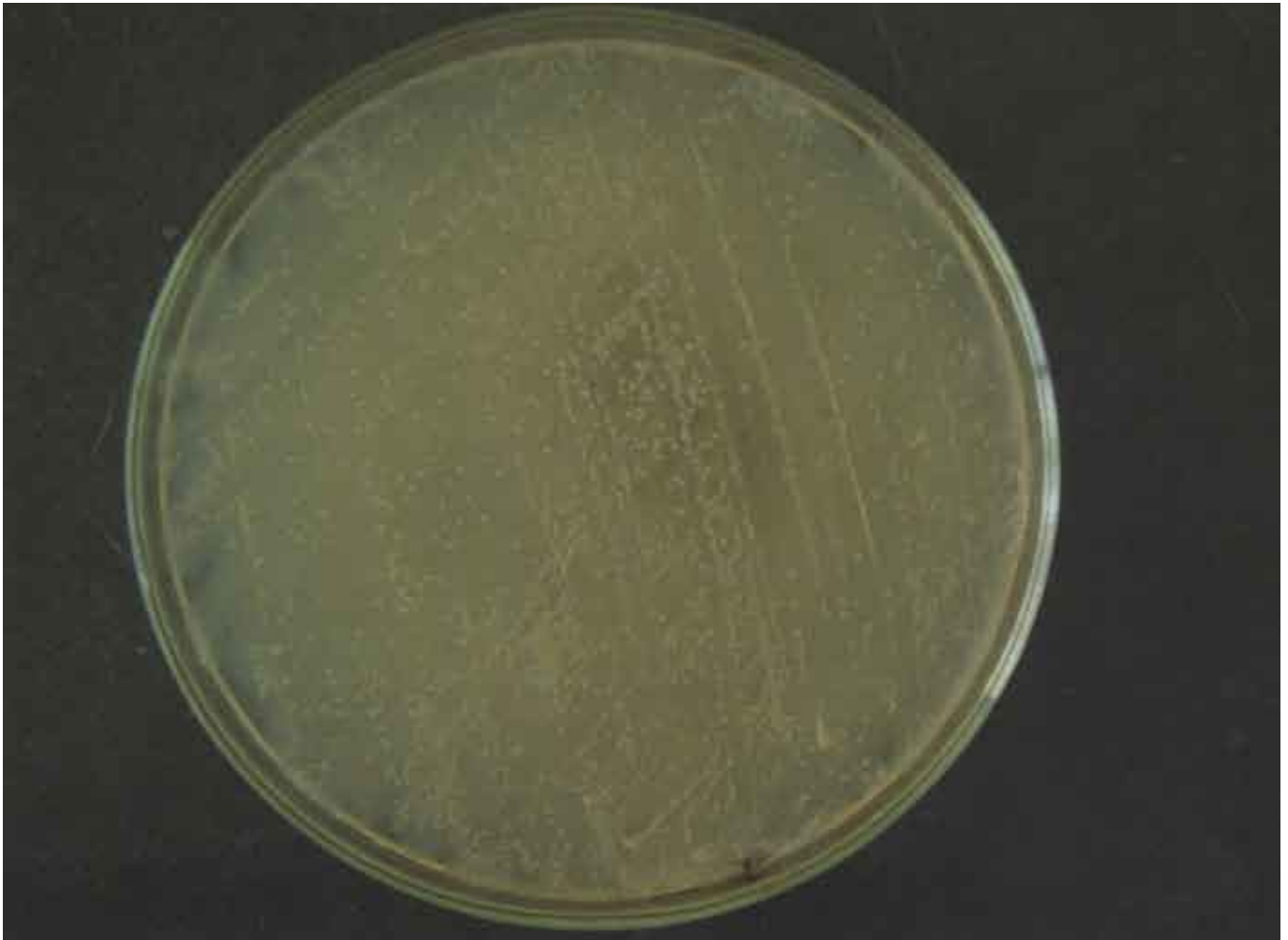


MAGNESIO: ¿LA CLAVE PARA LA SÍNTESIS DE INSECTICIDAS BIOLÓGICOS?



Colonias de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 cultivadas en medio sólido Luria-Bertani.

EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE MAGNESIO EN LA PRODUCCIÓN DE ENDOTOXINAS en *Bacillus thuringiensis var kurstaki-HD1*

Roberto Carlos Lenis P.¹, Camilo González R.¹,
Sergio Bautista D.¹, Silvia Gómez D.²
y Mauricio Pulido J.³

1. Estudiante 8° grado, Gimnasio Campestre.
2. Investigadora Programa de Recursos Genéticos y Mejoramiento Vegetal, CORPOICA.
3. Director CEBM, Gimnasio Campestre.

Correspondencia para los autores: mpulido@campestre.edu.co

Recibido: 26 de octubre de 2006
Aprobado: 15 de diciembre de 2006

RESUMEN

La producción de proteínas cristalinas insecticidas (ICP's) en *Bacillus thuringiensis* (Bt) es afectada de manera sustancial por la presencia de elementos metálicos tales como cobre, zinc, calcio, manganeso y magnesio en el medio de cultivo. En el presente estudio se evaluó el efecto del magnesio (Mg^{+2}) en la biosíntesis de ICP's en *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki-HD1*. Las concentraciones de sulfato de magnesio ($MgSO_4$) seleccionadas para la evaluación no afectaron significativamente la producción de cristales tóxicos, hecho que sugiere que cantidades considerablemente menores de magnesio pueden ser suficientes para lograr un efecto de estimulación en la biosíntesis de estas δ -endotoxinas.

Palabras clave: Proteína cristalina insecticida, biosíntesis, elemento metálico.

SUMMARY

The production of insecticidal crystal proteins (ICP's) by *Bacillus thuringiensis* is substantially affected by the presence of metallic elements such as copper, zinc, calcium, manganese and magnesium in the culture medium. In this study, the effect of magnesium (Mg^{+2}) on biosynthesis of ICP's by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki-HD1* was investigated. Concentrations of magnesium sulfate ($MgSO_4$) selected for evaluation did not significantly affect the production of toxic crystals, suggesting that considerably lower amounts of magnesium can be enough to achieve a stimulatory effect on the synthesis of bacterial δ -endotoxins.

Key words: Insecticidal crystal protein, biosynthesis, metallic element.

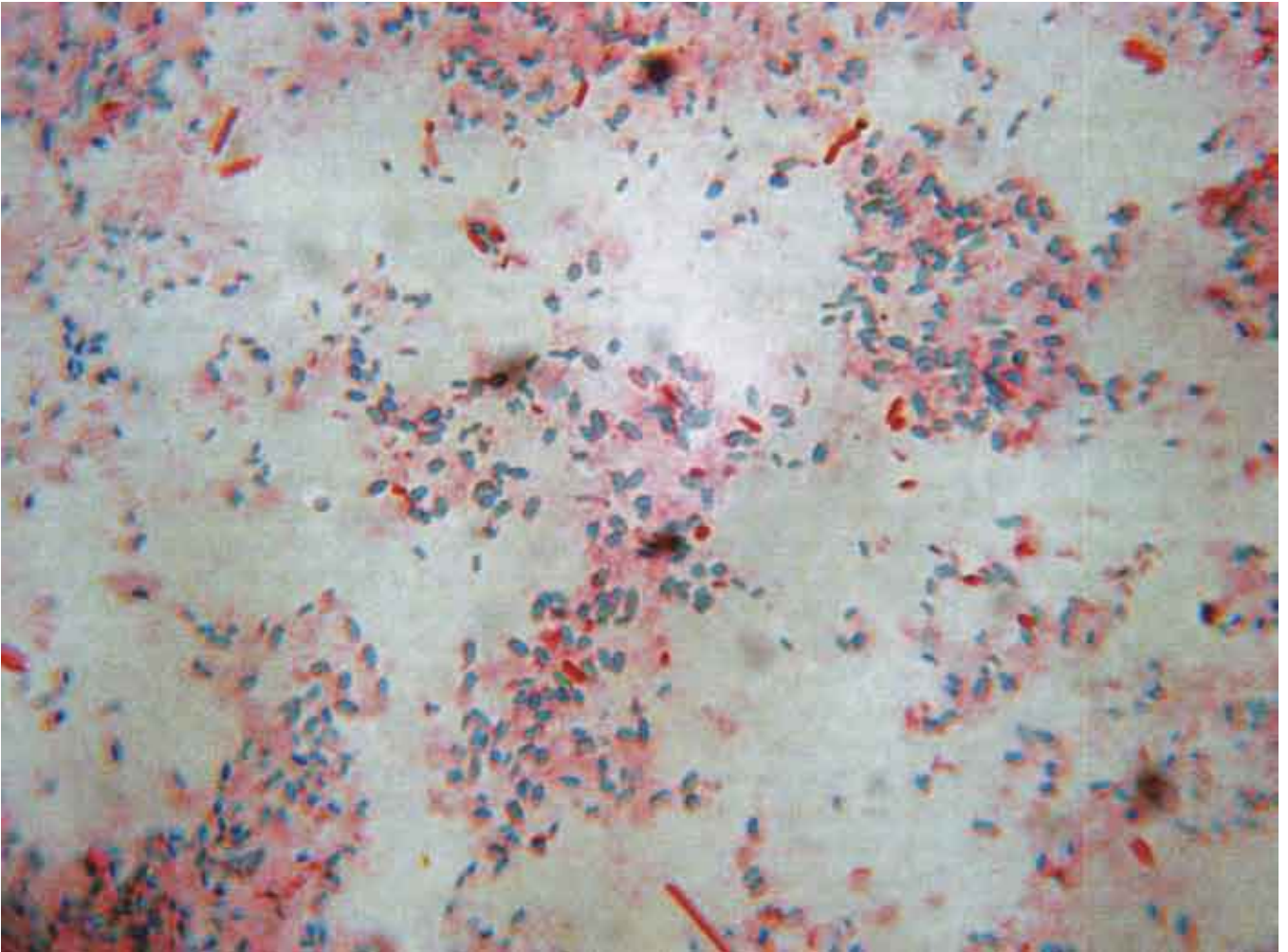


Figura 1. Evaluación microscópica de *B. turingiensis* var. *kurstaki* HD-1. Se observan bacterias (bastones rojos), esporas (puntos verdes) y cristales (puntos rojos).

INTRODUCCIÓN

Las diferentes especies de insectos plaga destruyen anualmente entre el 20 y el 30% de los cultivos de importancia económica en todo el mundo y se estima que cada año se invierten 8 billones de dólares en su control (Nester et al., 2001). *Bacillus thuringiensis* (Bt) se ha utilizado durante más de un siglo como una alternativa de bajo impacto ambiental en el control de algunas plagas y en los últimos años como fuente de genes para la creación de plantas transgénicas resistentes al ataque de estas (Schnepf et al., 1998). Bt es una bacteria aeróbica, Gram-positiva, que durante la fase estacionaria de crecimiento produce proteínas cristalinas insecticidas (ICP's) denominadas δ -endotoxinas (Figura 1); estas son codificadas por los genes cry y son las responsables de la actividad insecticida de la bacteria (Schnepf et al., 1998). Bt posee actividad biológica contra insectos lepidópteros, coleópteros, dípteros, himenópteros, homópteros, ortópteros, malófagos; contra organismos como ácaros, platelmintos, nemátodos y protozoos patógenos como *Giardia lamblia* y *Plasmodium berghei* (Häfte & Whiteley, 1989; Mizuki et al., 1999; Xu et al., 2004).

La producción de δ -endotoxinas en la bacteria es afectada de manera sustancial por la presencia de elementos metálicos en el medio de cultivo (Içgen et al., 2002). Análisis de microscopía electrónica de cepas mutantes espontáneas de *B. thuringiensis* cultivadas en medio enriquecido y en medio mínimo revelaron que estas producen cristales cuya forma y tamaño es variable (Perani & Bishop, 2000). Para el caso particular de un aislamiento local de Bt originario de Turquía (6t81) se determinó que el magnesio era esencial (en el rango entre 8×10^{-5} M y 4×10^{-3} M) y el cobre altamente estimulante (en concentraciones que oscilaron entre 10^{-6} y 10^{-7} M) para la biosíntesis de las toxinas de 135 kDa y 65 kDa (Içgen et al., 2002). La inclusión de manganeso a concentraciones entre 3×10^{-4} y 10^{-5} M favoreció la producción de toxinas mientras que la omisión de zinc y calcio no tuvo efecto en la generación de las mismas. La síntesis de cristales proteicos y la esporulación parecen no ser correguladas por minerales puesto que responden de manera diferente a los niveles de estos. En el estudio no se hallaron evidencias de la supresión de la biosíntesis debido a la presencia de fosfato inorgánico

en el rango entre 3 y 100 mM. Estudios complementarios mostraron que los mayores niveles de toxinas se obtuvieron en presencia de sacarosa, lactosa e inulina como fuente de carbono. Otros carbohidratos tales como glucosa, glicerol, maltosa, almidón y dextrina produjeron menores cantidades de toxinas. Las fuentes de nitrógeno ejercieron los efectos de control más importantes; la peptona fue la mejor fuente de nitrógeno orgánico, soportando la producción óptima y la esporulación, también como una alta densidad de crecimiento celular. Se encontró que la formación de las toxinas Cry I y Cry II fue regulada de manera diferencial por compuestos de nitrógeno inorgánico (Içgen et al., 2002b).

En *B. thuringiensis* subs. *israelensis* HD500 las más altas producciones de Cry 11Aa y Cry 4Ba se lograron con $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Entre las fuentes de carbono, inulina, dextrina, maltosa, lactosa, sacarosa y glicerol fueron estimuladoras, mientras que la glucosa y el almidón tuvieron efecto represor. Se requirieron altas concentraciones de fosfato inorgánico (50 a 100 mM K_2HPO_4) para una síntesis efectiva de Cry 4Ba. El manganeso (1×10^{-6} M) fue el elemento más crítico para la biosíntesis de ambas toxinas. Elementos como magnesio y calcio estimularon la producción cuando estuvieron presentes a concentraciones de 8×10^{-3} M y 5.5×10^{-4} M respectivamente, mientras que hierro, zinc y cobre tuvieron un efecto negativo en la síntesis (Özkan et al., 2003). En este estudio se evaluó el efecto del magnesio proveniente del sulfato de magnesio (MgSO_4) en la biosíntesis de los cristales proteicos de *Badilas thuringiensis* var. *kurstaki*-HD1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa bacteriana, medio de cultivo y crecimiento de la bacteria: Se utilizó la cepa de referencia *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1. La bacteria se cultivó masivamente en medio LB sólido (10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, 15 g/L agar-agar) suplementado con sulfato de magnesio (2, 4, 8 y 12 g/L). Como control negativo se utilizó medio LB sólido. Las bacterias se incubaron a 28-30 °C durante 14 días. Para cada concentración de MgSO_4 evaluada los ensayos se realizaron por triplicado.

Preparación y tinción de las láminas: Muestras de masa bacteriana provenientes de cada concentración de sulfato de magnesio evaluada se emulsificaron en agua destilada, se colocaron sobre láminas portaobjetos y se flamearon para adherir la muestra a estas. Las láminas se colorearon empleando la tinción Verde de Malaquita -Safranina.

Evaluación microscópica: Se analizaron 10 campos ópticos por cada concentración de sulfato de magnesio evaluada mediante observación al microscopio (objetivo de 100X). Para cada campo se hizo el conteo de cristales presentes y posteriormente los valores correspondientes a cada concentración de $MgSO_4$ fueron promediados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número promedio de cristales δ -endotóxicos encontrado en cada una de las tres primeras concentraciones de sulfato de magnesio seleccionadas (2, 4 y 8 g/L) no presentó variaciones significativas respecto al control negativo, mientras que la cuarta concentración (12 g/L) mostró valores superiores a los demás; sin embargo tal diferencia no es estadísticamente significativa (Figura 2).

Bt requiere de algunos elementos metálicos en mínimas concentraciones para estimular la síntesis de ICPs. İçgen et al. (2002) encontraron que en aislamientos nativos de Bt la presencia de manganeso en el rango entre 3×10^4 y $10^5 M$ favoreció a la producción de δ -endotoxinas y que el cobre en el rango entre 10^{-6} y $10^{-7} M$ resultó altamente estimulante para dicho proceso biosintético. No obstante, en trabajos posteriores se determinó que concentraciones de manganeso diez veces menores a las establecidas en el trabajo antes citado, permitieron lograr el máximo nivel de producción de toxinas (12 $\mu g/mL$ de las proteínas Cry4Ba y Cry11Aa) en la cepa de referencia *B. thuringiensis* subs. *israelensis* HD500 y que el cobre afectó de manera negativa la biosíntesis (Özkan et al., 2003). De manera contrastante, Jun et al. (2003) han demostrado que la actividad metabólica de Bt puede ser estimulada, inhibida o interrumpida definitivamente cuando se emplean cantidades de cobre 450, 650 y 2000 veces más altas que las reportadas por İçgen et al. 2002. En la última situación descrita el cobre alcanzó niveles tóxicos para la bacteria.

La evaluación del efecto de elementos traza realizada por Özkan et al. (2003) reveló que el magnesio a concentración de $8 \times 10^3 M$ estimuló de manera con-

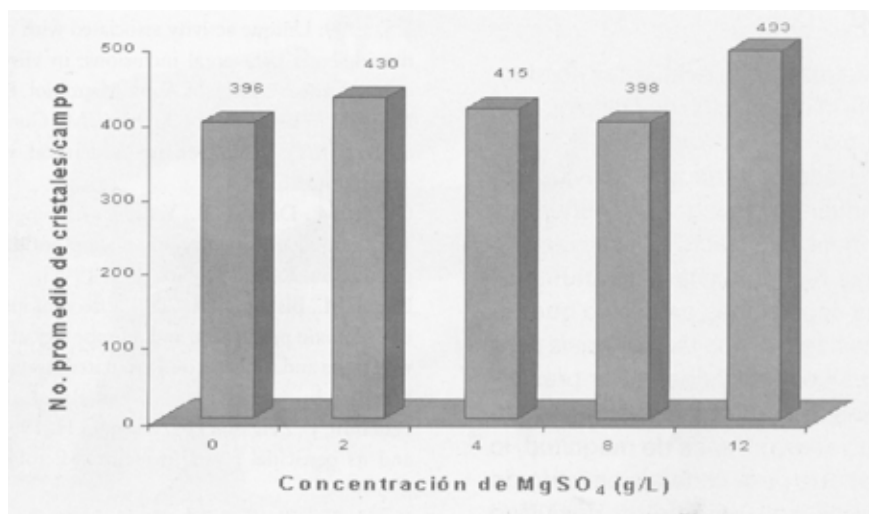


Figura 2. Comparación del número de cristales producido en cada concentración de $MgSO_4$ utilizada.

siderable la síntesis de las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa (3 y 6.2 µg/mL respectivamente). En el presente estudio se emplearon concentraciones de magnesio que fueron entre 2 y 12.5 veces mayores que las evaluadas en el estudio antes mencionado. El hecho de que no existan diferencias significativas en el número promedio de cristales obtenido con las cantidades de magnesio evaluadas, sugiere que tales concentraciones fueron suficientemente elevadas para generar un efecto inhibitorio de la biosíntesis de las toxinas, resultado que coincide con lo observado por Jun et al. (2003) respecto al cobre.

CONCLUSIONES

Las concentraciones de magnesio evaluadas no afectaron significativamente la producción de cristales tóxicos en *Bacillus thuringiensis van kurstaki* HD-1, hecho que al ser contrastado con reportes previos sugiere que el uso de cantidades mucho más pequeñas de dicho metal puede inducir un efecto de estimulación en la biosíntesis de las δ-endotoxinas. Los numerosos estudios sobre las condiciones de cultivo que requieren los aislamientos de *Bacillus thuringiensis* para lograr elevados niveles de síntesis de ICP's presentan resultados disímiles; en determinados casos tales diferencias son de varios órdenes de magnitud, lo que conduce a pensar que para cada aislamiento de St es necesario determinar los parámetros de cultivo que permitan obtener los mejores resultados en términos de producción de δ-endotoxinas.

BIBLIOGRAFÍA

- Höfte, H., Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.
- İçgen, Y., İçgen, B., Özcengiz, G. 2002. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and pH. *Res. Microbiol.* 153: 599-604.
- İçgen, Y., İçgen, B., Özcengiz, G. 2002b. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II. Effects of carbon and nitrogen sources. *Res. Microbiol.* 153: 605-609.
- Jun, Y., Yi, L., Yong, T., Jianben, L., Xiong, C., Qin, Z., Jiabin, D., Songsheng, Q., Ziniu, Y. 2003. The action of Cu²⁺ on *Bacillus thuringiensis* growth investigated by microcalorimetry. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 39: 656-660.
- Mizuki, E., Ohba, M., Akao, T., Yamashita, S., Saitoh, H., Park, Y.S. 1999. Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. *J. of Appl. Microbiol.* 86: 477-486.
- Nester, E., Thomashow, L.S., Metz, M., Gordon, M. 2001. 100 years of *Bacillus thuringiensis*: A critical scientific assessment. www.asmtusa.org
- Özkan, M., Dilek, F. B., Yetis, Ü., Özcengiz, G. 2003. Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. *Res. Microbiol.* 154: 49-53.
- Perani, M., Bishop, A.H. 2000. Effects of media composition of delta-endotoxin production and morphology of *Bacillus thuringiensis* in wild types and spontaneously mutated strains. *Microbios.* 101: 47-66.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.
- Xu, Z., Yao, B., Sun, M., Yu, Z. 2004. Protection of mice infected with *Plasmodium berghei* by *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Parasitol. Res.* 92: 53-57.