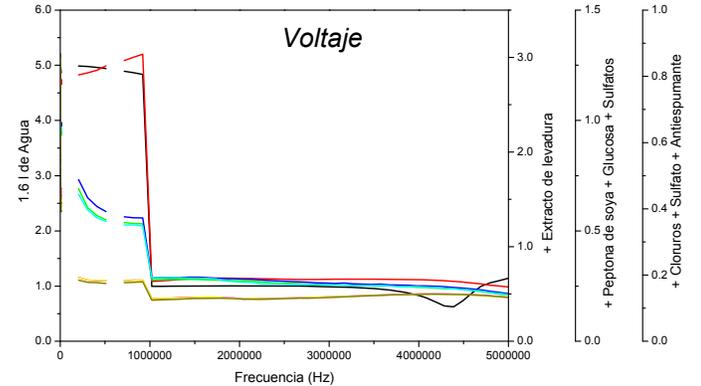
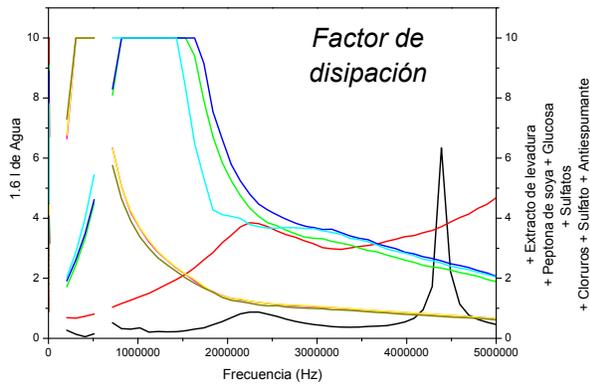
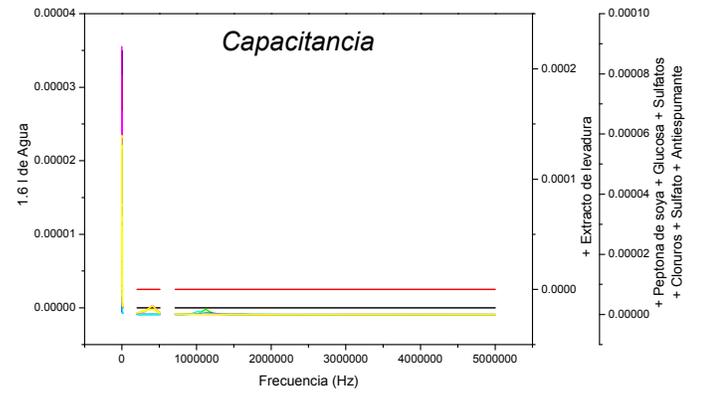
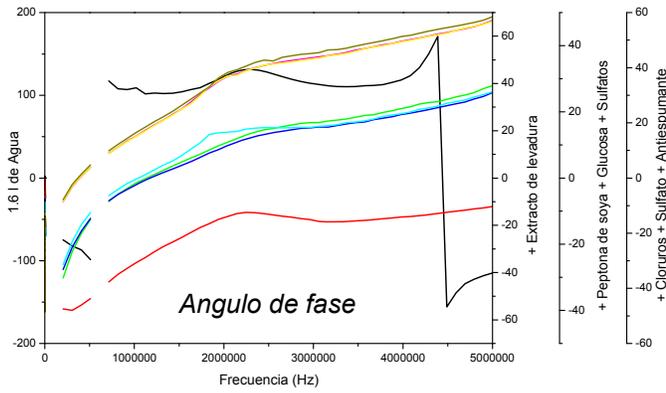
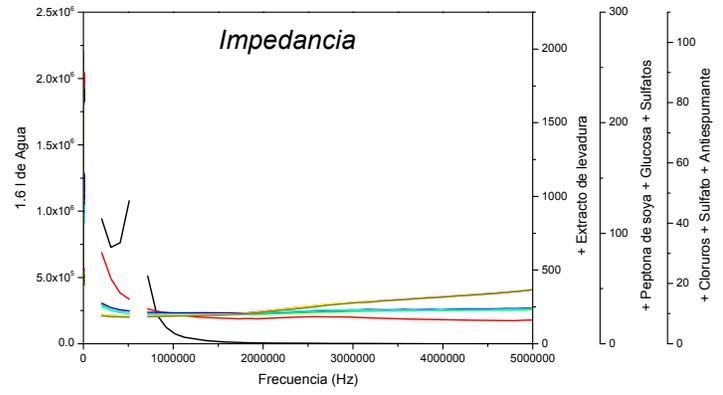
Con  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ , glucosa y agua se obtuvieron valores superiores de *Impedancia* de hasta valores por arriba de  $6 \times 10^5$  Ohms, indicándonos una alta oposición al paso de la corriente eléctrica. Por otro lado, los valores obtenidos con el MF y las soluciones de KCl,  $\text{MnSO}_4$  y  $\text{MgSO}_4$  fueron de pequeña magnitud mostrando así una alta conductividad y a consecuencia una baja resistencia al paso de la corriente eléctrica. Al comparar los valores bajos de impedancia obtenidos para el medio de cultivo con respecto a los obtenidos con soluciones de los componentes, se decidió que no era necesario analizarlas por separado pues realmente lo que nos interesa es el medio de cultivo formulado y la influencia por su respuesta dieléctrica que tenga sobre la señal de las células.

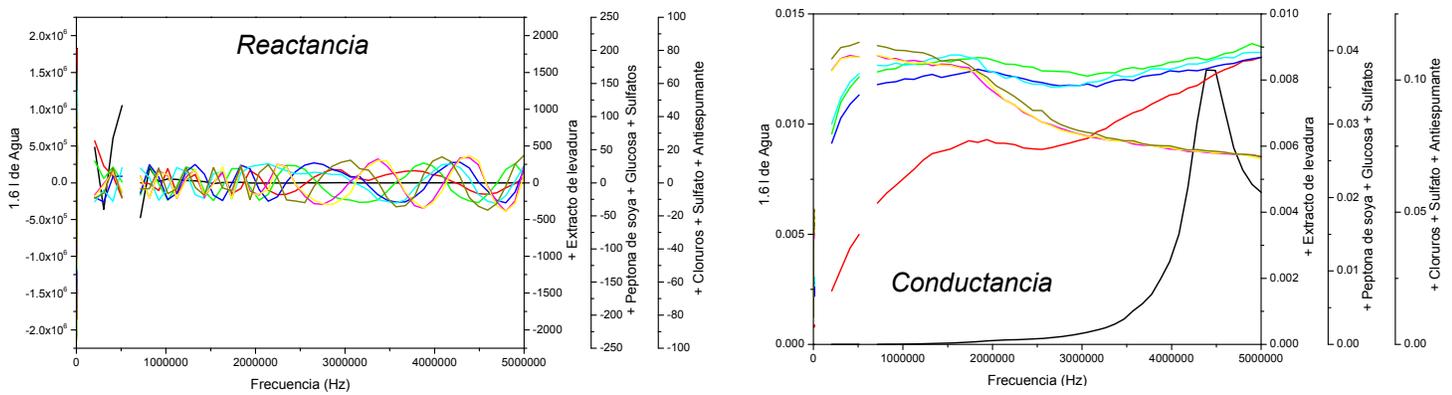
#### **XI.1.1 Medición de espectroscopía de impedancia de preparación de ML**

En la Figura 20 se muestran las señales respuesta de los parámetros dieléctricos medidos a cada paso para la preparación del medio de cultivo ML, esta información corrobora lo mencionado en el apartado anterior, donde se observó que las señales respuestas obtenidas de manera individual y en este caso de la adición consecutiva de los componentes enlistados en la Figura, no representan valores significativos en comparación al orden de magnitud de los obtenidos referidos a los cultivos celulares.

## Proceso de preparación:

- 1.6 l Agua
- + Extracto de levadura
- + Peptona de soya
- + Glucosa
- + Sulfatos
- + Cloruros
- + Sulfato
- + Antiespumante



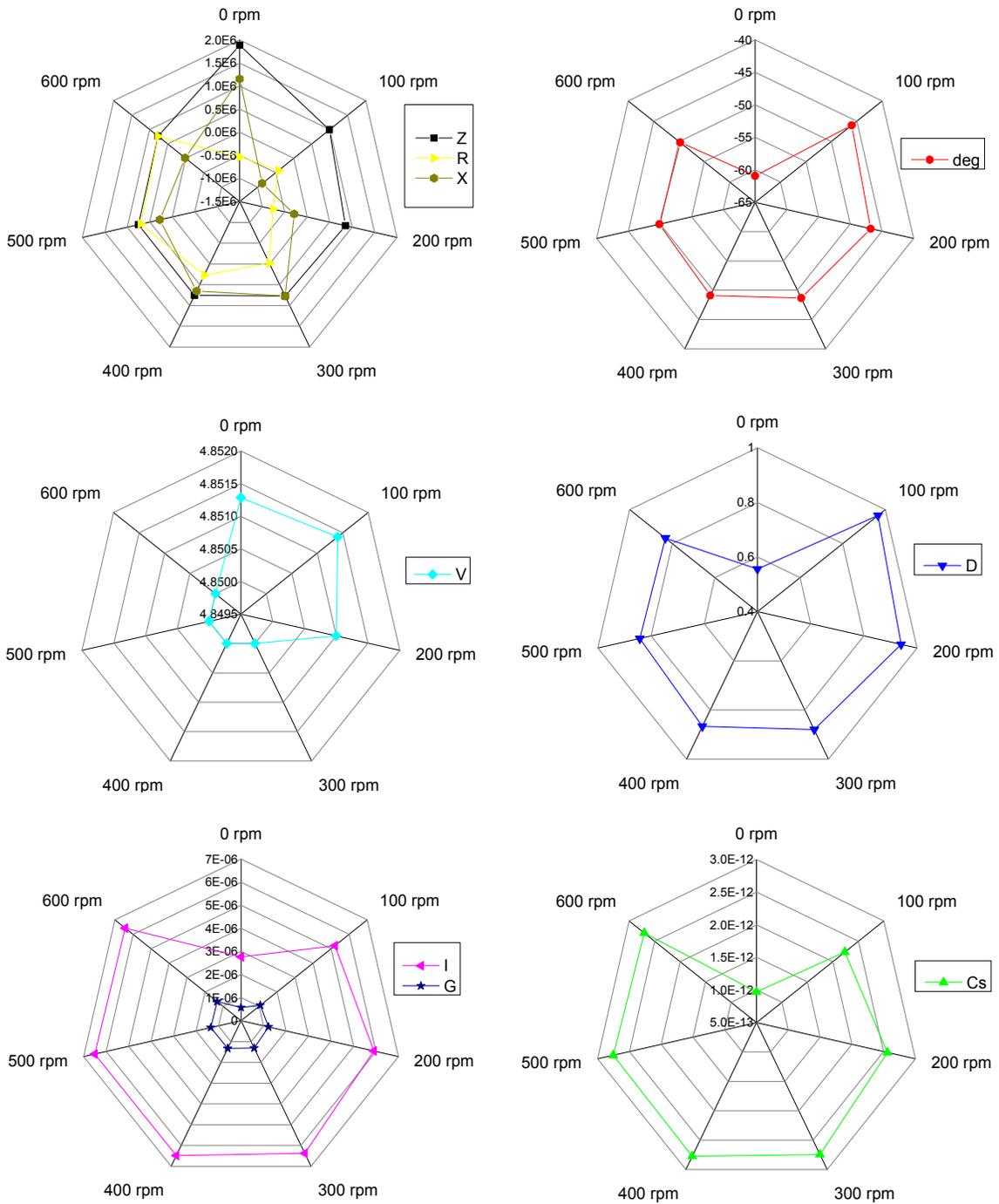


**Figura 20.** Gráficos de parámetros dieléctricos por etapas de la preparación de ML.

### XI.1.2 Medición de espectroscopia de impedancia de MF con diferentes valores de agitación

Se realizó una prueba para observar la respuesta de los parámetros dieléctricos en función de la variación de velocidad de agitación. Esta prueba se realizó en el fermentador utilizando 4-l de  $0.00135 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de sulfato ferroso en agua con velocidades de agitación de 0 a 600 rpm y aplicando una frecuencia de medición de 0.1 MHz.

En la Figura 21 se muestran los efectos de la agitación sobre las respuestas de cada uno de los parámetros dieléctricos con diferentes rangos de magnitud, hay una diferencia evidente entre no usar agitación con respecto a donde hubo agitación en parámetros como *Impedancia*, *Angulo de fase*, *factor de disipación*, *Corriente*, *Conductancia* y *Capacitancia*. En el caso de *Reactancia*, *Resistencia* y *Voltaje* se observan diferencias entre los valores obtenidos sin agitación, 100 y 200 rpm con respecto a las otras velocidades de agitación.



**Figura 21.** Gráficos radiales de respuesta de parámetros dieléctricos a variación de agitación (0 a 600 rpm).

Como en este trabajo se utilizó una agitación de 600 rpm en CL y de hasta 1350 rpm en CLA para mantener una concentración de oxígeno por arriba del 20%, se considera que no hubo una diferencia de respuesta por parte de los parámetros

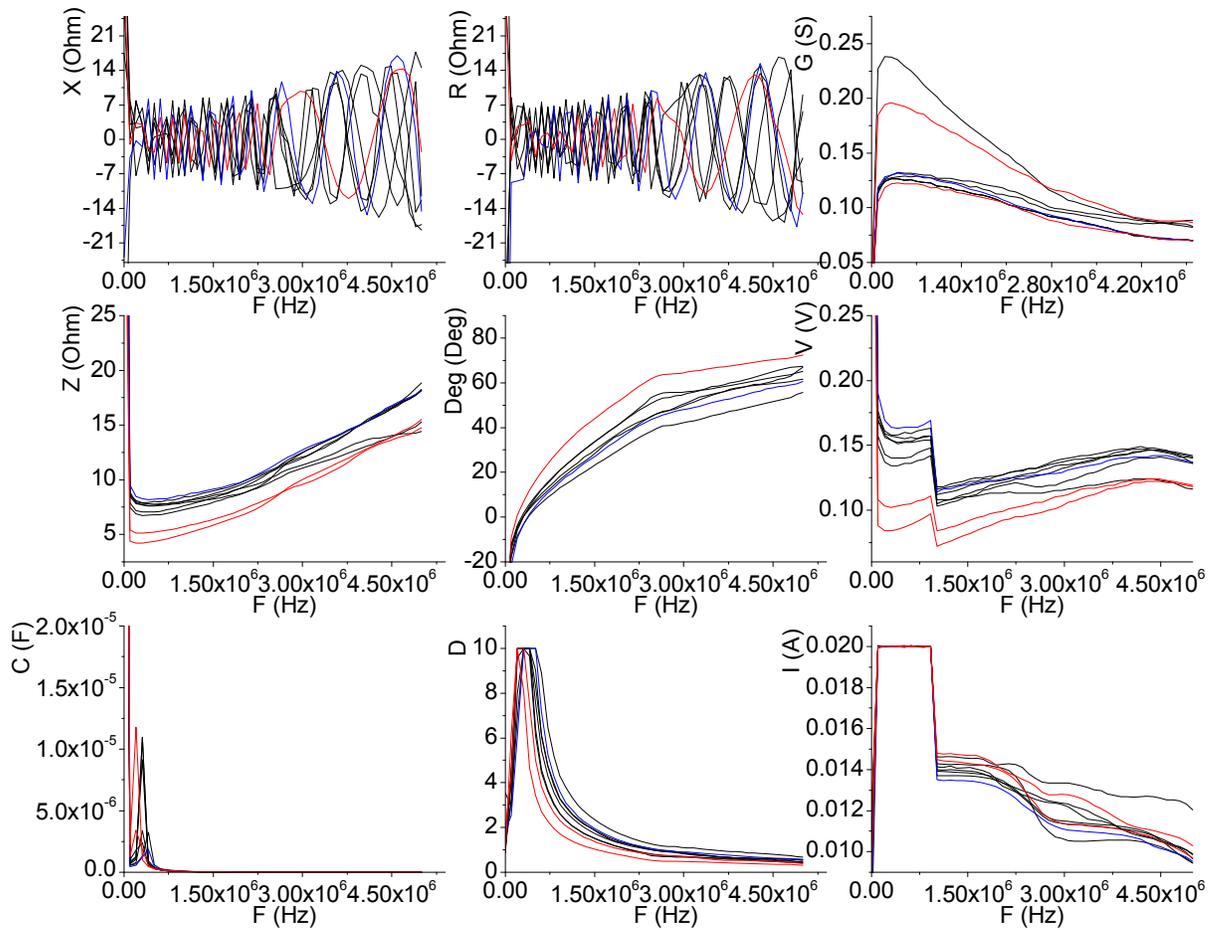
dieléctricos que interfiriera con la respuesta de interés referida al cultivo, crecimiento y proceso de diferenciación celular de *B. thuringiensis*.

### **XI.1.3 Medición de espectroscopía de impedancia de medios de cultivo**

En las fermentaciones realizadas en este proyecto se midieron los medios de cultivo antes de que estos fueran inoculados (Figura 22). Con el análisis de estos perfiles obtenidos dentro del rango en donde se localizaron las frecuencias seleccionadas (42 Hz a 5 MHz), se verificó que estos no generan valores dieléctricos que fuesen comparables o afectaran las señales obtenidas por la presencia de células y procesos celulares específicamente diferenciación celular. En la Figura 22 se observan dichos perfiles dieléctricos en donde los comportamientos son similares entre los perfiles de los distintos medios graficados (ML, MF y MHySoy).

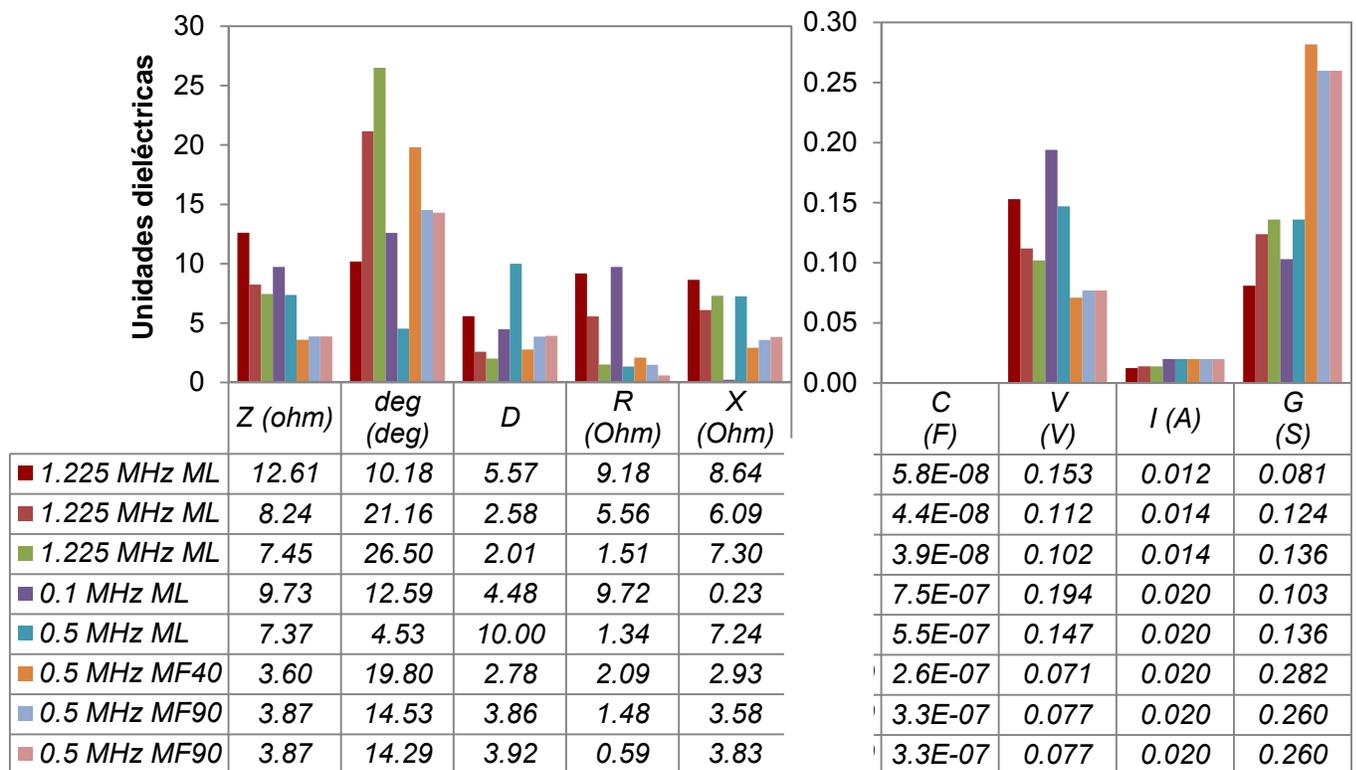
En la Figura 23 se observan los valores de absolutos de los distintos parámetros dieléctricos de los medios de cultivo utilizados en las fermentaciones que se midieron a una frecuencia fija (1.225, 0.5 y 0.1 MHz) para *Z*, *D*, *X*, *V*, *I*, *G*, *Deg* y *R*.

Con estos resultados, se verificó que no hay una gran diferencia en las señales dieléctricas obtenidas para los medios de cultivo, a excepción del MF que muestra valores menores a los obtenidos para ML y MHySoy con *Z*, *V* y *D* (Figura 22). En la Figura 23, en los valores de cada parámetro dieléctrico a las frecuencias seleccionadas se observaron valores similares para *Reactancia* en función de cada frecuencia. Con esto concluimos que las señales dieléctricas de los medios de cultivo no repercuten a las señales obtenidas en las fermentaciones que se realizan en estos.



**Figura 22.** Perfiles dieléctricos de medios de cultivo en el rango de frecuencia de 42 Hz a 5 MHz.

ML (—), MHySoy (—) y MF (—).



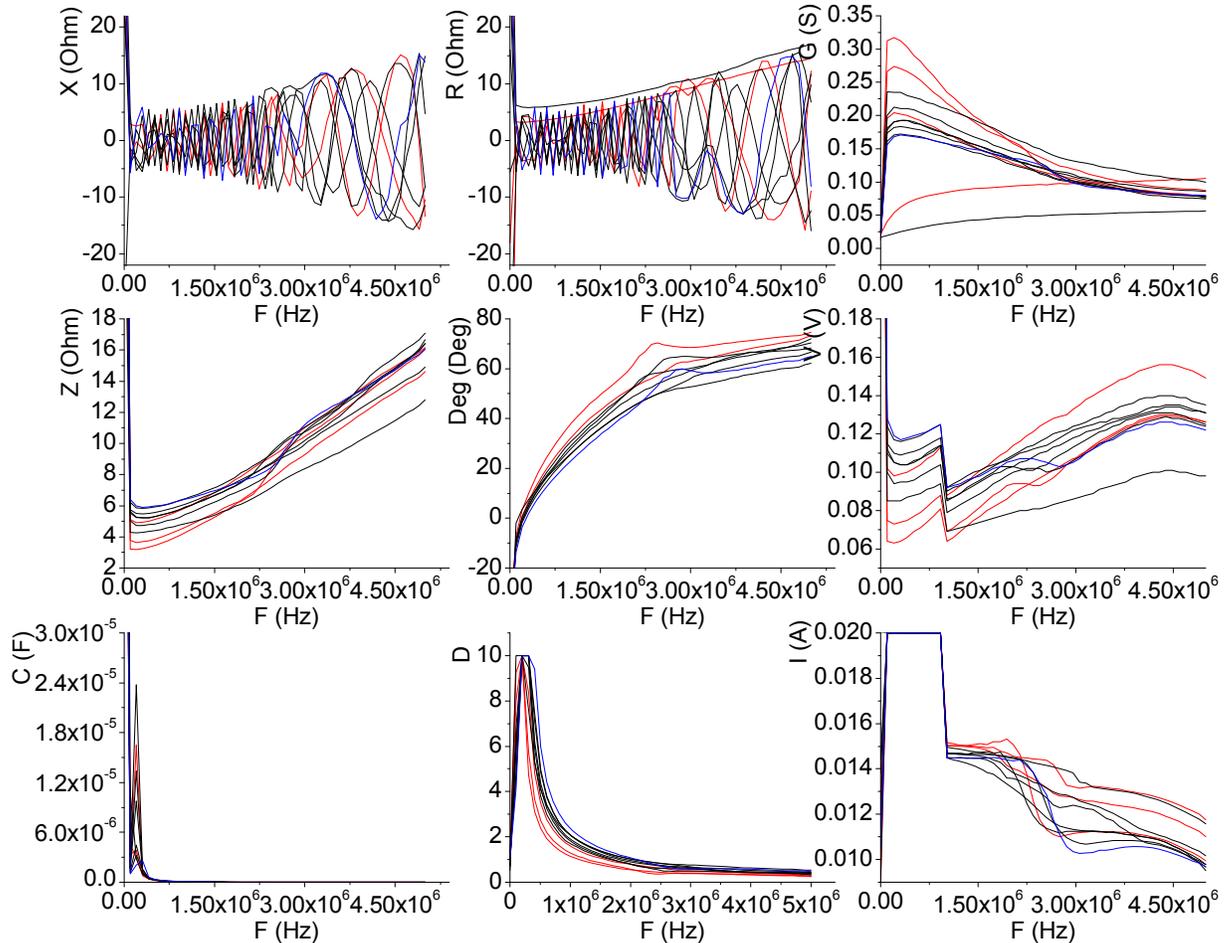
**Figura 23.** Valores absolutos de parámetros dieléctricos de medios de cultivo evaluados en frecuencias seleccionadas en diferentes fermentaciones.

#### XI.1.4 Medición de espectroscopía de impedancia de solución de esporas

A partir de algunas fermentaciones realizadas en este proyecto se recuperó el fermentado al final del proceso, se lavaron las esporas y se realizaron mediciones en los diferentes rangos de impedancia bajo las mismas condiciones de operación en una solución de sales con la misma concentración usada en el medio de cultivo. Los resultados presentados corresponden al rango de donde seleccionaron las frecuencias (42 Hz a 5 MHz).

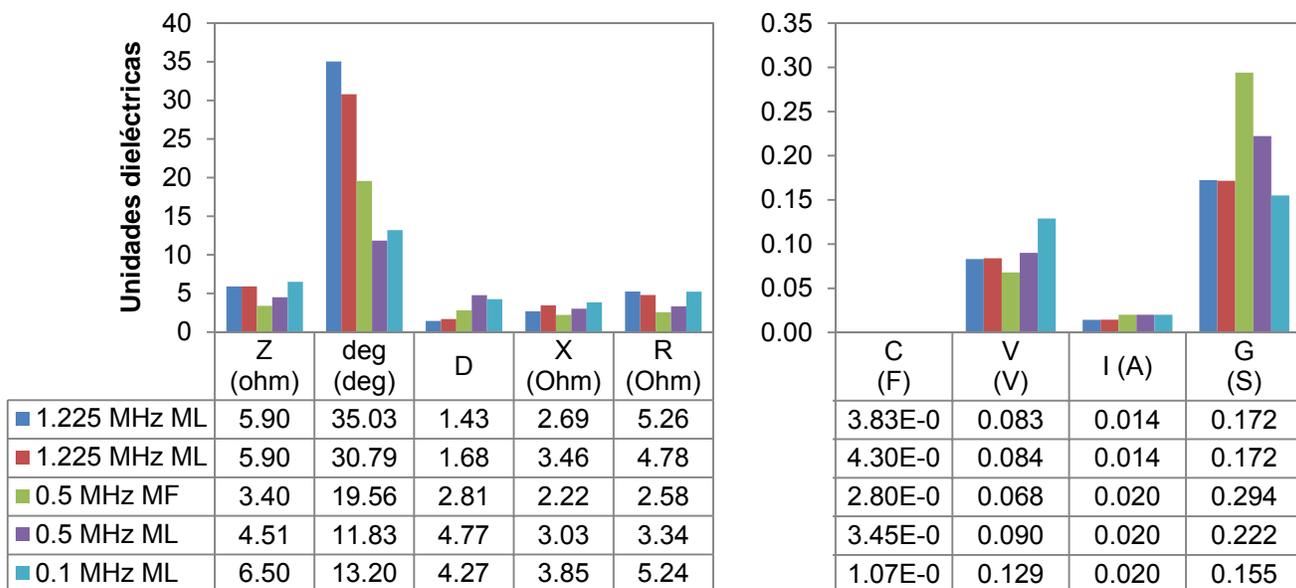
En la Figura 24 se muestran perfiles dieléctricos del final de proceso de algunas fermentaciones realizadas en ML, MF y MHySoy, en este tiempo de la fermentación

solo se observaron esporas y este barrido de frecuencias se realizó con el fin de poder determinar diferencias en valores de señales entre caldos resultantes de la fermentación con las esporas obtenidas al final de los procesos.



**Figura 24.** Perfiles dieléctricos obtenidos al final de diferentes fermentaciones en el rango de frecuencia de 42 Hz a 5 MHz.  
ML (—), MHySoy (—) y MF (—).

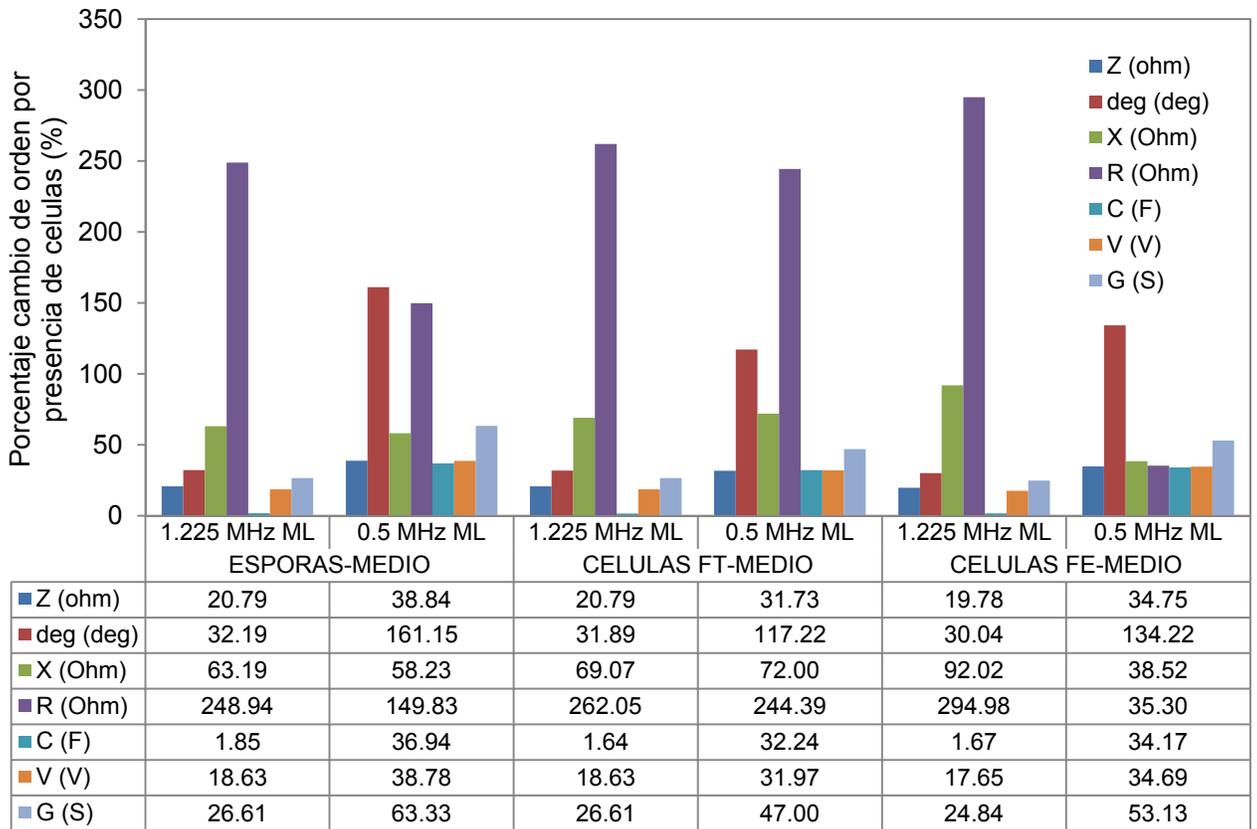
En la Figura 25 observamos que los perfiles obtenidos tienen comportamiento similar en función de frecuencia aplicada con el de los medios (Figura 23), y debido a la presencia de esporas, se observan diferencia en las magnitudes dieléctricas obtenidas. Con esto se corrobora en la Figura 25, que las magnitudes dieléctricas de los tiempos finales de las fermentaciones monitoreadas a una frecuencia tampoco tienen influencia sobre los efectos respuesta debido a la presencia de células viables.



**Figura 25.** Valores absolutos de parámetros dieléctricos finales de proceso evaluados en frecuencias seleccionadas en diferentes fermentaciones.

En la Figura 26, se muestran las diferencias de magnitud de señal entre el medio de cultivo (ML) y con las células presentes (esporas, células de fase de transición y de fase de esporulación), tanto al inicio de la fase de transición como al inicio de la fase de esporulación; en esta figura se observa que el porcentaje a diferencia de lo que menciona Kurz et al. (2011) que tuvo un 194% de aumento de *Impedancia* por presencia de células medidas a 1 KHz y Whulanza et al. (2011) que refiere un cambio del orden de 40% por presencia de células con *Impedancia*, con ese parámetro se observa que el cambio de magnitud no es mayor que 38.84% con esporas, 34.75% con células en fase de esporulación y 31.73% con células en fase de transición, datos obtenidos con una frecuencia de 0.5 MHz. Resalta la diferencia obtenida con *Resistencia*, que tuvo hasta 294.98% de cambio de magnitud medidas a 1.225 MHz. Le sigue *Angulo de fase* con 161.15% medido con 0.5 MHz y resalta también *Reactancia* con 92.02% de cambio de orden del medio con respecto a células en fase de esporulación medidas a 1.225 MHz. Y por otro lado el parámetro

que menos diferencia entre el medio de cultivo y la presencia de células fue *Capacitancia* con 1.64% medida a 1.225 MHz con células en fase de transición.

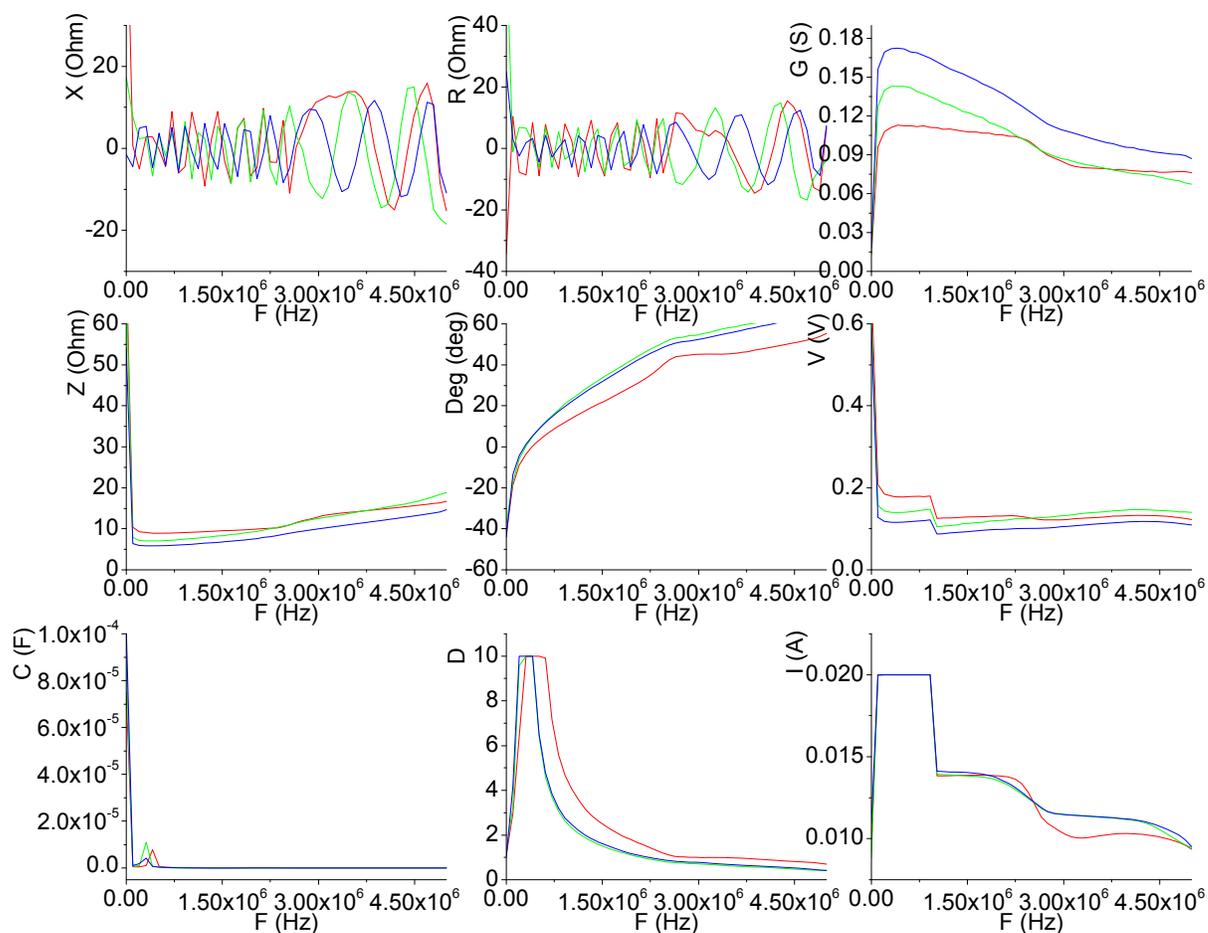


**Figura 26.** Diferencias de magnitud de parámetros dieléctricos entre medio de cultivo (ML) y células presentes en fermentación (esporas, células fase de transición, células fase de esporulación).

### XI.1.5 Medición de espectroscopía de impedancia de sobrenadante para su comparación con el medio de cultivo y solución de esporas en ML

Finalmente, en la Figura 27 se muestran los perfiles dieléctricos en el rango de 42 Hz y 5 MHz del sobrenadante de una fermentación en ML con *B. thuringiensis* pHTcry1kAc para corroborar la diferencia que tiene con respecto al medio de cultivo y con formulación de una solución de sales del medio y esporas lavadas resultantes

de esta misma fermentación. Las mediciones se realizaron bajo condiciones de fermentación: 30°C, 1 vvm, 600 rpm.



**Figura 27.** Comparación de parámetros dieléctricos de medio de cultivo, sobrenadante y esporas en el rango de frecuencia de 42 Hz a 5 MHz.

4 l de medio más esporas lavadas (—) ML (—) y sobrenadante final de fermentación de 1kAc en ML (—).

Con estos últimos resultados evaluados en el rango de frecuencia de mayor interés (42 Hz a 5 MHz) bajo condiciones de operación del medio de cultivo, soluciones de esporas y sobrenadante final, se concluye que estos no muestran diferencias significativas ni influencia en los resultados obtenidos con el proceso de fermentación y los datos dieléctricos obtenidos para cada parámetro sobre todo de la fase de

transición y fase de esporulación donde *B. thuringiensis* lleva a cabo el proceso de diferenciación celular que estudiamos en este proyecto.

**XI.2 Manuscrito: “*Reactance and Resistance; main properties to follow the cell differentiation process in *Bacillus thuringiensis* by dielectric spectroscopy in real time*”**

Dinorín-Téllez-Girón J, Delgado-Macuil RJ, Larralde Corona CP, Martínez Montes FJ, de la Torre Martínez M, López-Y-López VE (2015) Reactance and resistance: main properties to follow the cell differentiation process in *Bacillus thuringiensis* by dielectric spectroscopy in real time. Appl Microbiol Biotechnol. DOI 10.1007/s00253-015-6562-9

# Reactance and resistance: main properties to follow the cell differentiation process in *Bacillus thuringiensis* by dielectric spectroscopy in real time

Jabel Dinorín-Téllez-Girón<sup>1</sup> · Raúl Jacobo Delgado-Macuil<sup>1</sup> ·  
Claudia Patricia Larralde Corona<sup>2</sup> · Francisco Javier Martínez Montes<sup>1</sup> ·  
Mayra de la Torre Martínez<sup>3</sup> · Víctor Eric López-Y-López<sup>1</sup>

Received: 18 February 2015 / Revised: 17 March 2015 / Accepted: 19 March 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

**Abstract** During growth, *Bacillus thuringiensis* presents three phases: exponential phase (EP), transition state (TS), and sporulation phase (SP). In order to form a dormant spore and to synthesize delta-endotoxins during SP, bacteria must undergo a cellular differentiation process initiated during the TS. Dielectric spectroscopy is a technique that can be utilized for continuous and in situ monitoring of the cellular state. In order to study on-line cell behavior in *B. thuringiensis* cultures, we conducted a number of batch cultures under different conditions, by scanning 200 frequencies from 42 Hz to 5 MHz and applying fixed current and voltage of 20 mA and 5 V DC, respectively. The resulting signals included *Impedance (Z)*, *Angle phase (Deg)*, *Voltage (V)*, *Current (I)*, *Conductance (G)*, *Reactance (X)*, and *Resistance (R)*. Individual raw data relating to observed dielectric property profiles were correlated with the different growth phases established using data from cellular growth, *cryIAC* gene expression, and free spores obtained with conventional techniques and fermentation

parameters. Based on these correlations, frequencies of 0.1, 0.5, and 1.225 MHz were selected for the purpose of measuring dielectric properties in independent batch cultures, at a fixed frequency. *X* and *R* manifest more propitious behavior in relation to EP, TS, SP, and spore release, due to particular changes in their signals. Interestingly, these profiles underwent pronounced changes during EP and TS that were not noticed when using conventional methods, but were indicative of the beginning of the *B. thuringiensis* cell differentiation process.

**Keywords** Cell differentiation · Dielectric spectroscopy · *Bacillus thuringiensis* · On-line measuring · *Resistance (R)* · *Reactance (X)*

## Introduction

A key question in biology relates to how it is that sister cells with identical genomes follow different patterns for gene expression (Iber et al. 2006). Bacteria utilize a variety of molecular mechanisms to achieve cell differentiation, and the resulting developmental transformations generate specialized cell types that increase their ability to survive in the environment (Moran 2002; Barák and Wilkinson 2005; Banse et al. 2008; Saujet et al. 2011). Cellular differentiation is the process during which relatively unspecialized cells acquire specialized structural and/or functional features that characterize the cells, tissues, or organs of the mature organism, or some other relatively stable phase during the life history of the organism. Differentiation includes the processes that induce a cell to a specific fate and its subsequent development to the mature state (Cammack et al. 2006), as in *Bacillus subtilis* where the formation of an asymmetric septum during sporulation is

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00253-015-6562-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Víctor Eric López-Y-López  
vlopezyl@ipn.mx

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, Carretera Estatal Santa Inés Tecuexcomac-Tepetitla, km 1.5, Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala C.P. 90700, México

<sup>2</sup> Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, Boulevard del Maestro S/N esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, Reynosa, Tamaulipas C.P. 88710, México

<sup>3</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a La Victoria km 0.6, Hermosillo, Sonora C.P. 83304, México

related to the control on the part of several genes that are involved in cellular division affected by sporulation factors (Errington 2003; Hilbert and Piggot 2004). Hence, this morphological process (sporulation process) is a powerful system for studying mechanisms that control cell division and development (Bejerano-Sagie et al. 2006).

The most successful insect pathogen used for insect control is *Bacillus thuringiensis*, currently comprising ~2 % of the total insecticide market (Bravo et al. 2011). During sporulation, *B. thuringiensis* produces parasporal inclusions (delta-endotoxins known as Cry proteins), with entomotoxic activity (Agaisse and Lereclus 1994; Aronson 2002; Soberón et al. 2007). Cry proteins are specifically toxic to different insect orders, such as *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, and *Nematodes* (Soberón et al. 2007). *B. thuringiensis* undergo a life cycle that includes vegetative growth or exponential phase (EP), transition phase (TS), and sporulation phase (SP). The transition phase is characterized by a decrease in specific growth rate ( $\mu$ ) and metabolic changes (López-y-López and de la Torre 2005). The sporulation process in *B. thuringiensis* is very similar to that so well characterized in *B. subtilis* (Aronson 2002) and which has been extensively studied (Phillips and Strauch 2002). During transition from exponential to stationary growth phase, a complex regulatory network will determine which option (still growing or initiation of sporulation) is most suitable under the given conditions (Saujet et al. 2011). If the cell opts for sporulation (Lazazzera 2000; Phillips and Strauch 2002; Bassler and Losick 2006), one of the progeny will be a compact and durable spore, and the other the mother cell that aids in construction of the spore but is lysed at the completion of the cellular differentiation process (Jenal and Stephens 1996). Considerable work has been dedicated to depicting the mode of action of insecticidal Cry proteins (Vachon et al. 2012), as well as to the development of media culture for different strain production and research into insecticidal activity of Cry proteins (Frankenhuyzen 2009). Despite this information, there are no reports that address the cell differentiation process in *B. thuringiensis* cultures monitored on-line.

In order to successfully examine dynamic cellular processes in live cells, non-destructive real-time monitoring methods are required (Bagnaninchi and Drummond 2011; Park et al. 2011). Dielectric spectroscopy measurements have been applied to the analysis of biological materials such as cell suspension and tissues (Schwan and Takashima 1991; Morgan et al. 2007). These measurements are based on the application of an electric field to a cell suspension causing a shift in the ions present, which results in polarization of the cell membrane that behaves as a capacitor (November and Van Impe 2002). The cells are subsequently termed dielectric because they are located in the electric field between two electrodes for analysis (Justice et al. 2011), where ionic and electronic conduction is evident (Grimnes and Martinsen 2000; Luong et al.

2001; Bonmassar et al. 2010; Pänke et al. 2011). The electrical and morphological properties of the cell membrane and cytoplasm and extracellular media are assumed to represent sensitive parameters of the cellular state (Gheorghiu 1996). Currently, dielectric spectroscopy is used to determine biomass, living cell volume, cell length, etc. (Hunt et al. 2009), or for detection of bacteria in water (Timms et al. 1996), milk (Felice et al. 1999), or food (Gibson et al. 1992). Likewise, it is used for industrial microbial process control and sanitation microbiology (Swaminathan and Feng 1994; Silley and Forsythe 1996), as well as for microbial growth (Dézenclos et al. 1994) and to assess metabolic activity due to growth and physiological state among yeast (Owens et al. 1992; Deák and Beuchat 1993), bacteria, and fungi (Matanguihan et al. 1994). This technique has also been used as an on-line method for measuring the formation of biofilms by *Klebsiella rubiacearum* and for on-line control of these biofilms by the automated addition of chlorine in response to appropriate changes in electrical capacitance (Markx and Kell 1990). Similarly, Sarrafzadeh et al. (2005) mentioned that it is appropriate for monitoring growth and sporulation of *B. thuringiensis* in fed-batch culture. Biofilm formation and sporulation processes result from the adaptation of bacterial population to environmental conditions; these are regulated by quorum sensing. Other features regulated by quorum sensing in bacteria include the impulse to sporulate (Lazazzera 2000), as well as virulence, genetic competence, and bioluminescence, among other factors with potential application in biotechnology (Mangwani et al. 2012). Because bacteria use quorum sensing communication circuits that regulate a diverse array of physiological activities, these physiological changes modify the electrical capacity of the cell, so that dielectric spectroscopy can be used to follow these changes on-line. However, there is no available information regarding cell differentiation process in bacteria monitored by dielectric spectroscopy in real time and in situ. In order to address whether dielectric spectroscopy is appropriate for following a differentiation process in bacteria, we use *B. thuringiensis* as a study model and correlate the changes in dielectric properties when batch cultures are undergoing exponential growth phase, transition state, and sporulation phase, as well as analyzing data from cellular growth, *cryIAC* gene expression and free spores obtained using conventional techniques, and fermentation parameters. We found good correlation between dielectric properties and cell differentiation process in *B. thuringiensis*. Interestingly, *Reactance* ( $X$ ) and *Resistance* ( $R$ ) manifested more propitious behavior in relation to exponential phase, transition state, sporulation phase, and spore release, due to particular changes in their signals. This suggests that *Reactance* and *Resistance* can be useful properties for identifying minimal changes in real time and in situ, in relation to the cell differentiation process, as well as for the initiation of this cellular event that is

not possible to evaluate using conventional techniques in real time.

## Materials and methods

### Microorganism

*B. thuringiensis* strain HD73 pHT1kAc derived from *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD73 (ATCC-35866) was used. The transformed strain has a 1000-bp fragment upstream of the *cryIAc* promoter derived from *B. thuringiensis* HD73 fused to *lacZ* into plasmid pHT304-18Z (Agaisse and Lereclus 1994). Sierra-Martínez et al. (2004) constructed the transformed strain.

### Media and culture conditions

Two culture media were utilized: Farrera medium (Farrera et al. 1998) and Clean medium. The composition of Farrera medium in ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) consisted of glucose, 13.42; soybean meal, 5.6; corn steep solids, 4.05; and yeast extract, 2.59. Clean medium in ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) consisted of glucose, 12.0; soybean peptone, 12.0; and yeast extract, 2.59. In addition, both media had the same composition of mineral salts in ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ):  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2;  $\text{MnSO}_4$ , 0.04;  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0058;  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.0075; KCl, 3.0;  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.00135;  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.03; and Mazu DF antifoaming agent, 1 ( $\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ). For Farrera medium, the pH was adjusted to 2.0 with  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85 % ( $w/v$ ), prior to sterilization. Before inoculation, the pH was adjusted to 7.2 with 5 M NaOH. Batch cultures were performed in a Sartorius Biostat A plus reactor, with 4-l of working volume. The pH was controlled automatically at 7.2 with 5 M NaOH and 0.67 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Foam was controlled by the addition of Mazu DF antifoaming agent. Operative conditions were 30 °C, 600 rpm, and 1 vvm. A log-phase inoculum was prepared from a spore disk with  $10^7$  spores with a one-stage culture in Farrera medium, incubated at 30 °C and 200 rpm for 14 h. The reactor was seeded with 6.25 % ( $v/v$ ) for the one-stage culture. This culture condition was the same for all experiments. Biomass experimental data were adjusted to exponential growth model (Eq. 1):

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (1)$$

In Eq. (1),  $X$  are the cell counts at time  $t$ ,  $X_0$  are the initial cell counts,  $\mu$  is the specific growth rate, and  $t$  is the time. It was assumed that the transition phase initiated when  $\mu$  decreased and cell growth became linear (López-y-López and de la Torre 2005), whereas the onset of sporulation takes place 1 h prior to the detection of  $\beta$ -galactosidase activity from pHT1kAc, as transcription of *cryIA* from the BtI promoter has been reported to initiate 1.0 to 2.0 h after the onset of

sporulation phase (Agaisse and Lereclus 1995; Schnepf et al. 1998; López-y-López and de la Torre 2005). Transition state is marked by a shaded area in growth profiles, determined by conventional analysis of each fermentation; this area delimits the exponential growth phase shown on the left side and the sporulation phase shown on the right side of each graph. For the same purpose, bacterial oxygen demand was maximal at the end of the log phase, remained high for a short time during the transition phase, and decreased during sporulation phase. To confirm the establishment of sporulation phase onset, the increase in the dissolved oxygen (DO) profile was also assessed. We use these guidelines to set the growth phases in the time course profile for all batch cultures in this work.

### $\beta$ -galactosidase assay

*cryIA* expression was determined as described by López-y-López and de la Torre (2005), applying  $\beta$ -galactosidase assay; briefly, fermentation samples of 1.0 ml were centrifuged at 10,000 rpm at 4 °C, and the cell pellet was washed twice and re-suspended in 1.0 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.5). The reaction mixture (Sambrook et al. 1989) contained 30  $\mu\text{l}$ , cell suspension; 201  $\mu\text{l}$ , phosphate buffer; 3.0  $\mu\text{l}$ , 100  $\times$  Mg solution; and 66  $\mu\text{l}$  of *ortho*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) and was incubated at 30 °C, for 30 min. The reaction was stopped with 500  $\mu\text{l}$  of  $\text{NaCO}_3$  1 M, centrifuged under the same conditions mentioned above, and read at 420 nm. One unit of  $\beta$ -galactosidase (Miller unit, MU) was defined as the amount of enzyme hydrolyzing 1  $\mu\text{mol}$  of ONPG  $\text{min}^{-1}$ . All assays were performed in duplicate.

### Analytical methods

Quadruplicate bacilli and spore counts were performed by diluting broth samples in saline solution, followed by vigorous mixing to avoid cell or spore clumping and direct microscopic counting in a Neubauer chamber (Bravo et al. 1993; Flores et al. 1997; Farrera et al. 1998; Navarro et al. 2006; Boniolo et al. 2012). Sporulation efficiency was calculated by taking the sum of free spores obtained at the end of fermentation, dividing this by the bacilli count determined at the onset of sporulation phase and multiplying the quotient by 100 (López-y-López and de la Torre 2005). Residual glucose was analyzed in a biochemistry analyzer (YSI 2700 Select). The carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) in the exit gas was monitored in real time using an infrared  $\text{CO}_2$  analyzer (Carbon dioxide analyzer Mod. 906, Quantek Instruments). Sartorius PC-Panel  $\mu\text{DCU}$  6.34 was used for DO measurement and pH measurement-control.

## Dielectric measurements

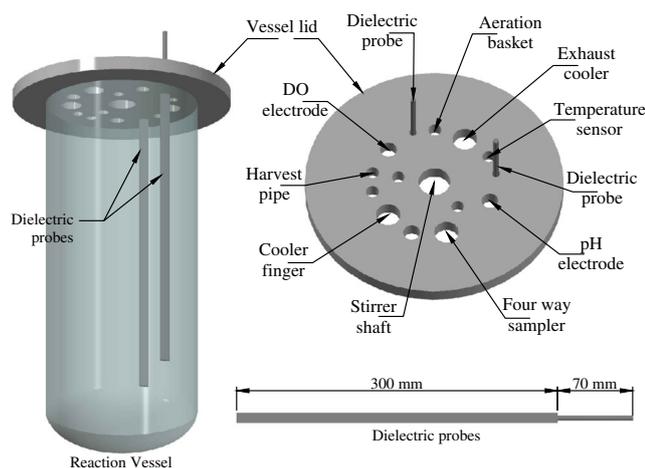
Dielectric parameters were measured by the Hioki 3532-50 LCR HiTester impedance meter. Figure 1 shows the reactor vessel and dielectric probes. The dielectric probes consisted of two stainless steel blades, 300 mm in length, 9.5 mm wide, and 2.38 mm thick. In order to avoid any contact with the metal of the reactor lid, the probes were fixed with an adapter constructed out of Teflon®. Each probe had a protrusion length of 35 mm from the lid, and was coupled to the impedance analyzer with a type A crocodile clip. Dielectric properties were measured by applying a fixed current of 20 mA and 5 V, scanning 200 frequencies at 4 ranges, initiating at 42 Hz and ending at 1 kHz, 5 kHz, 10 kHz, and 5 MHz. Each scan was performed for at least 19 measurements per fermentation process. Dielectric properties acquired from *B. thuringiensis* cultures included *Impedance (Z)*, *Angle phase (Deg)*, *Voltage (V)*, and *Current (I)* as well as the parameters *Resistance (R)*, *Reactance (X)*, and *Conductance (G)* calculated by Eqs. (2), (3), and (4), respectively. Dielectric profiles were correlated with kinetic profiles obtained from conventional analysis such as bacilli and spore counts, *cry* expression, residual glucose, resulting CO<sub>2</sub>, and DO. Specific frequencies were then selected based on the most pertinent correlations applying the correlation coefficient of Pearson for two data groups, according to the conditional Eq. (5).

$$R = Z \cdot \cos(\text{Deg}) \quad (2)$$

$$X = Z \cdot \sin(\text{Deg}) \quad (3)$$

$$G = \frac{I}{V} \quad (4)$$

$$\rho_{x,y} = \frac{\text{Cov}(X, Y)}{\sigma_x \cdot \sigma_y} \geq |0.9| \quad (5)$$



**Fig. 1** Configuration of dielectric probes. The cooler finger and exhaust cooler are fixed to the lid, as are the four-way sampler, aeration basket, stirrer shaft, and harvest pipe for the pH, DO, temperature, and dielectric probes

In Eq. (5),  $\rho$  is the correlation coefficient,  $\text{Cov}$  is the covariance of  $X$  and  $Y$  values,  $X$  represents each fermentation parameter (bacilli, spores, *cry* expression, residual glucose, CO<sub>2</sub>, and DO), and  $Y$  refers to each dielectric property ( $Z$ ,  $\text{Deg}$ ,  $V$ ,  $I$ ,  $G$ ,  $R$ , and  $X$ ) and  $\sigma$  is standard deviation of  $X$  and  $Y$ . Groups of data utilized are presented in Table 1. The Hioki LCR version, 4.03E was used to record the process data which sends individual raw data referring to dielectric properties to Excel® program.

## Results

### Scanning frequencies in batch cultures

Nine batch cultures were set up. A typical time course in Clean medium is shown in Fig. 2. The exponential growth phase lasted 4 h and was followed by the transition state with linear growth (4–6 h) (Fig. 2a). Glucose was depleted after 6 h, and at 14 h, free spores were detected (Fig. 2b). Oxygen demand was maximal at the end of the log phase, remained high during transition phase, and decreased during sporulation (Fig. 2b). Figure 2c shows 50 *Impedance* profiles obtained from individual raw data scans at 42 Hz to 5 MHz. These profiles showed a decreasing pattern with specific changes occurring in the periods from 0 to 1 and 1 to 4 h, which corresponded to the exponential growth phase, the transition phase (4 to 6 h), and during sporulation (6 to 14 h). The other dielectric properties profiles ( $\text{Deg}$ ,  $V$ , and  $I$  as well as the calculated parameters  $R$ ,  $X$ , and  $G$ ) had similar profiles (data not shown). An example of fermentation with Farrera medium is shown in Fig. 3. In this case, the changes on *Impedance* profiles were not pronounced, as in the case of Clean medium. Although the decreasing pattern of impedance is noticeable in the range of 0 to 6  $\Omega$  in Fig. 2c. This information suggests that the culture medium can affect the signal profiles of dielectric properties like *Impedance* in scanning frequencies. In Table S1, the value for the range of kinetic parameters from nine fermentations used for correlations are presented.

In order to reveal a correlation between the data acquired through dielectric spectroscopy and growth phases (Table 1), Eq. 5 was used, and 1,026,000 correlations were obtained for each fermentation; only 0.72 % of them had  $\rho_{x,y} \geq 0.9$  (Fig. 4); most of them corresponded to frequencies in a range of 300 kHz to 1.8 MHz. For further experiments, clean medium and frequencies of 1.225 and 0.5 MHz were used, as well as 0.1 MHz, as in other studies (Gou et al. 2011; Schwarzenberger et al. 2011).

**Table 1** Grouping of data used to calculate correlating parameters (Eq. 5) between dielectric properties obtained to *B. thuringiensis* fermentation parameters and cell differentiation process in time duration of fermentation and each growing phase established through conventional

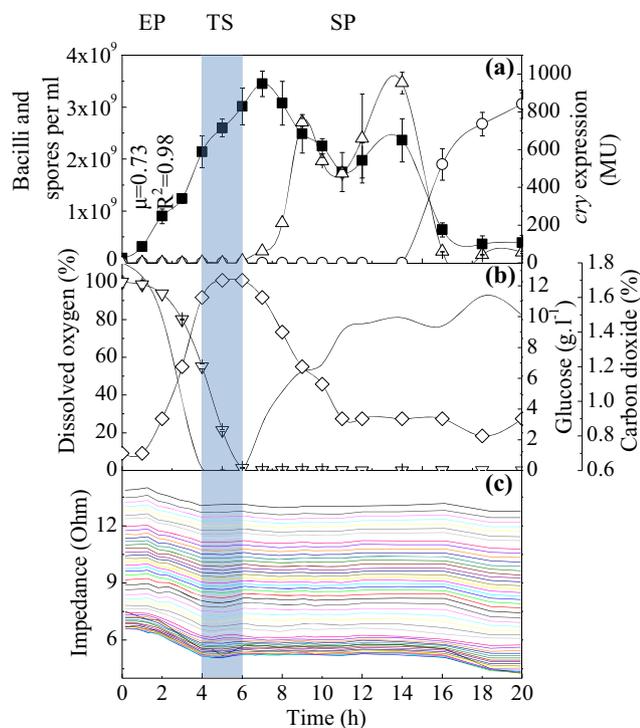
Frequency range tested	Time of scanning (h)	Dielectric properties obtained	Fermentation parameter measured	Fermentation segment
42–1 kHz	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,	<i>Z, Deg, X, R, V, G, Capacitance</i>	Bacilli, spore, <i>cry</i> expression,	EP, TS, SP, Spores,
42–5 kHz	12, 14, 16, 18, 20, 22, 24	<i>(Cs), Dissipation factor (D),</i>	dissolved oxygen, carbon	Complete
42–10 kHz		<i>Current (I)</i>	dioxide, glucose	
42–5 MHz				
200 frequencies	19 times	9 parameters	6 parameters	5 time segments

### Batch cultures monitored at fixed frequencies of 1.225, 0.5, and 0.1 MHz

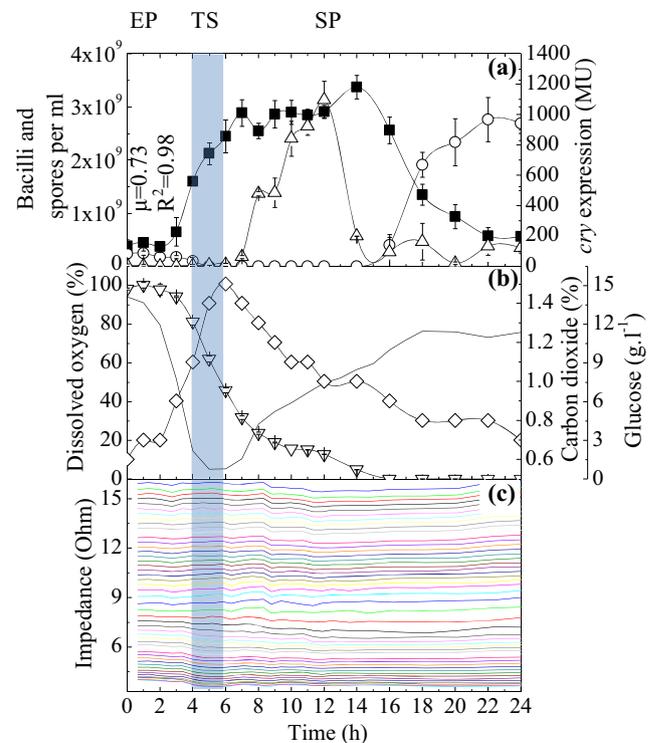
Figure 5 shows the time course for three batch cultures in Clean medium, monitoring at fixed frequencies of 1.225, 0.5, and 0.1 MHz in real time. Corresponding kinetic data are presented in Table 2, as well as those referring to the control fermentation. The period corresponding to the transition state as indicated by the growth rate and dissolved oxygen

techniques for each of the frequencies tested. Both data groups (dielectric and fermentation) that were correlated are from the same fermentation age or fermentation segments and were obtained individually. The correlations obtained were from the combination of data groupings

is shaded in the time courses. At 1.225 MHz, *Resistance* rapidly increased after 2.3 h and then decreased to a minimum of  $-5.94\Omega$  at 3.71 h; subsequently, there was an increase and decrease in their signal during the period corresponding to the transition phase onset at 4 h, indicating reduction in  $\mu$  (determined off-line) and oxygen consumption. Later (5.58 h), *Resistance* suddenly began to increase again and  $\beta$ -galactosidase from the reporter gene appeared, suggesting that sporulation onset had occurred. This increment was followed

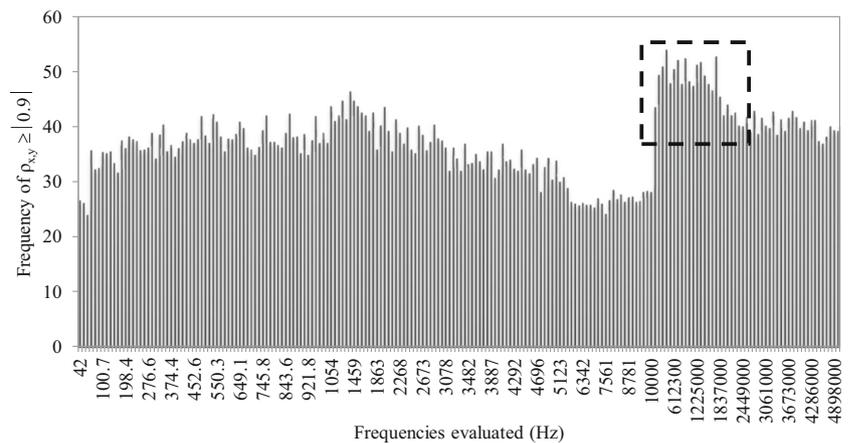


**Fig. 2** Time course of *B. thuringiensis* HD73 pHT1kAc in clean medium. Shaded area represents the transition phase, determined by conventional analysis. Fifty profiles of *Impedance* measured in the range of 42 Hz to 5 MHz, registering 25 fermentation times. The symbols in the figure are **a** bacilli (black square), spores (white circle), and *cry* expression (triangle); **b** CO<sub>2</sub> production profile (diamond), residual glucose (inverted triangle), DO (minus sign), and **c** *Impedance* (color lines)



**Fig. 3** Time course for *B. thuringiensis* HD73 pHT1kAc in Farrera medium. Shaded area is the transition phase determined by conventional analysis. Fifty profiles for *Impedance* measured within the range of 42 Hz to 5 MHz, registering 19 fermentation times. The symbols in the figure are **a** bacilli (black square), spores (white circle), and *cry* expression (triangle); **b** CO<sub>2</sub> production profile (diamond), residual glucose (inverted triangle), DO (minus sign), and **c** *Impedance* (color lines)

**Fig. 4** Frequency distribution for absolute values of correlations, higher or equal to 0.9. The frequencies evaluated were 200, from 42 to 5,000,000 Hz. The frequency range that best fitted the condition was from 300 kHz to 1.837 MHz. From these results, three frequencies were selected: 0.1, 0.5, and 1.225 MHz



by a small decrement in *Resistance* and then a linear increment, followed by a linear decrement. During this interval, the reporter gene was expressed, i.e., sporulation took place and after  $\beta$ -galactosidase activity was no longer detected and refracting spores appeared. This period fits with reports regarding the time (about 6–8 h) necessary to complete the sporulation phase in *B. subtilis* (Losick et al. 1986; Phillips and Strauch 2002). As spores were detected, *Resistance* remained constant. Also, *Reactance* time course resembled the bacteria life cycle at 1.225 MHz (Fig. 5). It reached a maximum during the exponential growth phase and a minimum in the transition phase, while remaining fairly constant during sporulation and decreasing as spores became visible and the spore count increased.

The bacterial concentration at 0 h in the batch culture monitored at 0.5 MHz was 45.6 % of the concentration in the batch at 1.225 MHz; the transition and stationary phases were delayed for 1 h (Table 2), and this delay was observed in the *Resistance* profile (Fig. 5 at 0.5 MHz). An important difference between these batches is that  $\beta$ -galactosidase activity was detected and spore concentration increased; likewise, *Resistance* increased and remained higher during this period than in the batch at 1.225 MHz. These facts suggest that dielectric profiles at this frequency make it possible to detect small on-line differences in the time courses between batches. In contrast, although the *Reactance* profile during the exponential phase at 0.5 MHz showed a similar profile to the batch at 1.225 MHz, the signal response was less evident during the remainder of the bacilli life cycle. In contrast, correlation between *Resistance* and *Reactance* profiles at 0.1 MHz and the life cycle of the bacteria were not as clear as those at 1.225 and 0.5 MHz.

In spite of the frequency applied (0.1, 0.5, and 1.225 MHz), the profiles of the dielectric parameters *Impedance*, *Phase angle*, *Conductance*, and *Voltage* were associated with the exponential phase, transition state, and sporulation phase (Fig. 5). Furthermore, *Impedance* and *Voltage* had a tendency

to decrease their signal value during exponential phase, with greater resemblance to a substrate consumption profile and were pronounced at 1.225 and 0.5 MHz. *Angle phase* and *Conductance* had a tendency to increase their signal with greater similarity to a characteristic growth curve and/or CO<sub>2</sub> production profile (Fig. 5).

From the analysis of kinetic parameters (Table 2), we noted slight differences between cultures. Specific growth rates at 1.225, 0.5, and 0.1 MHz experiments were the same and higher than in fermentation with no dielectric sensing. These values are in accordance with the range reported by other researchers from 0.4 to 1.9 h<sup>-1</sup> for *B. thuringiensis* (Avignone-Rossa and Mignone 1995; Rodriguez-Monroy and de la Torre 1996). Significant differences were found at the initial cellular counts between experiments ( $p < 0.5$ , one-way ANOVA test), although they had the same magnitude order. Cellular counts were similar for different experiments at  $\mu$  change and sporulation onset ( $p < 0.5$ , one-way ANOVA test). Cellular counts evaluated at 1.225 and 0.5 MHz were comparable for *Resistance* change but not for *Reactance*. The time of transition phase onset was the same for those with no impedance sensing and 0.5 MHz experiments (at 5 h), 1 h earlier in experiment at 1.225 MHz and 1 h later at 0.1 MHz. The time of sporulation phase onset in the experiment evaluated at 1.225 MHz was established 1 h earlier than for the rest of the experiments. Residual glucose concentration was considered not to constitute a limit in terms of changes in *Resistance* and *Reactance* at 1.225 and 0.5, or concerning the change in  $\mu$  (transition phase onset), in all experiments. Sporulation efficiency was considered acceptable for *B. thuringiensis* production. Notably, *cryIAc* gene expression evaluated as  $\beta$ -galactosidase activity was higher in the fermentation evaluated at 1.225 MHz, followed by the *cryIAc* expression between experiments at 0.5 and 0.1 MHz. Despite the fact of such differences between kinetic parameters obtained in described experiments, the dielectric properties used in this work, especially *Resistance* and *Reactance*, manifested more propitious behavior in relation to the exponential growth

**Table 2** Kinetic parameters obtained in batch cultures of *B. thuringiensis* pHHT1kAc in clean media without impedance measurement and monitored at 1.225, 0.5, and 0.1 MHz

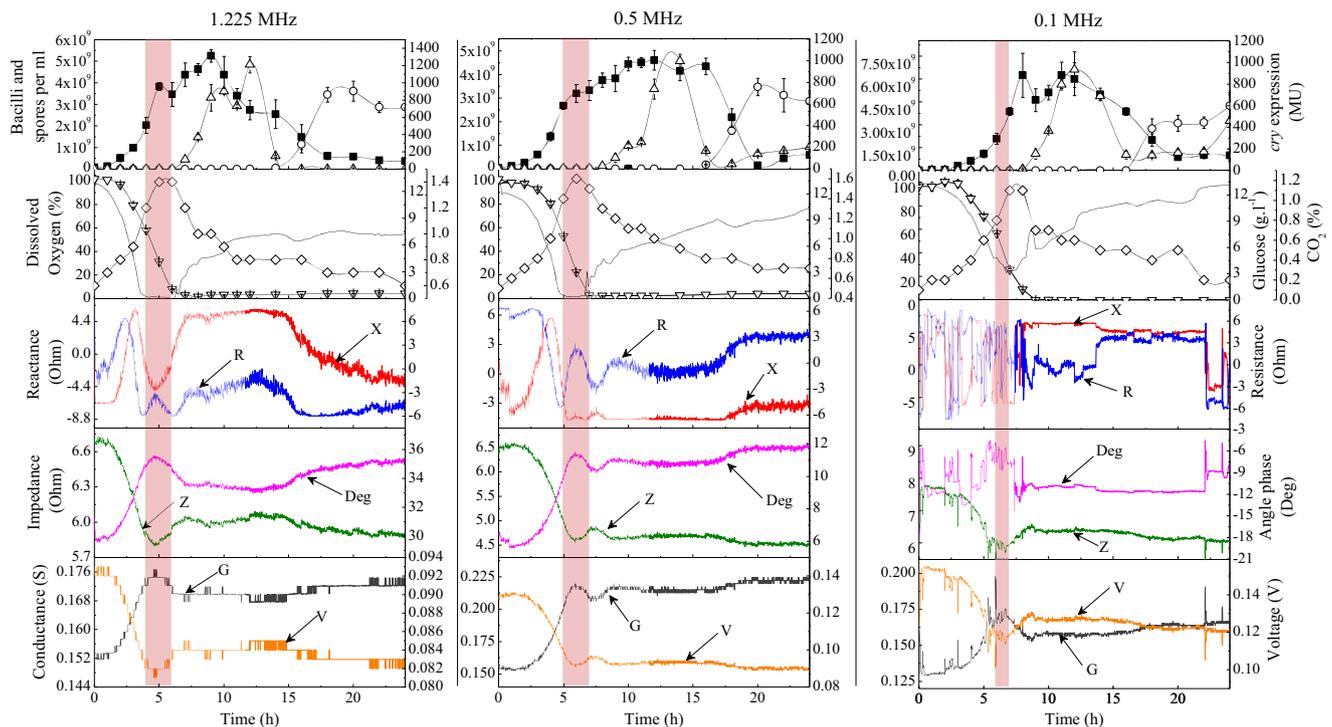
	No impedance measurement		
	Frequency (MHz)		
	1.225	0.5	0.1
$\mu^a$ ( $h^{-1}$ )	0.76 ( $R^2=0.93$ )	0.84 ( $R^2=0.98$ )	0.84 ( $R^2=0.98$ )
Bacilli counts ( $cell \cdot ml^{-1}$ )			
At time 0	$6.00 \times 10^7 (\pm 1.58 \times 10^7)$	$8.50 \times 10^7 (\pm 2.04 \times 10^7)$	$1.86 \times 10^7 (\pm 4.27 \times 10^6)$
At change in $\mu$	$2.16 \times 10^9 (\pm 3.79 \times 10^8)$	$2.04 \times 10^9 (\pm 3.66 \times 10^8)$	$2.08 \times 10^9 (\pm 3.59 \times 10^8)$
At time of sporulation phase onset	$3.58 \times 10^9 (\pm 4.27 \times 10^8)$	$3.48 \times 10^9 (\pm 5.61 \times 10^8)$	$3.88 \times 10^9 (\pm 2.50 \times 10^8)$
Resistance change <sup>c</sup>	NM	$5.13 \times 10^8 (\pm 1.65 \times 10^8)$	ND
Reactance change <sup>c</sup>	NM	$9.88 \times 10^8 (\pm 4.79 \times 10^7)$	ND
Time of transition state (h)	5	5	6
Time of sporulation phase (h)	7	7	7
Glucose at $\mu$ change ( $g \cdot l^{-1}$ )	7.67	7.70	7.61
Glucose at Resistance change <sup>c</sup> ( $g \cdot l^{-1}$ )	NM	12.7	ND
Glucose at Reactance change <sup>c</sup> ( $g \cdot l^{-1}$ )	NM	10.4	ND
Maximum $\beta$ -galactosidase activity (MU)	721 ( $\pm 2.9$ )	1210 ( $\pm 94$ )	935 ( $\pm 164$ )
Sporulation efficiency <sup>b</sup> (%)	80	82	100

ND not defined, NM not measured

<sup>a</sup> Values determined at the time of transition state onset

<sup>b</sup> Values calculated with the bacilli counts determined at the onset of sporulation phase and the final spore count

<sup>c</sup> Values determined at change during exponential phase



**Fig. 5** Time course for *B. thuringiensis* HD73 pHT1kAc batch cultures in clean medium monitored at 1.225, 0.5, and 0.1 MHz. Shaded area represents the transition phase, determined by conventional analysis. Data for dielectric properties were acquired every 60 s during the entire fermentation process. The symbols in the figure are bacilli (black square),

spores (white circle), and cry expression (triangle); CO<sub>2</sub> production profile (diamond), residual glucose (inverted triangle), DO (minus sign), and dielectric properties: Reactance (red line), Resistance (blue line), Impedance (green line), Angle phase (pink line), Conductance (gray line), and Voltage (orange line)

phase, transition state, sporulation phase, and spore release, due to particular changes in their signals.

## Discussion

Bacilli have the ability to undergo a cellular differentiation process leading to the formation of a spore that will germinate when growth-favoring conditions return. In order to cope with nutrient limitations, bacterial cells have to change their metabolism, therefore when the transition phase is settled up, sets of genes are turned off and others are turned on sequentially, and finally part of the bacterial population sporulates (Saujet et al. 2011). Additionally, as a population of quorum sensing bacteria grows, a proportional increase in the extracellular concentration of the signaling molecule occurs. When a threshold concentration is reached, the group detects the signaling molecule and responds to it with a population-wide alteration in gene expression (Bassler and Losick 2006). During vegetative growth, *B. thuringiensis* simultaneously consume glucose and amino acids (Farrera et al. 1998), Krebs cycle activity is almost null, and cells produce pyruvate, acetate, and lactate (Anderson 1990; Rowe 1990). During the transition phase, glycolysis flux is diminished, metabolites produced during vegetative growth are consumed,

Krebs and glyoxylate cycles are active (Aronson et al. 1975), and citrate and butyrate can be produced (López-López and de la Torre 2005). In sporulation phase, Krebs, glyoxylate, and  $\gamma$ -aminobutyric cycles are still active. All these changes may be detected by impedance spectroscopy (Michaelis et al. 2013).

In spite of the studies and applications of dielectric spectroscopy used for monitoring microorganisms, as mentioned in the “Introduction” section, information regarding cell differentiation in bacteria throughout dielectric spectroscopy is non-existent. In this study, we found that frequencies with a range of 0.3 to 1.8 MHz correlate with the changes associated with the cell differentiation process of *B. thuringiensis* (Table 1, Fig 4). Therefore, to compare dielectric parameters, we selected the fixed frequencies of 1.225, 0.5, and 0.1 MHz, the latter two have been reported in other dielectric studies (Benoit et al. 1998; Guan et al. 1998; Gou et al. 2011; Schwarzenberger et al. 2011). At these frequencies, there is no apparent damage to the cell (Sanchis 2009).

Frequency utilized at fixed value is an important fact for obtaining a better relationship between dielectric properties and growth phases (Fig. 5). Usually, capacitance change ( $\Delta C$ ) or relative permittivity ( $\epsilon$ ) have been used as indicators of biomass growth, at frequencies ranging from 0.5 to 3.0 MHz (Kiviharju et al. 2008). Interestingly, Sarrafzadeh

et al. (2005) reported in fed-batch cultures of *B. thuringiensis* that the transition state can be detected in real time by means of dielectric permittivity. The authors mentioned that in such transition state, vegetative cells stayed almost constant and sporulated cells begun to appear. In the present work, we do not detect spores in the transition state. It is worth mentioning that the transition state per se in the *Bacillus* genera is the moment when the cell reorganizes their metabolic and genetic efforts to prepare to cells for sporulation, and it has been suggested by several works in the topic (Sonenshein 2000; Phillips and Strauch 2002; Banse et al. 2008) that sporulated bacilli neither spores exist during transition state in batch cultures.

In other studies, the calculated normalized *Impedance* has been used to follow the cell differentiation process of mesenchymal stem cells (Hildebrandt et al. 2010; Park et al. 2011) and embryonic cancer stem cells (Öz et al. 2013). Other authors used the normalized values of *Resistance* to follow the cell differentiation of mesenchymal stem cells (Cho et al. 2009) and for monitoring cell culture of insects (Luong et al. 2001). In both normalized properties, the signal response tends to increase as a function of time. Normalized values refer to the *Impedance* or *Resistance* values of culture medium prior to inoculation, a measurement at a determined frequency or a measurement of a particular condition of the system. Our results showed that the *Impedance* profiles (raw data) tend to decrease (Figs. 2c and 5), indicating that in initial conditions, the *Impedance* of medium culture is higher and attributable to the nutrients only. As the process continues, cellular growth, nutrient consumption (glucose, oxygen, etc.), as well as production of metabolites such as organic acids (López-y-López and de la Torre 2005) and CO<sub>2</sub> facilitate electron transport by means of dielectric effect, so that the *Impedance* value decreases. *Impedance* changes have been related to growth and alterations to the physiological state of the cells during cultivation (Ehret et al. 1997; Felice et al. 1999; Valero et al. 2010; Pänke et al. 2011; Whulanza et al. 2011; Gou et al. 2011; Justice et al. 2011; Michaelis et al. 2013).

In a way inversely proportional to *Impedance*, *Conductance* indicates the ease with which a material conducts an electrical current that modify the media composition changing the ionic content and provoking a change in the media conductivity (Ramírez et al. 2009). This contribution is principally due to metabolic activity and secretion of metabolite, as well as the release of intracellular material during cell lysis (Matanguihan et al. 1994), and the movement of ions through the membrane (Justice et al. 2011). In this work, the increase in *Conductance* is evident during the exponential phase and transition state, but during the sporulation phase, it remains almost constant, showing a slight increment during the release of spores (Fig. 5). Therefore, we suggest that increase in *Conductance* correlates with the metabolic changes during each growth phase (mentioned above) and cell lysis of

*B. thuringiensis*. *Angle phase* is one of the clinically established dielectric parameters that indicate cellular health, cell membrane integrity, and cellular function in tissues and patients with different diseases, at a frequency of 50 kHz (Abad et al. 2011; Tanabe et al. 2012; Norman et al. 2012). There is no information regarding this dielectric property in the case of cell culture per se. However, *Angle phase* showed almost the same behavior as *Conductance*, and as frequency increases the signal value increases.

Interestingly, *Resistance* and *Reactance* at 1.225 and 0.5 MHz were the more suitable properties for monitoring changes related to the cell differentiation process, including events during exponential phase and transition state that were not elucidated using conventional techniques (Fig. 5). Electrical *Resistance* is the impediment to the flow of an electric current through a component consisting of a circuit, a medium, or a substance (Cammack et al. 2006), whereas *Reactance* is the non-resistive component of *Impedance* in an AC circuit, arising from the effect of inductance or capacitance or both, and causing the current to be out of phase with the electromotive force that causes it (Cammack et al. 2006). The changes in *Resistance* and *Reactance* profiles during exponential growth may suggest the triggering of cellular events that cannot be elucidated through conventional analysis techniques but must be taking place because of the onset of *B. thuringiensis* growth in batch cultures, as these events depend on the increased number of biochemical reactions and genetic responses that may include synthesis of genetic, signaling, metabolic, and structural molecules of cells, some of them independent of growth per se, but related to the programmed cell cycle of *B. thuringiensis*, indicating an easier electron transport in both culture medium and within the cells. Biochemical reactions within the cells can provoke high ionic activity throughout the cellular membrane, causing a reduction in *Resistance* and *Reactance* profiles due to easier transport of electrons (Luong et al. 2001; November and Van Impe 2002; Bonmassar et al. 2010; Pänke et al. 2011). Besides metabolic changes, one example of the possible explanations for changes in *Reactance* and *Resistance* during the exponential growth from a genetic regulation point of view is the effect of the transition state regulator, AbrB. Some reports indicate that maximal expression of AbrB occurred during early exponential growth phase in *B. subtilis* (Fürbaß et al. 1991; O'Reilly and Devine 1997) and in *B. thuringiensis* (Lozano et al. 2014). The AbrB protein is involved in preventing inappropriate gene expression in actively growing cells and during the transition phase reorganizes the expression of more than 100 post-exponential genes with different biological functions, including biofilm formation, transport functions, antibiotic production, motility, development of competence for DNA uptake, synthesis of extracellular and degradative enzymes, and sporulation (Strauch and Hoch 1993; Lazazzera

2000; Chumsakul et al. 2011). Therefore, AbrB has an impact on the cell differentiation process of *B. thuringiensis*.

The negative values registered for *Resistance* and *Reactance* in experiments at fixed frequencies mean that cells are in an active network, and this does not imply biological system instability (Conciauro and Puglisi 1981). Hence, an analysis of the dielectric data obtained for the negative slope region makes it possible to establish the value of the external resistance of the measure device, at which oscillations are being generated and to estimate frequencies for these oscillations. Survila and Mockus (1999) mentioned that the negative values are related to the potential-dependent adsorption of the process involved in the system. Therefore, we suggest that the oscillations showed in Fig. 5 refer to high ion transfer through the membrane of bacilli for reduction in *Resistance* and *Reactance*, whereas increase values indicate a minus ion transfer due to metabolic reactions and genetic efforts depending of the exponential phase and transition state, which become constant during the sporulation phase. This indicates that the dielectric profile of *Resistance* and *Reactance* makes it possible to relate the different growth stages of the cell.

Identifying the moment when the cell differentiation process initiates is crucial and decisive to obtaining optimum results quickly in different studies at the cellular level for different organisms, as well as for many applications where it has practical consequences and which are important for many human interests. In our case, our principal interest was to observe the profile changes related to the cellular differentiation process, but further studies are required to further investigate the dielectric values obtained, therefore a robust on-line monitoring application of this technique must be developed. This study demonstrates that dielectric spectroscopy can be used for time-continuous, label-free monitoring of cellular events in the cell cycle, including the cell differentiation process in *B. thuringiensis*. *Resistance* and *Reactance* may represent useful properties for identifying minimal changes in real time and in situ, in relation to the cell differentiation process, as well as concerning the initiation of a cellular event that is not possible to evaluate using conventional techniques.

**Acknowledgments** The authors gratefully acknowledge the financial support of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Mexico) grant 83057 and 103991 Dinorín Téllez Girón J fellowship. David Flores Rojas and Juan Sánchez Labrada from Pilot Plant of Fermentations from CINVESTAV-IPN for technical assistance.

**Conflict of interest** The authors have no conflict of interest.

## References

- Abad S, Sotomayor G, Vega A, Pérez de José A, Verdalles U, Jofré R, López-Gómez JM (2011) El ángulo de fase de la impedancia eléctrica es un predictor de supervivencia a largo plazo en pacientes en diálisis. *Nefrología* 31(6):670–676. doi:10.3265/Nefrologia.pre2011.Sep.10999
- Agaisse H, Lereclus D (1994) Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the *cryIIIA* toxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol* 13:97–107
- Agaisse H, Lereclus D (1995) How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J Bacteriol* 177(21):6027–6032
- Anderson TB (1990) Effects of carbon:nitrogen ratio and oxygen on the growth kinetics of *Bacillus thuringiensis* and yield of bioinsecticidal crystal protein. MSc. thesis, University of Western Ontario London, Ontario
- Aronson A (2002) Sporulation and  $\delta$ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cell Mol Life Sci* 59:417–425
- Aronson JN, Borris DP, Doerner JF, Akers E (1975) Gamma-aminobutyric acid pathway and modified tricarboxylic acid cycle activity during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Microbiol* 30:489–492
- Avignone-Rossa C, Mignone CF (1995) *Bacillus thuringiensis* growth and toxicity. Basic and applied considerations. *Mol Biotechnol* 4(1):55–71
- Bagnaninchi PO, Drummond N (2011) Real-time label-free monitoring of adipose-derived stem cell differentiation with electric cell-substrate impedance sensing. *PNAS* 108:6462–6467
- Banse AV, Chastanet A, Ranh-Lee L, Hobbs EC, Losick R (2008) Parallel pathways of repression and antirepression governing the transition to stationary phase in *Bacillus subtilis*. *PNAS* 105:15547–15552
- Barák I, Wilkinson AJ (2005) Where asymmetry in gene expression originate. *Mol Microbiol* 57(3):611–620
- Bassler BL, Losick R (2006) Bacterially speaking. *Cell* 125. doi: 10.1016/j.cell.2006.04.001
- Bejerano-Sagie M, Oppenheimer-Shaanan Y, Berlatzky I, Rouvinski A, Meyerovich M, Ben-Yehuda S (2006) A checkpoint protein that scans the chromosome for damage at the start of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Cell* 125(4):679–690
- Benoit E, Guellil A, Block JC, Bessière J (1998) Dielectric permittivity measurement of hydrophilic and hydrophobic bacterial suspensions: a comparison with the octane adhesion test. *J Microbiol Methods* 32: 205–211
- Boniolo FS, Rodrigues RC, Prata AM, López ML, Jacinto T, da Silveira MM, Berbert-Molina MA (2012) Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentations: bringing new insights on their impact on sporulation and  $\delta$ -endotoxin production. *Appl Microbiol Biotechnol* 3:625–636. doi:10.1007/s00253-011-3746-9
- Bonmassar G, Iwaki S, Goldmakher G, Angelone LM, Belliveau JW, Lev MH (2010) On the measurement of electrical impedance spectroscopy (EIS) of the human head. *Int J Bioelectromagn* 12(1):32–46
- Bravo A, Quintero R, Díaz C, Martínez A, Soberón M (1993) Efficiency of insecticidal crystal protein production in a *Bacillus thuringiensis* mutant with derepressed expression of the terminal oxidase aa<sub>3</sub> during sporulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 39:558–562
- Bravo A, Likitvivanavong S, Gill S, Soberón M (2011) *Bacillus thuringiensis*: a story of successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol* 41(7):423–431. doi:10.1016/j.ibmb.2011.02.006
- Cammack R, Attwood TK, Campbell PN, Parish JH, Smith AD, Stirling JL, Vella F (2006) The Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology, 2nd edn. Oxford, Oxford University Press, p 720
- Cho S, Gorjup E, Thielecke H (2009) Chip-based time-continuous monitoring of toxic effects on stem cell differentiation. *Ann Anat* 191(1): 145–152. doi:10.1016/j.aanat.2008.08.005
- Chumsakul O, Takahashi H, Oshima T, Hishimoto T, Kanaya S, Ogasawara N, Ishikawa S (2011) Genome-wide binding profiles of the *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB and its homolog Abh reveals their interactive role in transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res* 39:414–428

- Conciauro G, Puglisi M (1981) Meaning of the negative impedance. BNL-51420
- Deák T, Beuchat LR (1993) Comparison of conductimetric and traditional plating techniques for detecting yeast in fruit juices. *J Appl Bacteriol* 75:546–550
- Dézenclos T, Ascon-Cabrera M, Ascon D, Lebeault JM, Pauss A (1994) Optimisation of the indirect impedancemetry technique; a handy technique for microbial growth measurement. *Appl Microbiol Biotechnol* 42:232–238
- Ehret R, Baumann W, Brischwein M, Schwinde A, Stegbauer K, Wolf B (1997) Monitoring of cellular behaviour by impedance measurements on interdigitated electrode structures. *Biosens Bioelectron* 12(1):28–41
- Errington J (2003) Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol* 1:117–126
- Farrera RR, Pérez-Guevara F, de la Torre M (1998) Carbon:Nitrogen ratio with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:758–765
- Felice CJ, Madrid RE, Olivera JM, Rotger VI, Valentinuzzi ME (1999) Impedance microbiology: quantification of bacterial content in milk by means of capacitance growth curves. *J Microbiol Methods* 35(1):37–42
- Flores ER, Perez F, de la Torre M (1997) Scale-up of *Bacillus thuringiensis* fermentation based on oxygen transfer. *J Ferm Bioeng* 83:561–564
- Frankenhuyzen K (2009) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J Invertebr Pathol* 101(1):1–16. doi:10.1016/j.jip.2009.02.009
- Fürbaß R, Gocht M, Zuber P, Marahiel A (1991) Interaction of AbrB, a transcriptional regulator from *Bacillus subtilis* with the promoters of the transition state-activated genes *tycA* and *spoVG*. *Mol Gen Genet* 225:347–354
- Gheorghiu E (1996) Measuring living cells using dielectric spectroscopy. *Bioelectrochem Bioenerg* 40(2):133–139
- Gibson DM, Coombes PC, Pimbley DW (1992) Automated conductance method for the detection of *Salmonella* in foods: collaborative study. *J AOAC Int* 75(2):293–302
- Gou HL, Zhang XB, Bao N, Xu JJ, Xia XH, Chen HY (2011) Label-free electrical discrimination of cells at normal, apoptotic and necrotic status with a microfluidic device. *J Chromatogr A* 1218(33):5725–5729. doi:10.1016/j.chroma.2011.06.102
- Grimnes S, Martinsen OG (2000) Bioimpedance and bioelectricity basics. Academic, London. ISBN 0-12-303260-1
- Guan Y, Evans PM, Kemp RB (1998) Specific heat flow rate: an on-line monitor and potential control variable of specific metabolic rate in animal cell culture that combines microcalorimetry with dielectric spectroscopy. *Biotechnol Bioeng* 58(5):464–477
- Hilbert DW, Piggot PJ (2004) Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:234–262
- Hildebrandt C, Büth H, Cho S, Impidjati, Thielecke H (2010) Detection of the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in 2D and 3D cultures by electrochemical impedance spectroscopy. *J Biotechnol* 148(1):83–90. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.01.007
- Hunt RW, Zavalin A, Bhatnagar A, Chinnasamy S, Das KC (2009) Review electromagnetic biostimulation of living cultures for biotechnology, biofuel and bioenergy applications. *Int J Mol Sci* 10:4515–4558. doi:10.3390/ijms10104515
- Iber D, Clarkson J, Yudkin MD, Campbell ID (2006) The mechanism of cell differentiation in *Bacillus subtilis*. *Nature*. doi:10.1038/nature04666
- Jenal U, Stephens C (1996) Bacterial differentiation: sizing up sporulation. *Curr Biol* 6(2):111–114
- Justice C, Brix A, Kraume M, Freimark D, Pfromm P, Eichenmueller B, Czermak P (2011) Process control in cell culture technology using dielectric spectroscopy. *Biotechnol Adv* 29(4):391–401
- Kiviharju K, Salonen K, Moilanen U, Eerikäinen T (2008) Biomass measurement online: the performance of in situ measurements and software sensors. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:657–665
- Lazazzera BA (2000) Quorum sensing and starvation: signals for entry into the stationary phase. *Curr Opin Microbiol* 3:177–182
- López-y-López VE, de la Torre M (2005) Redirection of metabolism during nutrient feeding in fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:254–260
- Losick R, Youngman P, Piggot PJ (1986) Genetics of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet* 20:625–669
- Lozano AM, Dinorín J, Jiménez FE, Hidalgo-Lara ME, López y López VE (2014) Behavior of transition state regulator AbrB in batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Curr Microbiol*. doi:10.1007/s00284-014-0650-4
- Luong JHT, Habibi-Rezaei M, Meghrouh J, Xiao C, Male KB, Kamen A (2001) Monitoring motility, spreading, and mortality of adherent insect cells using an impedance sensor. *Anal Chem* 73:1844–1848
- Mangwani N, Dash HR, Chauhan A, Das S (2012) Bacterial quorum sensing: functional features and potential applications in biotechnology. *J Mol Microbiol Biotechnol* 22(4):215–227. doi:10.1159/000341847
- Markx GH, Kell DB (1990) Dielectric spectroscopy as a tool for the measurement of the formation of biofilms and of their removal by electrolytic cleaning pulses and biocides. *Biofouling* 2:211–227. doi:10.1080/08927019009378146
- Matanguihan RM, Konstantinov KB, Yoshida T (1994) Dielectric measurement to monitor the growth and the physiological states of biological cells. *Bioprocess Eng* 11(6):213–222
- Michaelis S, Wegener J, Robelek R (2013) Label-free monitoring of cell-based assays: combining impedance analysis with SPR for multiparametric cell profiling. *Biosens Bioelectron* 49:63–70. doi:10.1016/j.bios.2013.04.042
- Moran CP (2002) Endospore formation in *Bacillus subtilis*. In: Streips UN, Yasbin RE (eds) *Modern microbial genetics*, 2nd edn. Wiley, New York. doi:10.1002/047122197X.ch11
- Morgan H, Sun T, Holmes D, Gawad S, Green NG (2007) Single cell dielectric spectroscopy. *J Phys D Appl Phys* 40:61. doi:10.1088/0022-3727/40/1/S10
- Navarro AK, Farrera RR, López R, Pérez-Guevara F (2006) Relationship between poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production and  $\delta$ -endotoxin for *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biotechnol Lett* 28:641–644
- Norman K, Stobäus N, Pirlich M, Boser-Westphal A (2012) Bioelectrical phase angle and impedance vector analysis—clinical relevance and applicability of impedance parameters. *Clin Nutr*. doi:10.1016/j.clnu.2012.05.008
- November EJ, Van Impe JF (2002) The tuning of a model-based estimator for the specific growth rate of *Candida utilis*. *Bioprocess Biosyst Eng* 25:1–12
- O'Reilly M, Devine KM (1997) Expression of AbrB, a transition state regulator from *Bacillus subtilis*, is growth phase dependent in a manner resembling that of Fis, the nucleoid binding protein from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179:522–529
- Owens JD, Konírová L, Thomas DS (1992) Causes of conductance change in yeast cultures. *J Appl Bacteriol* 72(1):32–38
- Öz S, Maercker C, Breiling A (2013) Embryonic carcinoma cells show specific dielectric resistance profiles during induced differentiation. *PLoS One* 8(3):e59895. doi:10.1371/journal.pone.0059895
- Pänke O, Weigel W, Schmidt S, Steude A, Robitzki AA (2011) A cell-based impedance assay for monitoring transient receptor potential (TRP) ion channel activity. *Biosens Bioelectron* 26(5):2376–2382. doi:10.1016/j.bios.2010.10.015
- Park HE, Kim D, Koh HS, Cho S, Sung JS, Kim JY (2011) Real-time monitoring of neural differentiation of human mesenchymal stem

- cells by electric cell-substrate impedance sensing. *J Biomed Biotechnol*. doi:10.1155/2011/485173
- Phillips ZEV, Strauch MA (2002) *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cell Mol Life Sci* 59:392–402
- Ramírez N, Regueiro A, Arias O, Contreras R (2009) Espectroscopía de impedancia electroquímica, herramienta eficaz para el diagnóstico rápido microbiológico. *Biotechnol Apl* 26:65–71
- Rodríguez-Monroy M, de la Torre M (1996) Effect of the dilution rate on the biomass yield of *Bacillus thuringiensis* and determination of its rate coefficients under steady-state conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 47:546–550
- Rowe GE (1990) Central metabolism of *Bacillus thuringiensis* during growth and sporulation. PhD thesis in The Univeristy of Western Ontario London Ontario
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp 16.66–16.67
- Sanchis A (2009) Aplicación de la dieléctroforesis a la caracterización dieléctrica de células. Dissertation, Universidad Complutense De Madrid. Facultad De Ciencias Físicas. Departamento de Física Aplicada III. ISBN: 978-84-692-0106-0
- Sarrafzadeh MH, Belloy L, Esteban G, Navarro JM, Ghommidh C (2005) Dielectric monitoring of growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol Lett* 27(7):511–517
- Saujet L, Monot M, Dupuy B, Soutourina O (2011) The key sigma factor of transition phase, SigH, controls sporulation, metabolism, and virulence factor expression in *Clostridium difficile*. *J Bacteriol* 193(13): 3186. doi:10.1128/JB.00272-11
- 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. *Microbiol Mol Biol Rev* 62(3):775–806
- Schwan HP, Takashima S (1991) Dielectric behavior of biological cells and membranes. *Bull Inst Chem Res Kyoto Univ* 69(4):419–475
- Schwarzenberger T, Wolf P, Brischwein M, Kleinhans R, Demmel F, Lechner A, Becker B, Wolf B (2011) Impedance sensor technology for cell-based assays in the framework of a high-content screening system. *Physiol Meas* 32(7):977–993. doi:10.1088/0967-3334/32/7/S18
- Sierra-Martínez P, Ibarra JE, de la Torre M, Olmedo G (2004) Endospore degradation in an oligosporogenic, crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Curr Microbiol* 48:153–158
- Silley P, Forsythe S (1996) Impedance microbiology: a rapid change for microbiologists. *J Appl Bacteriol* 80:233–243
- Soberón M, Fernández LE, Pérez C, Gill SS, Bravo A (2007) Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicon* 49(5):597–600
- Sonenshein AL (2000) Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol* 3(6):561–566
- Strauch MA, Hoch JA (1993) Transition-state regulators: sentinels of *Bacillus subtilis* post-exponential gene expression. *Mol Microbiol* 7:337–342
- Survila A, Mockus Z (1999) Current oscillations and a negative impedance observed during copper and tin codeposition from solutions involving Laprol 2402C as a surface-active substance. *Electrochim Acta* 44:1707–1712
- Swaminathan B, Feng P (1994) Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 48:401–426
- Tanabe RF, de Azevedo ZM, Fonseca VM, Peixoto MV, dos Anjos LA, Gaspar-Elsas MI, Moore DC, Ramos EG (2012) Distribution of bioelectrical impedance vector values in multi-ethnic infants and pre-school children. *Clin Nutr* 31(1):144–148. doi:10.1016/j.clnu.2011.08.006
- Timms S, Colquhoun KO, Fricker CR (1996) Detection of *Escherichia coli* in potable water using indirect impedance technology. *J Microbiol Methods* 26:125–132
- 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):1–12. doi:10.1016/j.jip.2012.05.001
- Valero T, Moschopoulou G, Kintzios S, Hauptmann P, Naumann M, Jacobs T (2010) Studies on neuronal differentiation and signalling processes with a novel impedimetric biosensor. *Biosens Bioelectron* 26:1407–1413
- Whulanza Y, Ucciferri N, Domenici C, Vozzi G, Ahluwalia A (2011) Sensing scaffolds to monitor cellular activity using impedance measurements. *Biosens Bioelectron* 26(7):3303–3308. doi:10.1016/j.bios.2011.01.002