

EFFECTO DE LA LIMITACION DE OXIGENO DURANTE LA ESPORULACION Y EXPRESION DE *cryIA* EN *Bacillus thuringiensis*.

Ruth López Alcántara, Mayra de la Torre Martínez
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN
Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, C.P. 07300, México D.F.
Tel: 57473800 ext. 4360 Fax: 57473800 ext. 4305, mmdelato@mail.cinvestav.mx

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, *Cry*, esporas

Introducción. Las proteínas *Cry* insecticida de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) se sintetizan simultáneamente durante el proceso de esporulación y se acumulan en la célula madre como un cristal. Numerosos informes han señalado que el oxígeno juega un papel muy importante en la fase de esporulación y en la actividad biológica de *Bt* (1). Sin embargo, poco se ha mencionado del efecto que producen cambios ambientales en el metabolismo y la expresión de *cry*.

El objetivo de este trabajo es tratar de entender la interacción de la limitación de oxígeno, la esporulación y la expresión de *cryIA* durante la fermentación de *Bt*. Para este fin se utilizó una fusión *LacZ* promotor de *cryIA* como gen reportero, para observar claramente el inicio del proceso de esporulación y expresión de los genes *cry* en un medio limpio en cultivos por lote.

Metodología. Se utilizó una cepa recombinante de *Bt* *Cry*(-) pHT304-18Z, el plásmido contiene un fragmento de 362 pares de bases que contiene la región promotora de *cryIAa* (2). Se utilizó un medio de cultivo complejo formulado según Rowe en fermentaciones por lote en un reactor Applikon ADI 1030 de 2 L. Las condiciones de operación fueron: aireación de 1 vvm y 600 rpm para mantener una DO arriba de 60% y pH controlado a 7.4. En experimentos con limitación de oxígeno, se redujo la velocidad de agitación a 300 rpm después de 8 horas de iniciada la fermentación. Se tomaron muestras cada 2 horas para cuantificar algunos ácidos orgánicos en el sobrenadante y actividad de β -galactosidasa en las células.

Resultados y Discusión. La figura 1 muestra la cinética de las fermentaciones con y sin limitación de oxígeno a partir de la fase de transición. La fase exponencial terminó alrededor de las 8 horas y se inició la etapa de transición. La concentración de oxígeno disuelto (DO) durante el crecimiento exponencial fue superior al 60% de saturación de aire. Cuando se induce la limitación de oxígeno al inicio de la fase de transición, la producción de esporas y β -gal disminuyen aproximadamente en un 92% y 72% respectivamente. Por otro lado, se observó un aumento en la producción de ácido láctico y disminución de oxálico, cuando se indujo la limitación de oxígeno en el cultivo.

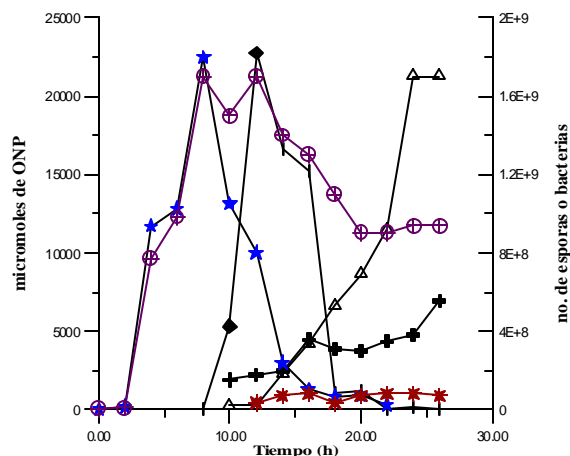


Fig 1. Efecto de la limitación de oxígeno en la producción de betagal. y esporas. Los símbolos se refieren a:

- ◆ micromoles ONP (con O₂)
- ▲ no. esporas (con O₂)
- ★ no. de bacterias (con O₂)
- ✚ micromoles ONP (lim O₂)
- ⊕ no. de bacterias (lim. O₂)
- ✳ no. de esporas (lim. O₂)

Conclusiones. Aún cuando los procesos de síntesis de β -gal y producción de esporas se llevan a cabo simultáneamente, el efecto del oxígeno en ambos casos parece ser diferente, ya que los cambios en el comportamiento de la producción del número de esporas y síntesis de β -gal no son proporcionales.

Agradecimientos. PPF (CINVESTAV). Conacyt, proyecto Z-001 y beca de Eric López. D. Lereclus por el plásmido y B. Xoconostle por la cepa.

Bibliografía.

- Foda, M.S., Salama, H.S., Selim, M. (1985). Factors affecting growth physiology of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22: 50-52.
- Bravo, A., Salamitou, S., Agaisse, H., Lereclus, D. (1996). Analysis of *CryIAa* expressions in *sigE* and *sigK* mutants of *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Gen. Genet.* 250: 734-741.