DETECCIÓN Y EVALUACIÓN DE b-EXOTOXINA EN CEPAS NATIVAS DE BACILLUS THURINGIENSIS

Yamilé Baró y Eleazar Botta

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no.514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, c.e.: mmarquez@inisav.cu

RESUMEN

Con el fin de detectar la presencia de la b-exotoxina en cepas nativas de Bacillus thuringiensis *por medio de la técnica de precipitación con solventes orgánicos, se estudiaron nueve cepas pertenecientes a la colección del INISAV. Mediante análisis químico se determinó la presencia de una exotoxina termoestable en los medios de cultivo caldo triptona-soya y Conner-Hansen. En el primero se obtuvieron los mayores valores de densidad óptica a 260 nm, lo cual se atribuye a la mayor producción de este metabolito. En el ensayo biológico sobre* Tetranychus tumidus*, los niveles de mortalidad obtenidos con la exotoxina purificada fueron bajos y no se observó ningún efecto sobre la ovoposición; en cambio, los sobrenadantes del cultivo de estas mismas cepas presentaron niveles de mortalidad a partir de las 24 horas.*

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis, b-exotoxina, exotoxina termoestable, ensayo biológico*

ABSTRACT

An organic solvent precipitation was used for heat stable exotoxin detection in subspecies of Bacillus thuringiensis**.** *Nine native strains from Plant Health Research Institute collection were tested. Tripticase soy broth and Conner and Hansen media cultures were used for microorganism reproduction. High values of optical absortion at 260 nm were obtain with tripticase soy broth media which suggest the higher production of the exotoxin. The supernatant fluids of these strains produce high mortality levels against adult female of* Tetranychus tumidus *since 24 hours. Nevertheless it was observed low mortality levels and any laid eggs with the exotoxin purified.*

Key words: *Bacillus thuringiensis, b-exotoxin, heat stable exotoxin, bioassay*

INTRODUCCIÓN

B*acillus thuringiensis* es un microorganismo entomopatógeno que se caracteriza por producir diversas toxinas. Entre las más importantes por sus propiedades biológicas se consideran las denominadas *d-endotoxinas* y las b-*exotoxinas*. Estas últimas, también conocidas como *thuringiensin*, *exotoxina termoestable* o *factor mosca*, es un compuesto termoestable de naturaleza nucleotídica de bajo peso molecular (701 Da) que se secreta al medio de fermentación al inicio de la fase de esporulación. Este compuesto es tóxico a larvas de una amplia variedad de especies de invertebrados, por lo cual aquellos aislados que las producen resultan de gran interés práctico. La producción de la toxina se ha atribuido a las cepas pertenecientes a los serotipos H1, H4, H7, H9, H10 y H14.

Aun cuando se les atribuyen a estas toxinas algún efecto genotóxico, su estudio ha despertado el interés de numerosos investigadores, pues consideran que no todas tienen iguales características [Glare y Callaghan, 2000]. Existen diversos métodos de detección para este compuesto; sin embargo, son laboriosos y caros como es el empleo de la técnica de HPLC, más comúnmente utilizada para su detección y cuantificación. Este hecho ha generado la necesidad de encontrar y aplicar métodos sencillos de detección de la toxina, lo cual sería de gran utilidad en los programas de caracterización de cepas de *B. thuringiensis*, así como para el registro de cepas de importancia comercial. El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia de b-exotoxina en cepas nativas de *B. thuringiensis* con el empleo de la precipitación con solventes orgánicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico: Se emplearon nueve cepas de *Bacillus thuringiensis* pertenecientes a la colección del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, las cuales fueron seleccionadas acorde con su serotipo flagelar y a la actividad biológica exhibida en el sobrenadante esterilizado a 121°C. Se utilizó además la cepa HD1 estándar internacional de *B. thuringiensis* como control negativo (*Tabla 1*).

Crecimiento de las cepas: Las cepas de *B. thuringiensis* se pusieron a crecer a 28 ± 2°C y 140 rpm en el medio de cultivo caldo triptona-soya y en el medio de Conner y Hansen. El tiempo de incubación se determinó por observación directa al microscopio, como el que se inicia la fase de esporulación del microorganismo.

Tabla 1. Cepas de *Bacillus thuringiensis* empleadas en el estudio

Cepas	Serotipo
LBt-4	*kenyae (H4)*
LBt-5	*thuringiensis (H1)*
LBt-7	*kenyae (H4)*
LBt-9	*thuringiensis (H1)*
LBt-12	*thuringiensis (H1)*
LBt-13	*no determinado*
LBt-16	*thuringiensis (H1)*
LBt-25	*no determinado*
LBt-47	*no determinado*
HD1	*kurstaki*

Obtención de la exotoxina: Transcurrido el tiempo de cultivo del microorganismo, este fue centrifugado a 10 000 rpm durante 30 minutos en centrífuga refrigerada. El sobrenadante obtenido se esterilizó a 120°C durante15 minutos y se filtró a través de membranas Millipore (Whatman) de 0,2 mm. Las muestras obtenidas se guardaron a –20°C hasta su uso.

Precipitación con solventes orgánicos: Para la precipitación con solventes se tomaron 0,2 mL de las muestras a las cuales se les adicionó acetona hasta una concentración final del 90%; se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron a 10 000 rpm. Los *pellets* resultantes se disolvieron en 0,2 mL de agua destilada y se adicionó acetonitrilo hasta una concentración del 40%. Las muestras se centrifugaron nuevamente a 10 000 rpm por 15 minutos y posteriormente la concentración de acetonitrilo del sobrenadante se llevó hasta un 90%. Se colectaron los precipitados por centrifugación en las mismas condiciones, y se solubilizaron en 1,5 mL de agua destilada para el análisis espectrofotométrico y para el bioensayo sobre *Tetranychus tumidus* [Gohar and Perchat, 2001].

Análisis espectrofotométrico: Se realizaron lecturas de absorbancia a 260 y a 230 nm.

Ensayo biológico: Se evaluó el efecto sobre la mortalidad y la ovoposición en 10 hembras adultas fecundadas de *Tetranychus tumidus,* con la exotoxina purificada y con el sobrenadante del cultivo esterilizado y filtrado. El experimento se evaluó a los siete y los 14 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La *Tabla 2* muestra los valores de absorbancia obtenidos en las cepas de *B. thuringiensis* en los medios de cultivos evaluados. Las cepas LBT-4, LBT-5, LBT-7, LBT-13 y LBT-47 mostraron los mayores valores de absorción a la longitud de onda característica reportada para la b-exotoxina, en el medio de cultivo caldo triptona soya, con respecto al resto de las cepas y a la cepa HD1 (estándar internacional de *B. thuringiensis,* perteneciente al serotipo H3, variedad *kurstaki*), conocida por no presentar esta exotoxina.

Tabla 2. Lecturas de absorbancia de las cepas en estudio a 260 y 230 nm

Cepas	260 nm	230 nm	260 nm	230 nm
	Caldo triptona soya		Conner y Hansen	
LBT-4	*1,342*	0,059	0,139	0,029
LBT-5	*2,092*	0,130	*0,324*	0,030
LBT-7	*1,802*	0,063	*0,333*	0,016
LBT-9	0,531	0,068	0.165	0,027
LBT-12	0,515	0,096	0.186	0,016
LBT-13	*2,163*	0,253	*0,309*	0,021
LBT-16	0,538	0,082	0.202	0,080
LBT-47	*2,273*	0,043	*0,339*	0,045
HD1	0,024	0,036	0,021	0,035

El hecho de que la b-exotoxina sea un análogo nucleotídico de ADN permite su recuperación en solventes orgánicos, basado en la pobre solubilidad de los nucleótidos en este tipo de solventes. Gohar y Perchat (2001) emplearon este mismo método para determinar la producción de b-exotoxina en 300 cepas de *B. thuringiensis.* Con este estudio los autores citados obtuvieron un 80% de recobrado de la toxina, y al combinar, en un paso posterior, la cromatografía en columna o HPLC, lograron una buena separación. La precipitación de b-exotoxina con etanol, sin el subsiguiente paso cromatográfico, fue utilizada por Galán y Arévalo en 1996, aunque obtuvieron rendimientos menores.

Las cepas evaluadas presentan serotipos que están informados en la literatura como productores de la b-exotoxina; sin embargo, no se obtuvieron altos valores de absorbancia a 260 nm en cada una de ellas, lo cual implicaría la no presencia de la toxina en estas cepas. Aunque los estudios que relacionan la producción de la b-exotoxina y el tipo

de serovar que presenta la cepa de *B. thuringiensis* son muy escasos, y en la mayoría de ellos se incluyen muy pocas cepas, algunos autores plantean que la producción de exotoxina está limitada a los serotipos flagelares *thuringiensis, kenyae, galleriae, aizawai, morrisoni, darmstadiensis, toumanoffi* y *thompsoni* (serotipos H1, H4ac, H5ab, H7, H8ab, H10, H11ab y H12) respectivamente [Galán y Arévalo, 1996; Glare y Callaghan, 2000].

Los resultados en este trabajo coinciden con los obtenidos por otros autores, quienes han mostrado que la producción de la exotoxina termoestable es más una propiedad específica de la cepa de *B. thuringiensis* que una propiedad serotipo específica. Se ha probado además que su presencia en una cepa en particular no implica la producción de la exotoxina por otras cepas pertenecientes al mismo serovar [Ohba *et al*., 1981; Levinson *et al*., 1990; Hernández *et al*., 2001].

Hernández *et al*. (2001) analizaron 100 cepas de *B. thuringiensis* pertenecientes a diferentes serotipos (*thuringiensis, kurstaki, aizawai, kenyae* y *morrisoni)*, con el objetivo de establecer una posible relación entre la producción de exotoxina tipo I y el tipo de serovar, al cual pertenece la cepa. El 79% de las cepas del serotipo *thuringiensis* y el 20% de las pertenecientes al serotipo *kenyae* produjeron b-exotoxina tipo I. En el presente estudio dos de las cepas que mostraron mayores valores de absorbancia pertenecen al serotipo *kenyae* (LBT-4, LBT-7), una de ellas al serotipo *thuringiensis* (LBT-5) y las dos cepas restantes LBT-13 y LBT-47; sin embargo, no ha sido posible determinarles el serovar al que pertenecen. La clasificación de las cepas de *B. thuringiensis* en serovares fue desarrollada sobre la base de los antígenos flagelares. Las bases genéticas y bioquímicas de este sistema aún son desconocidas. Esto hace especialmente difícil encontrar una relación directa entre los genes determinantes del serovar y otros genes en *B. thuringiensis* como los que determinan la síntesis de b-exotoxina [Hernández *et al*., 2003]. Los resultados de la mortalidad de *T. tumidus* se muestran en la *Tabla 3.*

Tabla 3. Mortalidad alcanzada con la exotoxina purificada y los sobrenadantes del cultivo de *B. thuringiensis* en el medio caldo triptona soya sobre *T. tumidus*

Cepas	Mortalidad sobre *Tetranychus tumidus (%)*		
	Exotoxina purificada	Sobrenadantes del cultivo	
	7 días	7 días	14 días
LBT-4	21,45	58,92	72,23
LBT-5	26,10	39,28	88,48
LBT-7	21,45	25,89	*61,68*
LBT-9	16,15	*66,07*	87,5
LBT-12	21,45	41,07	*64,45*
LBT-13	26,10	*87,50*	92,5
LBT-16	33,60	54,46	84,03
LBT-47	*39,41*	*52,67*	*76,25*

Los niveles de mortalidad obtenidos con la exotoxina purificada fueron bajos, en cambio los sobrenadantes del cultivo de estas mismas cepas presentaron niveles de mortalidad a partir de las 24 horas. La cepa LBT-13 presentó un 87,5% de mortalidad a los siete días, seguida de la cepa LBT-9 con un 66,07%. Los resultados en la ovoposición no mostraron ningún efecto al evaluar la exotoxina purificada; sin embargo, el sobrenadante de las cepas LBT-4, LBT-5, LBT-12, LBT-13, LBT-16 y LBT-47 provocaron reducciones drásticas en la puesta de huevos, donde la de mejor comportamiento fue la cepa LBT-12.

En estudios previos realizados por Márquez *et al.* (1999) se ha visto la acción acaricida del sobrenadante esterilizado de la cepa LBT-13 de *B. thuringiensis,* lo cual se ha atribuido a la presencia de la exotoxina termoestable en este cultivo. Esta cepa es estable y provoca síntomas muy típicos propios de un aislado de *B. thuringiensis* que contiene b-exotoxina, aunque no se descarta el efecto combinado con la d-endotoxina.

Mundialmente se conocen algunas cepas de *B. thuringiensis* que presentan acción acaricida, y en la mayoría de los casos esto guarda relación con la producción de b-exotoxina [Krieg, 1986; Hay and Ling, 1987; Calberg, 1973]. Se ha demostrado además que los huevos de estos organismos son inhibidos por esta toxina [Ignoffo, 1992]. Royalty *et al.* en 1990 sugirieron que con altas dosis de esta toxina se puede originar la muerte de insectos susceptibles, mientras que a bajas concentraciones se obtienen descendientes morfológicamente anormales. También se ha observado una reducción de la fecundidad en algunos insectos y ácaros tratados, así como inhibición de la alimentación [Ignoffo y Drovkin, 1977]. Ade-

más, todas ellas han resultado tóxicas contra el nematodo *Meloidogyne incognita* tanto *in vitro* como *in vivo* [Márquez, 2003]. Los resultados en este trabajo concuerdan con los encontrados anteriormente; sin embargo, no se obtuvo respuesta con la exotoxina purificada, lo que puede estar dado por niveles de concentración bajos en la solución.

CONCLUSIONES

- Las cepas LBT-4, LBT-5, LBT-7, LBT-13 y LBT-47 mostraron valores de absorbancia mayores que el resto de las cepas en el medio caldo triptona soya a la longitud de onda característica reportada para la b-exotoxina.
- La exotoxina purificada mostró niveles de mortalidad bajos contra *Tetranychus tumidus*.
- Los sobrenadantes esterilizados de los cultivos de las cepas LBT-4, LBT-5, LBT-7, LBT-9, LBT-12, LBT-13, LBT-16 y LBT-47 mostraron niveles de mortalidad contra *Tetranychus tumidus* a partir de las 24 horas.

REFERENCIAS

Carlberg, G.: «Biological Effects of the Termostable b-exotoxin Produced by Different Serotypesof *Bacillus thuringiensis*», Academic Dissertation for Public Criticism, Univ. of Helsinki, 1973.

Galán, W.; K. Arévalo: «Uso de un método sencillo para la detección de b-exotoxina en cepas de *Bacillus thuringiensis*», *South Western Entomologist* 19 (4):385-390, 1996.

Glare, T.; M. Callaghan: *Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety*, Eds. John Wiley and Sons, Ltd., 2000.

Gohar, M.; S. Perchat: «Sample Preparation for b-exotoxin Determination in *Bacillus thuringiensis* Cultures by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography», *Anal. Biochem.* 298:112-117, 2001.

Hay M. A.; O. Yu Ling: «Toxicity of *Bt.* to *Tetranychus pacificus* and *Metaseilus accidentalis* (ácaros)», *J. Econ. Entomol.* 89(5):507-511, 1987.

Hernández, C.; J. Ferré; T. Larget: «Update on the Detection of b-exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by HPLC Analysis», *Appl. Microbiol.* 90:43-647;2001.

Hernández, C.;C. Martínez; M. Porcar; J. Ferré: «Correlation Between Serovars of *Bacillus thuringiensis* and Type b-exotoxin Production», *J. Invertebr. Pathol.* 82:57-62, 2003.

Ignoffo, C. M.: «Toxicity of Nematodes Eggs to *Bacillus thuringiensis* Toxins», *Esp. Parasitol.* 60:239-244, 1992.

Ignoffo, C. M.; V. H.: «Dropkin Deleterious Effects of the Thermostable Toxin of *Bt* on Species of Soil. Inhabiting, Myceliophagus and Plant Parasitic Nematodes», *J. of Kansas Entomological Soc.* 50(3):394-398, 1977.

Krieg, A.: «Effectiviness of *Bt.* exotoxins on *Tetranychus telarius* (Acarine)», *J. Invertebr. Pathol.* 12:478-480, 1986.

Levinson, B.; J. Karla; S. Chiu: «Identification of b-exotoxin Production, Plasmids Encoding b-exotoxin, and a New b-exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by Using HPLC», *J. Bacteriol.* 172 (6):3172-3179, 1990.

Márquez, María E.; Orietta Fernández-Larrea; Lérida Almaguel: «Producción y evaluación de cultivos de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) con efecto acaricida sobre *P. latus* (Banks.) (Acarina: Tarsonemidae)», *Fitosanidad* 3 (3):53-58, 1999.

Márquez, María E.: «Actividad nematicida de cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Meloidogyne incognita* en Cuba». Tesis de Maestría, Universidad de La Habana, 2003.

Ohba, M.; A. Tantichodok; K. Aizawa: «Production of Heat Stable Exotoxin by *Bacillus thuringiensis* and Related Bacteria», *J. Invertebr. Pathol.* 38:26-32, 1981.

Royalti, R. N.; F. R. Hall; B. A. Luciu: «Effects of Thuringiensin on European red Mite (Acarina: Tetrany Chidae) Mortality, Oviposition Rate and Feeding», *Pestic-Sci.* 33(3):383-391, 1990.