

RECUPERACION DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* POR REAISLAMIENTO.

Alma Lorena Vicenteño ⁽¹⁾, Georgina Calderón ⁽¹⁾, Reynold Farrera ⁽¹⁾ y Mayra De la Torre ⁽²⁾. ⁽¹⁾Depto. de Ingeniería Bioquímica, ENCB-IPN- Carpio y Plan de Ayala s/n, Casco de Santo Tomás. C.P. 11340 México, D.F. ⁽²⁾Depto de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN. Av. IPN # 2508, Col. San Pedro Zacatenco C.P. 07360 México, D.F. Fax 5729-6300 Ext. 62359 E-mail rfarrera@bios.encb.ipn.mx

Palabras clave: *Recuperación, Virulencia. Bacillus thuringiensis*

Introducción. *Bacillus thuringiensis* (Bt) es un bacilo aeróbico que sobreproduce en la esporulación la proteína entomopatógena Cry, hasta formar un cristal paraesporal. Las cepas de producción de Bt, pierden su virulencia por las resiembras sucesivas. Esta “degeneración” se acompaña de una disminución del tamaño o pérdida de los cristales.

Aunque es común limitar el número de pases de las cepas, no se han descrito técnicas para recuperar cepas de Bt que ya degeneraron. Se ha demostrado que si se logra infectar al insecto con Bt degenerado (pase por insecto), las poblaciones de bacilos reaislados pueden recuperar sus características entomopatógenas,¹ pero esto puede deberse a que las cepas degeneradas de Bt tienen subpoblaciones que aún producen cristales grandes y tóxicos y que la sola selección por reaislamiento podría recuperar esas cepas productoras aún sin el pase por insecto.

El objetivo del presente trabajo fue recuperar cepas productoras a partir de cepas degeneradas por medio de pases de reaislamiento sucesivos y sin el pase por insecto.

Metodología. Se sembraron e incubaron en agar nutritivo diluciones de esporas de la cepa degenerada. En dos etapas consecutivas de reaislamiento se seleccionaron alternativamente colonias sin sectorizaciones ni placas líticas y de ellas, cepas con cristales grandes y homogéneos. Las cepas finales seleccionadas, se sometieron a pruebas de crecimiento en matraces agitados con medio de Rowe², para verificar que los crecieran sin malformaciones y sin expresar fagos y que mantuvieran los cristales grandes. La producción relativa de Cry se cuantificó por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y densitometría. Por último La producción relativa de Cry en reactor agitado de la mejor cepa se comparó contra la cepa degenerada.

Resultados y Discusión. De cincuenta colonias sin sectorizaciones ni placas líticas se seleccionaron 7 colonias con cristales grandes y homogéneos. De la propagación de ellas se escogieron 27 colonias sin sectorizaciones o placas líticas de entre ellas las 7 de cristales mayores. De la propagación de ellas, se seleccionaron 17 colonias con la mejor morfología colonial y después 6 cepas que en general mostraban abundancia de cristales de tamaño mediano y homogéneo. En medio líquido las 6 cepas crecieron sin mostrar malformaciones, pero produjeron cantidades diferentes de proteína Cry, determinadas por SDS-PAGE,

contra cantidades conocidas de albúmina de suero bovino (Figura 1 y Cuadro 1). La cepa degenerada original no muestra banda de Cry al ser sometida a SDS-PAGE.

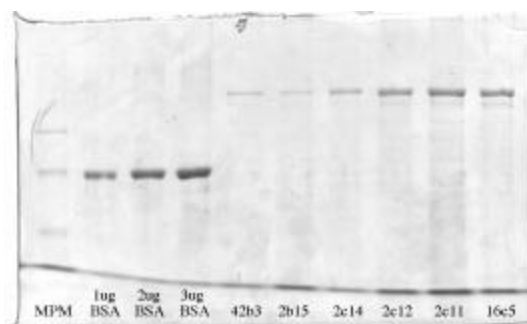


Fig 1. Gel de SDS-PAGE con las cepas finales en medio líquido. MPM: Marcadores de pesos moleculares.

Cuadro 1. Concentración de proteína Cry producida en medio líquido en gramos por litro de proteína BSA.

Clave de la cepa.	Conc. de Cry g/L.
Cepa degenerada original	No detectable.
42b3	0.1215
16c5	0.9842
2c11	1.3805
2c12	0.9902
2c14	0.2280
2b15	0.1047

Conclusiones. A partir de una selección por reaislamiento se puede obtener una cepa de Bt sin problemas de degeneración y con presencia de cristales abundantes, de tamaño mediano y homogéneo. No es indispensable al pase por insecto para poder recuperar una cepa de *Bacillus thuringiensis* que presente problemas de degeneración.

Agradecimientos. Trabajo apoyado por el proyecto CGPI 990402. G. Calderón y R. Farrera son Becarios de COFAA.

Bibliografía.

- Farrera, R.R. (1998) *Efecto del medio de cultivo sobre la esporulación y síntesis de cryIA(c) en Bacillus thuringiensis var. kurstaki HD-73*. Tesis Doctoral CINVESTAV-IPN.
- Rowe, G.E. Margaritis, A (1994) Endocellular fatty acid composition during batch growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis kurstaki*. *J Ferment Bioeng* vol(77):503-507.