

Características bioquímicas, inmunológicas y toxicológicas de las proteínas del cristal de *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*

Biochemical, immunological and toxicological characteristics of the crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*

Nora Restrepo¹
María M. Patiño²
Thais Diaz¹
Martha C. Tamayo¹
Sergio Ordúz³

Resumen

La caracterización de la actividad hemolítica e insecticida de las proteínas del cristal de *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* (*Btmed*) se realizó y se comparó con las proteínas solubilizadas de las cepas 1884 de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) y PG-14 de *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* (*Btm*). En general, a valores de pH ácidos, la solubilización de las inclusiones cristalinas paraesporales (ICP) fue menor que a valores de pH alcalinos. La actividad larvica demostrada por las ICP de *Btmed* indica que la solubilización óptima tuvo lugar a un valor de pH de 11,3, en *Bti* a un pH entre 5,03 y 11,3, mientras que en *Btm* a un pH entre 9,05 y 11,3. La actividad hemolítica de estas proteínas en glóbulos rojos de carnero fundamentalmente se presentó a un valor de pH de 11,3. Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones denaturantes indica que la solubilización de los ICP en todas las cepas de *Bt* probadas tuvo lugar a valores alcalinos de pH entre 9,05 y 11,3. Se prepararon soluciones enriquecidas de las proteínas de *Btmed* y se separaron por exclusión de tamaño en una columna de Sephacryl S-200. Se observaron tres picos de proteínas en el cromatograma.

En el primer pico se detectaron dos proteínas con pesos moleculares entre 90 y 100 kDa. Estas proteínas aparentemente no se presentaron en otras subespecies de *Bt*. En el segundo y tercer pico se observaron proteínas de 68 y 28-30 kDa, respectivamente. Por separado, las proteínas de cada pico mostraron toxicidad en larvas de primer instar de *Culex quinquefasciatus*. Los resultados sugieren que la proteínas de 90-100 kDa son un componente muy importante de las toxinas de *Btmed*. Las combinaciones de las proteínas de 68 y 28-30 kDa mostraron una mayor toxicidad que las otras mezclas. Cuando se evaluaron las proteínas de *Bti* con antisueros preparados contra las proteínas tóxicas de *Btmed* se encontró que la única proteína que mostró reacción cruzada fue la de 28 kDa de *Bti*. Estos datos sugieren que *Btmed* podría representar una alternativa para los programas de control de mosquitos en caso de que se presente resistencia a las toxinas de *Bti*.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, Insecticidas bacterianos, propiedades físico-químicas, Proteínas, pH, Solubilización, Toxicidad, Mosquitos, *Culex quinquefasciatus*, Métodos.

Summary

Characterization of the insecticidal and hemolytic activity of solubilized crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* (*Btmed*) was performed and compared to solubilized crystal proteins of isolate 1884 of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) and isolate PG-14 of *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* (*Btm*). In general, at acid pH values, solubilization of the *Bt* crystalline parasporal inclusions (CPI) was lower than at alkaline pH.

The larvicidal activity demonstrated by the CPI of *Btmed* indicated that optimal solubilization of CPI takes place at a pH value of 11.3, in *Bti* at pH values from 5.03 to 11.3 and in *Btm* at pH values from 9.05 to 11.3. Hemolytic activity against sheep red blood cells was mainly found following extraction at pH 11.3 in all *Bt* strains tested. Polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions revealed that optimal solubilization of the CPI in all *Bt* strains takes place at alkaline pH values from 9.05 to 11.3. An enriched preparation of *Btmed* crystals was obtained, solubilized crystal proteins were separated on a size exclusion column (Sephacryl S-200). Three main protein peaks were observed on the chromatogram. The first peak had two main proteins that migrate between 90 to 100 kDa. These proteins are apparently not common to other *Bt* strains isolated to date. The second and third peaks obtained from the size exclusion column yielded polypeptides of 68 and 28-30 kDa, respectively. Each peak independently, showed toxicity against first instar *Culex quinquefasciatus* larvae. These results suggest that the 94 kDa protein is an important component of the *Btmed* toxins with the highest potency to kill mosquito larvae. Combinations of the fractions corresponding to the 68 and 30 kDa protein showed an increased toxicity. When crystal proteins of *Bti* were tested with antisera raised independently against the three main protein fractions of *Btmed*, the only crystal protein that showed cross reaction was the 28 kDa protein. These data suggest that *Btmed* could be an alternative bacterium for mosquito control programs in case that mosquito larval resistance emerges to *Bti* toxic proteins develops.

Introducción

Bacillus thuringiensis (*Bt*) es un bacilo Gram positivo, utilizado ampliamente en agricultura para el control de insectos plagas durante más de 30 años. Desde el descubrimiento de la primera cepa activa para larvas de mosquitos en 1977, por Goldberg y Margalit, la bacteria ha sido implementada en muchos países del mundo para el control de mosquitos. En años recientes, la búsqueda de nuevas cepas de *Bt* se ha incrementado con el propósito de descubrir nuevas actividades o cepas más potentes. Las cepas de *Bt* son tóxicas para insectos lepidópteros, dípteros, coleópteros, himenópteros, homópteros y malófagos (Feitelson et al. 1992; Feitelson 1993; Höfte y Whiteley 1989).

¹ Bacterióloga. Investigadora. Unidad de Biotecnología y Control Biológico.

² Bióloga Molecular. Investigadora Asociada. Unidad de Biología Molecular.

³ Entomólogo. Jefe Unidad de Biotecnología y Control Biológico. Corporación para Investigaciones Biológicas, e-mail cibubc@medellin.cetcol.net.co Apartado Aéreo 7378 Medellín, Colombia.

Esta bacteria produce inclusiones cristalinas paraesporales (ICP), usualmente compuestas de una o más subunidades de proteínas, las que al ser ingeridas por insectos susceptibles producen mortalidad. Estas proteínas tienen una variedad de propiedades biológicas y causan citólisis, hemólisis y toxicidad (Aronson et al. 1986; Höfte y Whiteley 1989).

Se conocen muchas variaciones en la estructura primaria de estas proteínas y son las directamente responsables de las diferencias en susceptibilidad de los organismos blanco de cada una de ellas (Höfte y Whiteley 1989). Muchas de las propiedades físico-químicas han sido estudiadas (Huber y Lüthy 1981; Tyrrel et al. 1981; Pfannenstiel et al. 1986; Koller et al. 1992; Du et al. 1994), incluyendo el valor de pH requerido para la solubilización de los cristales, un parámetro muy importante debido a que éste es un paso esencial en la toxicidad en insectos susceptibles. En este artículo se describen las propiedades de solubilización, las inmunológicas y las toxicológicas de las ICP producidas por *B. thuringiensis* subsp. *medellin* descrita por Orduz et al. (1992, 1994) y se reporta el papel de las proteínas individuales y sus mezclas en la toxicidad sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae).

Materiales y Métodos

Las cepas 1884 de *Bt* subsp. *israelensis* (*Bti*) y PG-14 de *Bt* subsp. *morrisoni* (*Btm*) se obtuvieron de la Unité de Bacteries Entomopathogenes, Institut Pasteur, Paris. La cepa 163-0131 de *Bt* subsp. *medellin* (*Btmed*) fué aislada en Colombia (Orduz et al. 1992). Todas las bacterias se cultivaron en agar LB (triptone 10 g, NaCl 10 g, extracto de levadura 5 g, agar 20 g por litro de agua destilada), y se incubaron por 24 h a 30°C. Los tubos con 5 ml de medio líquido M-1 (Proflo 1 g, peptona 5 g, glucosa 3 g, K₂HPO₄ 6 g, sales 10 ml, que contenían 0,02 g de cada uno de los siguientes componentes MgCl₂·6H₂O, MnCl₂·4H₂O, FeCl₃·6H₂O, ZnCl₂, y CaCl₂·2H₂O, buffer de fosfatos 200 ml, en 1 l de agua destilada y pH ajustado a 7,2) se inocularon e incubaron por 8 h a 30°C y 200 rpm. Los cultivos bacterianos se transfirieron a 200 ml de M-1 y

se incubaron a 30°C, 250 rpm en un incubador-agitador ambiental por dos días. El cultivo completo final (CCF) se colectó por centrifugación a 4°C, 9.000 x g durante 30 min. El botón resultante se trató por 30 min con 1M NaCl, se lavó dos veces con agua destilada y se resuspendió en 1/20 del volumen original y se almacenó a -20°C hasta su utilización. Las larvas de *C. quinquefasciatus* usadas en estos experimentos se colectaron en el campo, en la vecindad de Medellín, y se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio a 30±2°C bajo un fotoperíodo de 12:12.

Para los ensayos de solubilización se empleó un buffer con fuerza iónica constante a los diferentes valores de pH, según la técnica descrita por Koller et al. (1992). Cien microlitros de CCF de *Btmed* se trataron con las soluciones de pH del sistema buffer con valores entre 2,55 y 11,22, durante 24 h, 30°C a 200 rpm. Las proteínas solubilizadas se dializaron contra un buffer fosfatado y cloruro de sodio (PBS), pH 7,2, (0,32 g NaH₂PO₄, 1,18 g Na₂HPO₄, 8,58 g NaCl por litro, pH 7,2). El material sólido se concentró por centrifugación y la concentración de proteínas del sobrenadante se midió por el método de Bradford (Bradford 1976). Alícuotas de 400 ml de los sobrenadantes se precipitaron con acetona fría y posteriormente se separaron en un gel de 10% de poli(acrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE acrilamida-bis-*N-N'* acrilamida) (Laemli 1970).

Una muestra de 12,5 mg del solubilizado de cristales de *Btmed* se separó en una columna de Sephacryl S-200 (1 x 0,05 m.). La elución de las fracciones se realizó usando el sistema buffer descrito por Thiéry (1987), y se colectaron muestras de 4 ml, a las que se les midió la absorbancia a OD₂₈₀ nm. Las fracciones colectadas se dializaron contra PBS pH 7,2, y muestras de 400 ml se precipitaron con acetona fría y se separaron en un gel de 10% SDS-PAGE, como se describió anteriormente.

Para la determinación de la actividad hemolítica se colectaron y lavaron tres veces glóbulos rojos de cordero en solución salina (SS) 0,85% y se llevaron a una concentración final de 2,8% en SS. Cien

microlitros de las fracciones eluidas de la columna de Sephacryl se mezclaron con volúmenes iguales de la suspensión de glóbulos rojos en platos de microtitulación con fondo en U y se incubaron a 37°C con 5% CO₂ por 2 h, después de lo cual se centrifugaron a 500 x g por 10 min y la absorbancia de los sobrenadantes a 540 nm se leyó en un lector de ELISA, marca Multiskan modelo MCC/340.

Las proteínas solubilizadas del cristal de *Btmed* separadas en la columna de Sephacryl y las proteínas extraídas por el tratamiento en el sistema buffer se evaluaron para encontrar su toxicidad en larvas de primer instar de *C. quinquefasciatus*. Cinco larvas de *C. quinquefasciatus* se colocaron en cada uno de 24 pozos con 1 ml de agua desionizada y se dieron los tratamientos con las diferentes toxinas y mezclas para determinar la concentración letal media (CL₅₀). Cada dosis o extracto de pH se ensayó por duplicado y los experimentos se desarrollaron en cuatro días diferentes. Las interacciones entre las diferentes proteínas se evaluaron según a la fórmula descrita por Tabashnick (1992).

Contra cada una de las proteínas del cristal de *Btmed*, en ratón, se preparó un suero policlonal administrando inyecciones intraperitoneales semanales a partir de las proteínas separadas en 10% SDS-PAGE. La primera dosis se dió en adjuvante completo de Freund, mientras que las otras se dieron en adjuvante incompleto. Las proteínas del cristal de *Btmed* y *Bti* se separaron en un gel de 10% SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. El Western blot con anticuerpos policlonales se realizó incubando las membranas con los anticuerpos preparados contra las proteínas tóxicas de *Btmed* de 94, 68, y 30 kDa, diluidas 1:500 e incubadas a 4°C durante toda la noche. Las otras incubaciones se realizaron a temperatura ambiente en TBS pH 7,4, usando 3% de gelatina como agente bloqueador y 0,05% Tween-20. La inmunodetección de las proteínas se realizó por medio de fosfatasa alcalina conjugada a Proteína A, seguido de la incubación con un sistema sustrato/color compuesto de naftol fosfato/Fast Red (Sigma Chemical Co.)

Resultados

Se observó una tendencia general, en la que a condiciones alcalinas se pudo extraer más cantidad de proteínas a partir de las ICP en todas las cepas de *Bt* evaluadas en este estudio. Las ICP de las subespecies de *Bt* evaluadas en este estudio mostraron actividad hemolítica. Las ICP de *Bti*, *Btm* y *Btmed*, solubilizadas a pH de 11,3 produjeron 100% de hemólisis en glóbulos rojos de cordero, mientras que a valores de pH menos alcalinos se reportó hemólisis entre 0 y 30%. CCF de *Bti*, *Btm* y *Btmed* sin tratar causó 20%, 15% y 10% de hemólisis, respectivamente (Tabla 1).

Las ICP separadas en 10% SDS-PAGE, mostraron proteínas de 90-100 kDa, bandas múltiples a nivel de 80, 70, 67, 68, 40, y 28-30 kDa (Fig. 2A, línea 2). Las ICP a de *Bti* y *Btm* mostraron principalmente bandas a nivel de 144, 135, 125, 67, y 28 kDa cuando se solubilizaron a valores de pH entre 9,98 y 11,3 (Figs. 2B, 2C, línea 2). La solubilización óptima de las ICP de *Btmed* tuvo lugar a un pH de 11,3 (Fig. 2A, línea 12), pero se observaron proteínas a valores de pH entre 4,1 y 9,98 (Fig. 2A, líneas 5 a 11). Cuando en bioensayo se evaluó la actividad tóxica de las muestras correspondientes a las líneas 6 a 11 (Fig. 2A), se observó una mortalidad menor de 62%. De igual manera a *Btmed*, los cristales de *Btm* mostraron proteínas solubilizadas a valores de pH entre 4,1 y 11,3 (Fig. 2B, líneas 5 a 12); sin embargo, las proteínas solubilizadas del cristal de *Btm* causaron menos del 50% de mortalidad en los tratamientos con valores de pH por debajo de 6,01, y más del 80% de mortalidad en los tratamientos con soluciones de pH por encima de 7,04. La mortalidad de las larvas fué de 100% sólo cuando los cristales se solubilizaron a valores de pH entre 9,05 y 11,3 (Fig. 1). En el caso de *Bti* se observaron proteínas solubilizadas a partir de los cristales, fundamentalmente en los tratamientos con un valor de pH entre 9,05 y 11,3 (Fig. 2C, líneas 10 a 12); sin embargo, se observó más de un 90% de mortalidad de las larvas de *C. quinquefasciatus* en los tratamiento con valores de pH entre 5,03 y 11,2 (Fig. 1). En *Bti* y

Tabla 1. Concentración de proteínas y ensayos de actividad hemolítica de *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*, *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* y *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* a diferentes valores de pH

pH ^c	Concentración proteínas ^a (mg/ml)			Actividad hemolítica (%) ^b		
	<i>Btmed</i>	<i>Btm</i>	<i>Bti</i>	<i>Btmed</i>	<i>Btm</i>	<i>Bti</i>
2,3	<0,025	<0,025	<0,025	0	5	5
2,8	<0,025	<0,025	<0,025	5	5	5
4,01	<0,025	<0,025	<0,025	5	5	5
5,03	<0,025	<0,025	<0,025	5	5	5
6,01	<0,025	<0,025	0,06±0,02	5	5	10
7,04	<0,025	0,06±0,02	0,08±0,01	5	5	15
7,98	0,06±0,02	0,05±0,02	0,08±0,02	5	10	10
9,05	0,10±0,02	0,05±0,02	0,08±0,01	5	10	10
9,98	0,09±0,01	0,08±0,04	0,10±0,01	10	30	10
11,3	0,30±0,06	0,29±0,10	0,36±0,10	100	100	100
CCF	0,31±0,17	0,24±0,08	0,40±0,02	10	15	20

- a: Concentración de proteínas medida por el método de Bradford (1976)
 - b: Proteínas solubilizadas probadas por duplicado y en dos días diferentes.
 - c: Valores de pH en los que se solubilizaron los CPI. El pH se ajustó a 7,2 antes de realizar las pruebas de hemólisis.
- Btmed*: cepa 163-0131 of *B. thuringiensis* subsp. *medellin*, *Btm*: cepa PG-14 of *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni*, *Bti*: cepa 1884 of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*.
- CCF: Cultivo completo final.

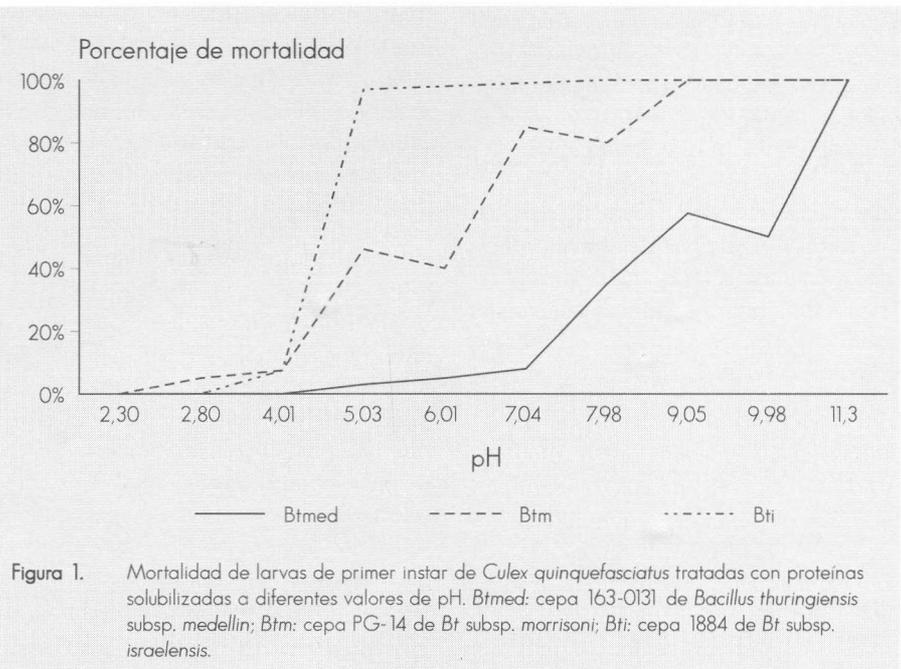


Figura 1. Mortalidad de larvas de primer instar de *Culex quinquefasciatus* tratadas con proteínas solubilizadas a diferentes valores de pH. *Btmed*: cepa 163-0131 de *Bt* subsp. *medellin*; *Btm*: cepa PG-14 de *Bt* subsp. *morrisoni*; *Bti*: cepa 1884 de *Bt* subsp. *israelensis*.

Btm, la proteína de 68 kDa se observó también cuando la solubilización de los cristales se llevó a cabo en los tratamientos con valores de pH de 5,03 y 6,01, respectivamente (Figs 2B y 2C, líneas 6 y 7, respectivamente).

La separación de las proteínas de *Btmed* solubilizadas bajo condiciones alcalinas produjo tres picos principales (Fig. 3A). La fracción 23 mostró dos bandas de proteínas cuando se analizó por electroforesis (Fig. 3B, línea 3), las cuales tienen un peso molecular entre 90 y 100 kDa, con el componente predominante situado a nivel de 94 kDa. En los estudios de toxicidad se hace referencia a esta fracción como 94 kDa. La proteína más abundante presente en las fracciones 24 a 30 (líneas 4 y 10) tiene un peso molecular entre 66 y 68 kDa. Las fracciones 32 y 33 (líneas 12 y 13) muestran dos bandas de

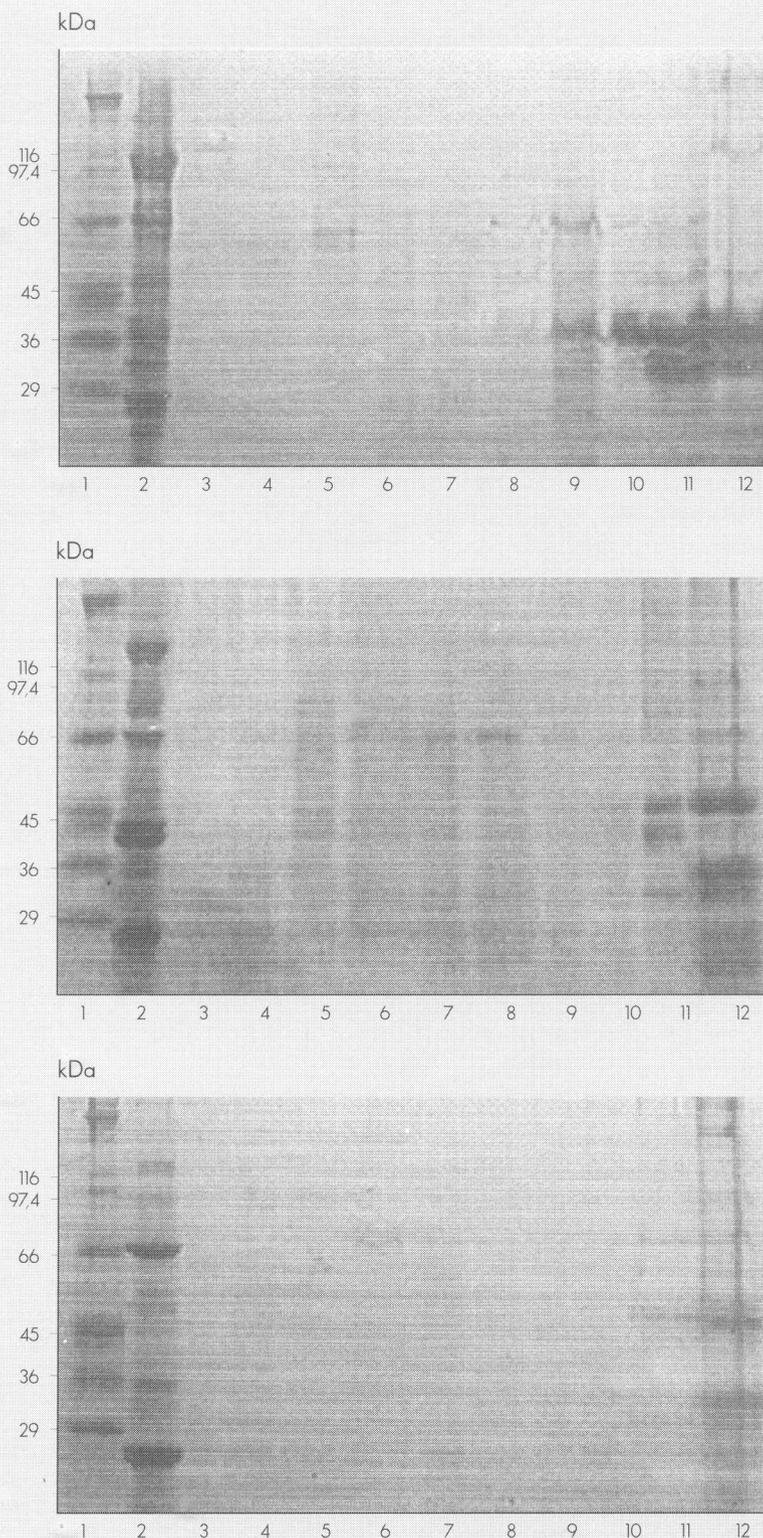


Figura 2. Geles de 10% SDS-PAGE, teñidos con azul de Coomassie (A) *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*, (B) *Bt* subsp. *morrisoni*, (C) *Bt* subsp. *israelensis* cultivo completo final tratado con diferentes valores de pH. Líneas 1, marcadores de peso molecular indicados en kDa; líneas 2 proteínas del cristal de (A), *B. thuringiensis* subsp. *medellin*, (B) *Bt* subsp. *morrisoni*, y (C), *Bt* subsp. *israelensis*, líneas 3 pH 2,3; líneas 4, pH 3,8; líneas 5, 4,1; líneas 6, pH 5,03; líneas 7, pH 6,01; líneas 8, pH 7,04; líneas 9, pH 7,98; líneas 10, pH 9,05; líneas 11, pH 9,98; líneas 12, pH 11,3.

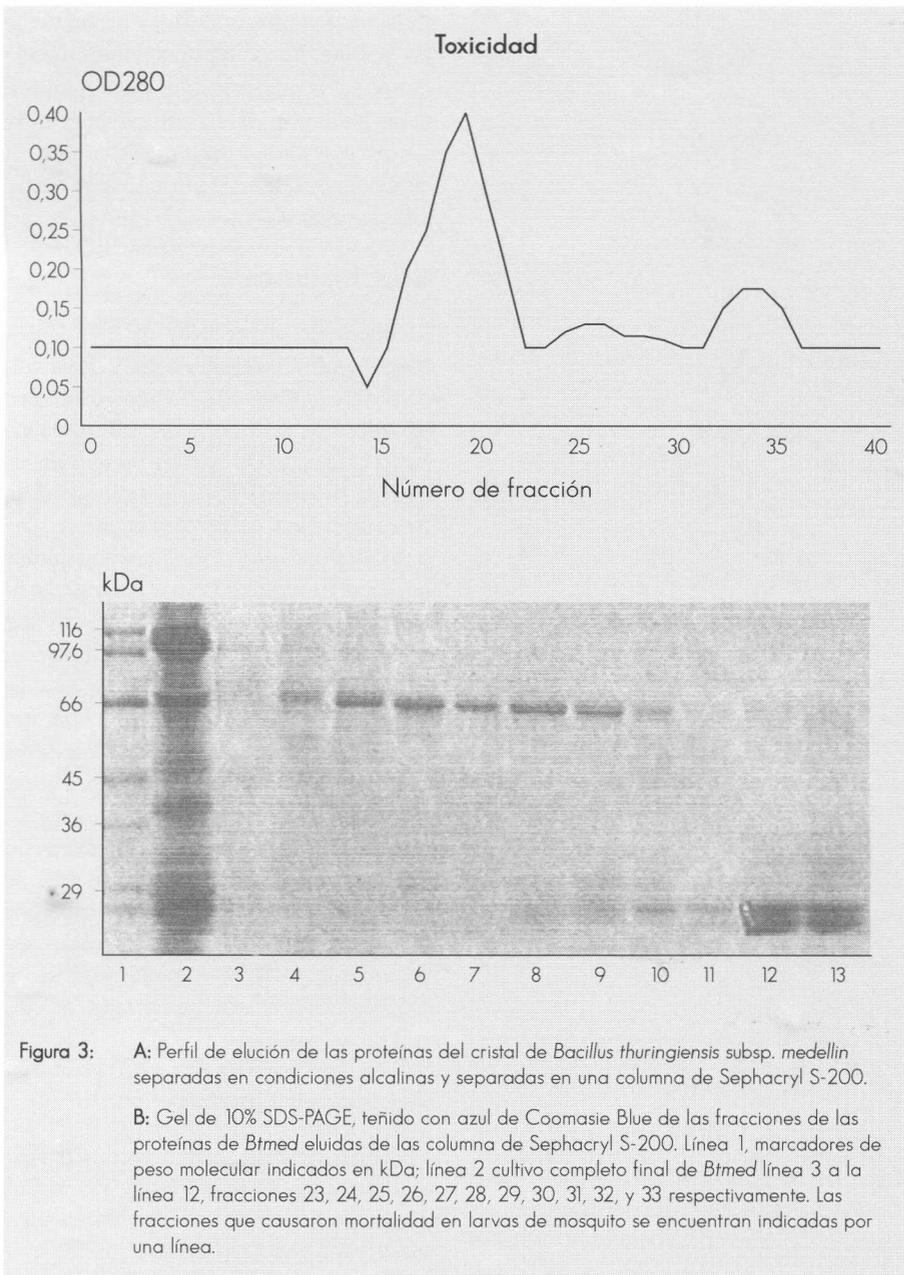
proteínas de aproximadamente 28 y 30 kDa. La actividad hemolítica fundamentalmente se encontró en estas bandas (Tabla 2).

La actividad tóxica obtenida en los tratamientos con las fracciones eluidas de la columna de Sephacryl indica que la proteína de 94 kDa es tal vez el componente más importante de las ICP de *Btmed* con una CL_{50} de 82,6 ng de proteína/ml (Tabla 3). Las proteínas de 68 y 30 kDa de *Btmed* tienen una CL_{50} de 1.256 y 1.948,5 ng/ml, respectivamente, en larvas de primer instar de *C. quinquefasciatus*. El efecto de las mezclas de las proteínas de las ICP de *Btmed* también se evaluó en bioensayos con larvas de mosquito, y los datos se analizaron según la fórmula descrita por Tabashnick (1992). Los resultados indican que la mezcla de proteínas de 94 y 68, y 94 y 30 kDa no presentan una interacción sinérgica, mientras que la mezcla de proteínas de 68 y 30 kDa si proporciona sinergia. La mezcla de las fracciones que contienen las proteínas de 94, 68 y 30 kDa produjo un ligero incremento de toxicidad en comparación con lo esperado, pero este aumento no puede considerarse como una interacción sinérgica (Tabla 3).

Cuando las proteínas de las ICP de *Btmed* y *Bti* se evaluaron por Western blot con los anticuerpos preparados independientemente contra cada una de las proteínas de *Btmed*, se encontró que los anticuerpos preparados contra las proteínas de 94 y 68 kDa de *Btmed* no reconocieron ninguna de las proteínas de las ICP de *Bti* mientras que los anticuerpos preparados contra la proteína de 30 kDa de *Btmed* si reconocieron las proteínas de 28 kDa de *Bti*.

Discusión

La mortalidad de larvas de mosquito y la actividad hemolítica de las ICP de las cepas de *Bt* solubilizadas bajo las diferentes condiciones de pH se correlacionan con la cantidad de proteína extraída de las ICP. También se observó una tendencia constante, en la que la actividad larvicida y hemolítica de las ICP de *Bti* se presentó a valores de pH menores que en *Btm* y *Btmed*. La hemólisis causada por las



proteínas solubilizadas de *Btmed* sugiere que la mayoría de las cepas de *Bt* identificadas hasta el momento, contienen proteínas citolíticas (Gill et al. 1987; Thomas & Ellar 1983); además, al menos en las subespecies *Bti*, *Btm*, y *Btmed*, esta actividad biológica es causada por proteínas de bajo peso molecular (25-30 kDa). En todas las subespecies que son activas contra larvas de mosquitos a nivel de ng/ml hay una relación inmunológica de las proteínas de bajo peso molecular. Como en el caso de *Bti* y *Btm*, se ha demostrado que las proteínas hemolíticas son los componentes de bajo peso molecular de las

ICP. Específicamente se ha podido demostrar que en el caso de *Btmed*, la proteína de 30 kDa es la responsable de la actividad hemolítica y que la hemólisis parcial causada por las fracciones que contienen la proteína de 68 kDa puede ser debida a contaminación con la proteína de 30 kDa obtenida en los experimentos de purificación por filtración del gel. En los experimentos de solubilización de las proteínas por tratamientos a diferentes valores de pH, la mortalidad y la actividad hemolítica aparecen a medida que se incrementa el pH, lo que indica que la mayoría de las proteínas de las ICP se

solubilizan a pH alcalinos. Contrario a lo que obtuvo Koller et al. (1992), trabajando con las ICP de *Bt* var *san diego*, no se detectaron proteínas en los tratamientos ácidos por debajo de un pH de 4,01 en ninguna de las cepas de *Bt* evaluadas. Gringorten et al. (1992) demostraron que las solubilización de las ICP de *Btk* requieren un ambiente alcalino para poder retener su actividad total; sin embargo, en los experimentos de toxicidad, la neutralización de los tratamientos de extracción en ambientes alcalinos no evitó la expresión de la actividad tóxica, como se muestra en la Figura 1.

El papel de las cuatro principales proteínas (CryIVA, CryIVB, CryIVD y CytA) de *Bti* en la toxicidad es controvertido (Wu y Chang 1985; Ibarra y Federici 1986; Pfannenstiel et al. 1986; Visser et al. 1986; Thiéry 1987). Recientemente se ha demostrado que la proteína CytA no es esencial en la toxicidad para larvas de *Culex* sp. y *Aedes* sp., y que las proteínas CryIVA and CryIVB son responsables de la mayor parte de la toxicidad en *C. pipiens* (Delécluse et al. 1991). La sinergia de las proteínas CryIVA y CryIVB ha sido demostrada por Angsuthanasombat et al. (1992) y Delécluse et al. (1993). Sin embargo, el análisis de los resultados obtenidos por Chilcott y Ellar (1988), evaluados por el método de Tabashnick (1992), ha demostrado que la proteína de 27 kDa de *Bti* interactúa sinérgicamente con las proteínas de 68 y 130 kDa. El efecto de las mezclas de proteínas de *Btmed* también se evaluó en bioensayos con larvas de mosquito y los resultados se analizaron por medio de la fórmula descrita por Tabashnick (1992). Se hizo claro que únicamente la mezcla de las proteínas de 68 y 30 kDa producía un efecto de sinergia (Tabla 3). La mezclas de las fracciones que contienen las proteínas de 94, 65 y 28-30 kDa produjeron sólo un ligero incremento en la toxicidad. Previamente se ha demostrado que las diferencias en la actividad tóxica entre *Btmed*, *Btm*, y *Bti* contra *C. quinquefasciatus*, *Anopheles albimanus* Wiedeman y *Aedes aegypti* (L.) podría ser debida a la ausencia de las proteínas de 125-135 kDa en *Btmed*, la presencia de la proteína de 94 kDa en *Btmed*, la falta de similaridad inmu-

Tabla 2. Porcentaje de hemólisis de glóbulos rojos de cordero causado por las diferentes proteínas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* separadas en la columna de Sephacryl S-200

No. de fracción	Tamaño de proteína (kDa)	Porcentaje de hemólisis ^a
20	94	0
21	94	0
22	94	0
23	94	0
24	94	0
25	94	0
26	68	35
27	68	35
28	68	60
29	68	100
30	28-30	100
31	28-30	100
32	28-30	100
33	28-30	100
34	28-30	100
35	28-30	100

a: Las proteínas solubilizadas se probaron por duplicado en dos días diferentes.

Tabla 3. Mortalidad observada y esperada de larvas de primer instar de *Culex quinquefasciatus* tratadas con las fracciones enriquecidas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*

Toxina(s) (proporciones)	CL ₅₀ ng de proteína/ml, (proporciones) observado	Esperado
94	82,6	
68	1256	
30	1.948,5	
94+68 [0,2:0,8]	430,4 [86,1:344,3]	326,9
94+30 [0,18:0,82]	373,8 [67,3:306,5]	384,6
68+30 [0,42:0,58]	857,8 [360,3:497,5]	1.582,1
94+68+30 [0,1:0,42:0,48]	351,8 [35,3:147,7:168,8]	558,2

a: Calculado según la fórmula descrita por Tabashnik (1992).

nológica con las cepas PG-14 de *Btm* y 1884 de *Bti* o a una combinación de estos factores (Orduz et al. 1992, 1994). La proteína de 94 kDa es el componente más importante de las toxinas de *Btmed* con una CL₅₀ de 82,6 ng de proteína/ml, en contraste con las observaciones hechas por Chilcott y Ellar (1988), quienes encontraron que el componente más importante de la ICP de *Bti* fué la proteína de 68 kDa con una CL₅₀ de 4 ng/ml.

La total concordancia inmunológica entre las proteínas de las ICP de *Bti* y *Btm* ha sido demostrada (Gill et al. 1987; Thiéry 1987) y la proteína de 27 kDa de estas dos subespecies difieren sólo en una base y un aminoácido (Earp y Ellar 1987; Galjart et al. 1987). En el presente trabajo se encontró una reacción cruzada de la pro-

teína de 30 kDa de *Btmed* y la proteína CytA de *Bti*, lo cual concuerda con resultados publicados previamente (Orduz et al. 1994). En otros estudios no se ha podido demostrar relaciones inmunológicas entre cepas activas para mosquitos como son *Bti* y las proteínas *Bt* subsp. *fukuokaensis* (Yu et al. 1987) y *Bt* subsp. *darmstadiensis* (Dobroniewski y Ellar 1989). Sin embargo, anticuerpos preparados contra las proteínas de 135 y 68 kDa de *Bti*, reconocen proteínas de 70 y 26 kDa de *Bt* subsp. *kyushuensis* (Held et al. 1990). De manera contraria, anticuerpos preparados contra las proteínas de las ICP de *Bt* subsp. *kyushuensis* reconocen proteínas de las ICP de *Bti*, cepa PG-14 de *Btm* y *Bt* subsp. *darmstadiensis* (Ishii y Ohba 1992). En el caso reportado por Held et al. (1990), anticuerpos monoclo-

nales preparados contra las proteínas de las ICP de *Bti* no dan reacción cruzada. Estos datos sugieren que de alguna manera, las cepas de *Bt* activas para mosquitos comparten epitopes comunes, lo cual podría indicar la presencia de estructuras comunes.

Conclusiones

El papel de la proteína de 94 kDa de *Btmed* en la toxicidad de las ICP ha sido demostrado. Este estudio también contiene información pertinente sobre las características de las ICP de *Btmed*. La actividad biológica en esta subespecie de *Bt* es derivada de proteínas que son inmunológicamente diferentes de aquellas previamente conocidas con actividad para larvas de mosquito. Además, la actividad hemolítica de la proteína de 30kDa de *Btmed* está de acuerdo al tamaño de las proteínas producidas por *Bti* y *Btm*, con las que ha mostrado una relación inmunológica. Estudios posteriores con cepas recombinantes con genes de *Btmed* y *Bti* producirá información importante sobre el modo de acción y las relaciones de estas moléculas biológicamente importantes, que podría llevar al desarrollo e implementación de una bacteria con los genes de *Btmed* en los programas de control de mosquitos.

Agradecimientos

Esta investigación recibió ayuda financiera del Banco Mundial/OMS/TDR, Colciencias y la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB).

Bibliografía

ANGSUTHANASOMBAT, C.; CRICKMORE, N.; ELLAR, D.J. 1992. Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism *in vivo*. Federation of European Microbiology Society, Microbiology Letters (Holanda) v. 94, p. 63-68.

ARONSON, AL.; BECKMAN, W.; DUNN, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiological Reviews (Estados Unidos) v. 50, p. 1-24.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry (Estados Unidos) v. 72, p. 248-254.

- CHILCOTT, C.N.; ELLAR, D.J. 1988. Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins *in vivo* and *in vitro*. Journal of General Microbiology (Reino Unido) v. 134, p. 2551-2558.
- DELÉCLUSE, A.; CHARLES, J.F.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. 1991. Deletion by *in vivo* recombination shows that the 28-kilodalton cytolytic polypeptide from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is not essential for mosquitocidal activity. Journal of Bacteriology (Estados Unidos) v. 173, p. 3374-3381.
- ; PONCET, S.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. 1993. Expression of cryIVA and cryIVB genes, independently or in combination, in a crystal-negative strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Applied and Environmental Microbiology (Estados Unidos) v. 59, p. 3922-3927.
- DOBRONESKI, F.A.; ELLAR, D.J. 1989. Purification and properties of a 28-kilodalton hemolytic and mosquitocidal protein toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73-E-10-2. Journal of Bacteriology (Estados Unidos) v. 171, p. 3060-3067.
- DU, C.; MARTIN, P.A.W.; NICKERSON, K.H. 1994. Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals. Applied and Environmental Microbiology (Estados Unidos) v. 60, p. 3847-3853.
- EARP, D.J.; ELLAR, D.J. 1987. *Bacillus thuringiensis* var. *morrisoni* strain PG-14 nucleotide sequence of a gene encoding a 27 kDa crystal protein. Nucleic Acids Research (Reino Unido) v. 15, p. 3619.
- FEITELSON, J.S.; PAYNE, J.; KIM, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. Bio/Technology (Estados Unidos) v. 10, p. 271-276.
- GALJART, N.J.; SIVASUBRAMAMAN, N.; FEDERICI, B.A. 1987. Plasmid location, cloning and sequence analysis of the gene encoding a 27.3 kilodalton cytolytic protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* (PG-14) Current Microbiology (Estados Unidos) v. 16, p. 171-177.
- GILL, S.S.; HORNUNG, J.M.; IBARRA, J.E.; SINGH, G.J.P.; FEDERICI, B.A. 1987. Cytolytic activity and immunological similarities of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* isolate PG-14 toxins. Applied and Environmental Microbiology (Estados Unidos) v. 53, p. 1251-1256.
- GOLDBERG, L.J.; MARGALIT, J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosquito News (Estados Unidos) v. 37, p. 355-358.
- GRINGORTEN, J.L.; MILNE, R.E.; FAST, P.G.; SOSHI, S.S.; VAN FRANKENHUYZEN, K. 1992. Suppression of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin activity by low alkaline pH. Journal of Invertebrate Pathology (Estados Unidos) v. 60, p. 47-52.
- HELD, G.A.; KAWANISHI, C.Y.; HUANG, Y.S. 1990. Characterization of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*. Journal of Bacteriology (Estados Unidos) v. 172, p. 481-483.
- HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiological Reviews (Estados Unidos) v. 53, p. 242-255.
- HUBER, H.E.; LÜTHY, P. 1981. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: Composition and activation. In: E.W. Davidson (Ed.). Pathogenesis of invertebrate microbial diseases. Allenheld, Osmun and Co., Totowa (Estados Unidos) p. 209-267.
- IBARRA, J.E.; FEDERICI, B.A. 1986. Isolation of a relatively non toxic 65-kilodalton protein inclusion from parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Journal of Bacteriology (Estados Unidos) v. 165, p. 527-533.
- ISHII, T.; OHBA, M. 1992. Immunological relationship between parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis* serovar *kyushuensis* and three other mosquito specific *Bacillus thuringiensis* strains. Journal of General and Applied Microbiology (Japón) v. 38, p. 385-389.
- KOLLER, C.N.; BAUER, L.S.; HOLLINGWORTH, R.M. 1992. Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* native delta endotoxin crystals. Biochemistry and Biophysics Research Communications (Estados Unidos) v. 184, p. 692-699.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (Reino Unido) v. 227, p. 680-685.
- ORDUZ, S.; DIAZ, T.; THIÉRY, I.; CHARLES, J.F.; ROJAS, W. 1994. Crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* serovar *medellin*. Applied Microbiology and Biotechnology (Estados Unidos) v. 40, p. 794-799.
- ORDUZ, S.; ROJAS, W.; CORREA, M.M.; MONTOYA, A.E.; DE BARJAC, H. 1992. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. Journal of Invertebrate Pathology (Estados Unidos) v. 59, p. 99-103.
- PFANNENSTIEL, M.A.; COUCHE, G.A.; ROSS, E.J.; NICKERSON, K.W. 1986. Immunological relationships among proteins making up the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystalline toxin. Applied and Environmental Microbiology (Estados Unidos) v. 52, p. 644-649.
- TABASHNICK, B.E. 1992. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. Applied and Environmental Microbiology (Estados Unidos) v. 58, p. 3343-3346.
- THIÉRY, I. 1987. Similarities between crystal protein subunits of *Bacillus thuringiensis* strain 1884 serotype H14 and strain PG-14 serotype H8a,8b, and their relationship with mosquitocidal activity. Annual Institut Pasteur/Microbiology (Francia) v. 138, p. 457-470.
- THOMAS, W.E.; ELLAR, D.J. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal d-endotoxin: Effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. Journal of Cell Science (Reino Unido) v. 60, p. 181.
- TYRELL, D.J.; BULLA, L.A.; ANDREWS, R.E.; KRAMER, K.J.; DAVIDSON, L.I.; NORDIN, P. 1981. Comparative biochemistry of entomocidal parasporal crystals of selected *Bacillus thuringiensis* strains. Journal of Bacteriology (Estados Unidos) v. 145, p. 1052.
- VISSER, B.; VAN WOKUM, M.; DULLEMANS, A.; WAALWIJK, C. 1986. The mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* is associated with Mr 230000 and 130000 crystal proteins. Federation of European Microbiology Societies, Microbiology Letters (Holanda) v. 30, p. 211-214.
- WU, D.; CHANG, F.N. 1985. Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal. Federation of European Biochemistry Societies Letters (Holanda) v. 190, p. 232-236.
- YU, Y.M.; OHBA, M.; AIZAWA, K. 1987. Synergistic effects of the 65- and 25 kilodalton proteins of *Bacillus thuringiensis* strain PG-14 (serotype 8a:8b) in mosquito larvicidal activity. Journal of General and Applied Microbiology (Japón) v. 33, p. 459-462.