

# NITRÓGENO: LA CLAVE PARA LA PRODUCCIÓN DE TOXINAS

## Evaluación del efecto combinado de dos fuentes de Nitrógeno en la producción de $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD1

Pitre Ruíz Leanis<sup>1</sup>, Hernández Fernández Javier<sup>2</sup>, Bernal Villegas Jaime<sup>3</sup>

1. Aspirante a M.Sc. Pontificia Universidad Javeriana.

2. Asesor Centro de Estudios en Biología Molecular, Gimnasio Campestre.

3. Director Centro de Estudios en Biología Molecular, Gimnasio Campestre.

### RESUMEN

Este trabajo de investigación se realizó con el propósito de evaluar el efecto combinado de dos fuentes de nitrógeno (extracto de levadura y sulfato de amonio) en el establecimiento de un medio de cultivo que favorezca la máxima producción de cristales insecticidas por parte de *Bacillus thuringiensis*. Para ello se empleó la cepa de referencia *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 proveniente del producto comercial Dipel®. Se ensayaron tres concentraciones de extracto de levadura (5.0, 7.5 y 10 g/L) siendo la segunda la que generó los mejores promedios de producción de cristales. Posteriormente se ensayó la combinación de 7.5 g/L con cuatro concentraciones de sulfato de amonio (1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 g/L). Los mejores resultados se obtuvieron usando la combinación de 7.5 g/L de extracto de levadura y 4.0 g/L de sulfato de amonio.

**Palabras Clave:** *Bacillus thuringiensis*,  $\delta$ -Endotoxinas, fuente de Nitrógeno, medio de cultivo LB.

### SUMMARY

The present investigation was developed to evaluate the combined effect of two nitrogen sources (yeast extract and ammonium sulfate) to establish a culture medium which allows maximal insecticidal crystal production from *Bacillus thuringiensis*. The reference strain *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 from commercial product Dipel® was used. Three yeast extract concentrations (5.0, 7.5 and 10 g/L) were evaluated from which the second one showed the best averages of crystal production. Subsequently, this yeast extract concentration was tested with four ammonium sulfate concentrations (1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 g/l). The best results were obtained using 7.5 g/L of yeast extract combined with 4.0 g/L of ammonium sulfate.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*,  $\delta$ -Endotoxins, Nitrogen source, LB culture medium.

## INTRODUCCIÓN

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es una bacteria aeróbica, gram positiva, que durante su fase estacionaria de crecimiento produce una inclusión paraesporal la cual contiene proteínas insecticidas (ICPs) denominadas  $\delta$ -endotoxinas; estas son codificadas por los genes denominados *cry*. *Bt* es el organismo entomopatógeno más utilizado para el control de insectos plaga en diversos cultivos de interés económico (Schnepf *et al.*, 1998).

Diferentes tipos de medio de cultivo pueden ser utilizados para favorecer la esporulación de *Bt* y la producción de cristales paraesporales; básicamente todos incluyen una fuente de nitrógeno, una fuente de carbono y una mezcla de sales que tienen el propósito de proveer al microorganismo de todas las sustancias requeridas para la biosíntesis de las macromoléculas necesarias para el desarrollo de todas sus funciones biológicas (Içgen *et al.*, 2002).

Se han dedicado grandes esfuerzos a desarrollar medios de cultivo que aporten los elementos nutritivos que favorezcan la máxima formación tanto de esporas como de cristales en los cultivos de *Bt*. La fuente de nitrógeno es de gran importancia para la bacteria debido a que este elemento es fundamental para la biosíntesis de aminoácidos, los cuales constituyen la estructura básica de toda proteína (Galán, 1996). Para la investigación de la expresión de los genes *cry*, responsables de la producción de las  $\delta$ -endotoxinas, se ha utilizado generalmente el medio Luria Bertani (LB) que contiene agar, cloruro de sodio (NaCl), y como fuente de carbono y nitrógeno orgánico, triptona y extracto de levadura. En este estudio se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de extracto de levadura (fuente de nitrógeno orgánico) y de sulfato de amonio (fuente de nitrógeno inorgánico) sobre la producción de cristales en *Bt*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepa bacteriana y medio de cultivo

Para el presente estudio se utilizó *Bt kurstaki* HD-1 (Dipei®, Aventis Crop Science), como cepa de refe-

rencia. Esta cepa produce cristales paraesporales de forma bipiramidal, tóxicos para muchos insectos plaga del orden Lepidóptero (Schnepf *et al.*, 1998). La cepa se cultivó en medio LB sólido (10 g. NaCl, 10 g. triptona, 5.0 g. extracto de levadura, 13 g. agar por litro de agua destilada).

### Evaluación de la producción de cristales empleando medio LB modificado preparado con diferentes concentraciones de extracto de levadura y sulfato de amonio

*Bt* se creció durante 10 días a 30°C en medio de cultivo LB modificado el cual se preparó adicionando extracto de levadura a concentraciones de 5.0, 7.5 y 10 g/L. Una vez determinada la concentración de extracto de levadura que arrojó los mejores resultados en términos de producción de cristales, se evaluó el efecto combinado de ésta última con diferentes concentraciones de sulfato de amonio (1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 g/L) sobre el mismo parámetro.

Los extractos crudos de esporas y cristales fueron obtenidos arrastrando toda la masa celular presente en la superficie de los medios de cultivos. La masa celular fue resuspendida en 400  $\mu$ l de agua destilada estéril. Los extractos se conservaron a -20°C hasta su utilización para el análisis microscópico.

### Evaluación microscópica

Las colonias que crecieron en los diferentes medios modificados se utilizaron para realizar extendidos, los cuales se sometieron a tinción diferencial con safranina-verde de malaquita para evidenciar la presencia de los cristales. Se analizaron 100 campos ópticos por triplicado mediante observación al microscopio (Olympus CH20) empleando un aumento de 100X.

### Análisis Estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones. Posteriormente se realizaron análisis de varianza y contrastes ortogonales con los promedios de los recuentos de cristales por tratamiento; se consideró un nivel de significancia entre 0.01 y 0.05 para determinar los tratamientos que presentaron diferencias significativas.

## Resultados

Las modificaciones realizadas en el medio LB soportaron favorablemente el desarrollo de la bacteria. Para el recuento de los cristales se seleccionaron las áreas de la lámina que presentaban distribución uniforme de estos; aunque se apreciaron variaciones en los recuentos, los resultados fueron muy similares en las tres repeticiones de cada campo observado.

En la figura 1 se muestran los promedios de los recuentos de cristales de cada tratamiento; empleando 7.5 y 10 g/L de extracto de levadura se observaron los valores de conteo de cristales más altos (615.3 y 598.5 respectivamente).

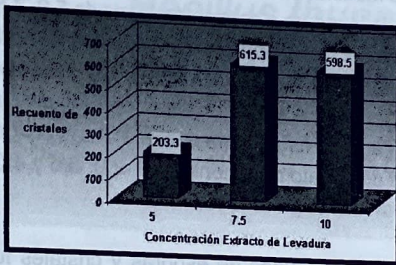


Figura 1. Efecto del uso de medio de cultivo LB con diferentes concentraciones de extracto de levadura. Se observan los promedios de los conteos de cristales producidos en cada concentración de extracto de levadura (5.0, 7.5 y 10 g/L).

El análisis estadístico mostró que existen diferencias significativas entre los tratamientos de 5.0 g/L, 7.5 g/L y 10 g/L de extracto de levadura. Al comparar los promedios de los diferentes tratamientos con extracto de levadura se encontró que los mejores resultados se obtuvieron con 7.5 y 10 g/L y no se encontraron diferencias significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ); por tal razón, se seleccionó el tratamiento con 7.5 g/L de extracto de levadura, el cual produjo el promedio más alto (615.3).

Se ensayó el medio de cultivo con 7.5 g/L de extracto de levadura adicionando diferentes concentraciones de sulfato de amonio (1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 g/L), para evaluar el efecto combinado de estas dos fuentes de nitrógeno en la producción de cristales.

En la figura 2 se muestran los promedios de los recuentos de cristales por tratamiento, observándose que los mayores valores se lograron en los tratamientos con 3.0 y 4.0 g/L de sulfato de amonio; los promedios obtenidos fueron de 783.6 y 839.6 respectivamente.

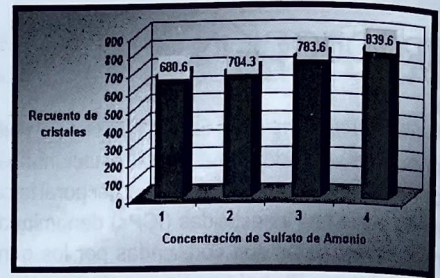


Figura 2. Efecto del uso de medio de cultivo LB con 7.5 g/L de extracto de levadura y diferentes concentraciones de sulfato de amonio. Se observa que el mayor recuento de cristales se obtuvo con 4.0 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Se encontró que el uso de diferentes concentraciones de sulfato de amonio produjo datos significativamente diferentes. El análisis estadístico demostró que los mejores resultados se lograron con 3.0 y 4.0 g/L; no se encontraron diferencias significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ).

## Discusión

El medio de cultivo para *Bt* debe contener fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico debido a que la bacteria requiere de aminoácidos y otras formas orgánicas de nitrógeno durante sus fases de crecimiento vegetativa y estacionaria (Galán *et al.*, 1996). Además, debe contener sales minerales para estimular la esporulación y por consiguiente la producción de cristales; la ausencia de estas retarda estos dos procesos y en consecuencia la toxicidad del complejo espora/cristal (Fernández, 1999). Galán *et al.*, (1980), observaron un claro incremento en la producción de esporas al adicionar extracto de levadura a un medio de cultivo enriquecido.

El nitrógeno se encuentra en la célula principalmente haciendo parte de los grupos amino ( $\text{NH}_2$ ). La bacteria asimila nitrógeno inorgánico del medio en forma de nitrato en la fase exponencial de crecimiento (Abarca *et al.*, 1992), por lo tanto su utilización implica una reducción preliminar. El requerimiento de nitrógeno reducido puede satisfacerse mediante la provisión de nitrógeno en forma de sales de amonio (Agaisse y Lereclus, 1995), aunque hay que tener en cuenta que la velocidad de crecimiento de *Bt* no es muy alta si el medio contiene solamente este tipo de sales (sulfato de amonio) (Bravo y Cerón, 2004).

Los resultados señalan que es necesario complementar la fuente de nitrógeno orgánico con una fuente de

nitrógeno inorgánico; prueba de ello es el aumento en la producción de cristales (Figura 2), con un valor máximo de 839.6 en relación con la utilización de extracto de levadura como única fuente (Figura 1). El aumento de las concentraciones de sulfato de amonio por encima de 4 g/L podría conducir a dos situaciones: aumento en la biosíntesis de cristales o decrecimiento de la misma como consecuencia de una represión por sustrato, lo que implica que la bacteria podría llegar a utilizar muy poco o nada esta fuente de nitrógeno.

Para incrementar la producción de  $\delta$ -endotoxinas debe conocerse el metabolismo de *Bt* durante las etapas de crecimiento vegetativo, de transición y de esporulación, así como la capacidad del microorganismo para acumular metabolitos intermedios (de Maagd *et al.*, 2001). Por tal razón, las investigaciones orientadas a optimizar medios de cultivo para la producción de *Bt* involucran manipulación genética, estudios sobre requerimientos nutricionales, inhibición metabólica, así como el requerimiento de oxígeno, temperatura, pH, etc. (Yang and Wang, 1998). En este trabajo se logró aumentar la producción de cristales de *Bt* satisfaciendo los requerimientos de nitrógeno orgánico e inorgánico respecto a las condiciones estandar utilizadas para el cultivo de la bacteria.

Avignone *et al.* (1990) realizaron investigaciones con el objetivo de estudiar la influencia de las combinaciones de nitrógeno orgánico e inorgánico y la relación Carbono:Nitrógeno sobre el crecimiento y producción de proteína de *Bt var. israelensis*, encontrando que la presencia de una fuente de nitrógeno orgánico por sí sola no garantiza una adecuada producción de la toxina, lo que hace indispensable la combinación con una fuente inorgánica de nitrógeno; de otro lado se demostró que este efecto tiene más influencia en la producción de proteínas insecticidas que la relación Carbono:Nitrógeno.

En conclusión, estas dos fuentes de nitrógeno (orgánico e inorgánico) son el requerimiento nutricional más importante para que la bacteria realice la biosíntesis del cristal proteico. Es necesario investigar a fondo otras fuentes de nutrientes que puedan estar influyendo en la producción de las diferentes toxinas de *Bt*. Este estudio aporta algunos elementos para posteriores trabajos de bioprospección encaminados a generar mejores condiciones de cultivo para esta bacteria, tanto a nivel de laboratorio como a escala industrial.

## GLOSARIO

**Bacteria Gram-positiva:** Toda aquella bacteria que en su pared celular posee una mayor cantidad de moléculas que están constituidas por azúcares y proteínas, y que al ser sometida a la tinción de Gram presenta un color azul oscuro.

**Triptona:** Es el producto de la digestión enzimática de la Caseína, principal proteína de la leche. La triptona proporciona Nitrógeno, aminoácidos y vitaminas al medio de cultivo.

**Extracto de Levadura:** Suspensión concentrada de células de levadura que han sido lisadas. Aporta vitaminas, minerales y nitrógeno al medio de cultivo.

**Lepidópteros:** Grupo de insectos en el cual se encuentran incluidas todas las mariposas y polillas.

**Grupo Amino:** Molécula constituida por un átomo de nitrógeno y dos de hidrógeno. Hace parte de la estructura de los aminoácidos y otras moléculas de importancia biológica.

**Reducción química:** Ganancia de electrones por parte de uno de los átomos involucrados en una reacción química.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abarca, C.; Ceron, J. 1992. ¿Que son los bioinsecticidas?. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos México. Pag. 12-24
2. Agaisse, H.; Lereclus, D: 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein. *Journal Bacteriol* 177 pag 6027-6032.
3. Avignone, R. C. A., Yantorno, O., Arraras, E., Estola, R. 1990. Organic and inorganic nitrogen sources ratio effects on *Bacillus thuringiensis var. israelensis* d-endotoxin production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 6:27-31.
4. Bravo, A., Ceron, J. 2004. *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Editorial Buena Semilla. Bogotá Colombia. Pag 243-247.
5. De Maagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Recurso en línea: [www.tig.trends.com](http://www.tig.trends.com)
6. Fernandez-Larrea, OA. 1999. Review of *Bt* production and use in Cuba. *Biocontrol News and Information* 20(1):47-49.
7. Galan, J.L; Garcia, S.S; Santos, M.E; Quintero, I. 1996. Avances recientes en la Biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Monterrey, Mexico, Universidad de Nuevo Leon.
8. İçgen, Y. B. İçgen, G. Özcengiz. 2000. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II. Effects of carbon and nitrogen sources. *Res. Microbiol.* 153: 605-609.
9. Schenpf, E., N. Crickmore; J. Van Rie; D. Lereclus; J. Baum; J. Feitelson; D. Zeigler and D. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbial. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.