

Detección de beta exotoxinas en aislamientos de *Bacillus thuringiensis* nativos de Cuba

Detection of beta-exotoxins in isolates of *Bacillus thuringiensis* native to Cuba

Aileen González Rizo,^I Zulema Menéndez Díaz,^I Israel García García,^I Jorge Anaya Martínez,^I Raúl González Broche,^I Irma R Calderón Camacho,^I Yamilé Baró Robaina,^{II} Ariamys Companioni Ibañez,^I René Gato Armas^I

^I Departamento de Control de Vectores. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". IPK. La Habana, Cuba.

^{II} Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, INISAV. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: *Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram positiva esporulada, conocida principalmente por su patogenicidad contra insectos. Algunas cepas sintetizan metabolitos secundarios termoestables análogos de nucleosidos identificados como beta exotoxinas. La organización Mundial de la Salud ha recomendado que no se utilicen cepas de *Bacillus thuringiensis* productoras de beta exotoxinas para el control de insectos por su inespecífico rango de acción y su toxicidad contra células de mamíferos.

Objetivo: detectar mediante bioensayos la presencia de beta exotoxinas en aislamientos cubanos de *Bacillus thuringiensis* con actividad entomopatígena contra *Aedes aegypti* (Linneaus, 1762).

Métodos: se colocaron huevos de *Aedes aegypti* en 500 mL de agua a 37 °C hasta su eclosión, se añadió 66 mg de harina de pescado en 10 mL del sobrenadante del cultivo autoclaveado. Diariamente se contaron los individuos vivos hasta los 7 días. Los datos de mortalidad fueron procesados estadísticamente mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y comparación múltiple de Tukey. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para $p < 0,05$. Se corroboró la presencia de beta exotoxinas de manera directa mediante espectrofotometría.

Resultados: se detectó la presencia de beta exotoxinas por los dos métodos aplicados en un solo aislamiento (A51).

Conclusiones: la ausencia de beta exotoxinas en 11 aislamientos con marcada actividad entomopat6gena contra *Aedes aegypti* ratifica su potencialidad para el desarrollo de nuevos biolarvicidas.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*; beta exotoxinas; toxinas bacterianas; bioensayos; *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Introduction: *Bacillus thuringiensis* is a sporulated gram-positive bacterium, well known mainly for its pathogenic action against insects. Some strains synthesize thermostable nucleoside analog secondary metabolites identified as beta-exotoxins. The World Health Organization has recommended that beta-exotoxin-producing *Bacillus thuringiensis* strains not be used for insect control, due to their unspecific range of action and their toxicity to mammalian cells.

Objective: Detect by means of bioassays the presence of beta-exotoxins in Cuban isolates of *Bacillus thuringiensis* with entomopathogenic activity against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).

Methods: *Aedes aegypti* eggs were put in 500 mL water at 37 °C until eclosion. Next, 66 mg fish flour were added to 10 mL of the supernatant of the autoclaved culture. Living individuals were counted daily for 7 days. Statistical processing of mortality data was conducted with one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison. The differences found were considered to be statistically significant for $p < 0.05$. The presence of beta-exotoxins was directly confirmed by spectrophotometry.

Results: The presence of beta-exotoxins was detected by the two methods applied in only one isolate (A51).

Conclusions: Absence of beta-exotoxins in 11 isolates with marked entomopathogenic activity against *Aedes aegypti* confirms their potential for the development of new biolarvicides.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; beta-exotoxins; bacterial toxins; bioassays; *Aedes aegypti*.

INTRODUCCI3N

Las enfermedades transmitidas por vectores constituyen un grave problema a nivel mundial. La disminuci3n de su impacto en la sociedad depende de las intervenciones que se lleven a cabo para el control de los vectores.¹ Formulaciones en base a *Bacillus thuringiensis* son ampliamente utilizadas a escala mundial para el control larvario de d6pteros de importancia m6dica.² Esta bacteria Gram positiva esporulada, produce diversas toxinas pat6genas contra insectos. Se destacan las Cry y Cyt que son sintetizadas durante la fase de esporulaci3n y muestran toxicidad selectiva a nivel del orden de insectos. Sin embargo, durante el crecimiento vegetativo algunas cepas secretan al medio metabolitos secundarios, termoestables an6logos de nucleosidos con amplio rango de acci3n, identificados como beta exotoxinas.^{3,4} En 1959 se detect3 actividad t3xica contra gran n6mero de especies

de insectos de los sobrenadantes autoclaveados de cultivos de *Bacillus thuringiensis*.⁴ La organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado que no se utilicen cepas de *Bacillus thuringiensis* productoras de beta exotoxinas para el control de insectos, o al menos que los productos comerciales se encuentren libres de ellas.^{4,5}

Se han descrito varios métodos para la detección de beta exotoxinas pero los fundamentales son la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, siglas en inglés) y los bioensayos con larvas de *Musca domestica*.⁶⁻⁸

El laboratorio de control biológico del Instituto "Pedro Kourí" (IPK), La Habana, Cuba, cuenta con numerosos aislamientos autóctonos con elevada actividad entomopatogena contra dípteros de importancia médica.^{9,10} El desarrollo de nuevos biolarvicidas a partir de ellos depende, en gran medida, de que carezcan de capacidad para sintetizar beta exotoxinas. Por lo que en este estudio nos propusimos detectar mediante bioensayos la presencia de beta exotoxinas en aislamientos cubanos de *Bacillus thuringiensis* con actividad entomopatogena contra *Aedes aegypti* (Linneaus, 1762).

Para lo cual se diseñó un protocolo que incluyó la centrifugación para eliminar las células, esporas y cristales de los cultivos y se autoclavearon para eliminar otros factores de virulencia asumiendo que las beta exotoxinas son termoestables. Con el producto final se realizó un bioensayo para determinar el efecto sobre *Aedes aegypti*.

Bacillus thuringiensis: HD-1 y NRD-12, controles negativo y positivo de producción de beta exotoxinas, respectivamente (suministradas por el Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal INISAV, La Habana, Cuba). IPS-82 (estándar Internacional, Instituto Pasteur, Paris, Francia, *Bacillus thuringiensis* serotipo H-14).

Aislamientos nativos: A21, A51, C17, L95, L910, M29, R84, R85, R87, R89, U81, X48 pertenecientes a la colección del laboratorio control biológico del IPK.

Aedes aegypti: Cepas Rockefeller, suministrada por el CDC de San Juan, Puerto Rico

Tanto las cepas controles como los aislamientos nativos fueron reactivadas en caldo nutriente PH 7,0 por 24 h a 37 °C agitación orbital a 150 rpm. Se transfirió 2 mL del inóculo a Erlenmeyers con 200 mL de caldo nutriente suplementado con sales inorgánicas (MgSO₄ 12,5 mM; MnSO₄ 0,05 mM; FeSO₄ 1,2 mM; ZnSO₄ 1,2 mM; CaCl₂ 25 mM) y se incubaron 72 h en agitación orbital a 150 rpm 30 °C. Se centrifugó 25 mL de este cultivo a 3000 rpm 4 °C, hasta lograr una completa clarificación. El precipitado se descartó y el sobrenadante se autoclaveó a 121 °C por 20 min y conservó a -20 °C.

Se colocó 100 huevos de *Aedes aegypti* (cepa Rockefeller) en 500 mL de agua a 37 °C y se verificó la eclosión a las 4 h. Se añadió 66 mg de harina de pescado como alimento, suspendidos en 10 mL del sobrenadante del cultivo autoclaveado. El procedimiento se repitió durante 5 días consecutivos. Las larvas fueron introducidas en jaulas cuando alcanzaron el IV estadio. Diariamente se contaron los individuos vivos según el desarrollo y se concluyó el experimento a los siete días. Los bioensayos se repitieron cuatro veces en semanas diferentes. Se calculó las medias de mortalidad y se compararon estadísticamente mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA). Las diferencias entre los grupos fueron analizadas mediante la prueba de Tukey, considerando una $p < 0,05$.

Se determinaron los espectros de absorción de los cultivos clarificados y autoclaveados para corroborar la presencia de beta exotoxinas, siguiendo el procedimiento descrito por Galán y col 1994.¹¹

La cepa NRD-12 y el aislamiento nativo A51 exhibieron una elevada toxicidad (73,95 % y 65,5 % de mortalidad respectivamente) contra *Aedes aegypti*, (tabla), lo cual resultó estadísticamente significativo con respecto al control negativo y el resto de los aislamientos (ANOVA, F= 49,96 p< 0,05).

Tabla. Toxicidad de los sobrenadantes autoclaveados de aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis* sobre *Aedes aegypti*

Cepas y aislamientos	% de mortalidad
IPS-82	0
Control (-)	0,67
Control (+)	73,95
A21	0
A51	65,5
C17	1,9
L95	1,2
L910	3,22
M29	27,7
R84	5,44
R85	0,77
R87	2,6
R89	6,7
U81	13,2
X48	7,6

En la [figura](#) se muestran los espectros de absorción para los sobrenadantes de los aislamientos que ocasionaron más de un 10 % de mortalidad y los controles utilizados en el estudio. Al comparar los espectros de absorción se pudo determinar que solamente un aislamiento nativo con toxicidad presentó picos cercanos a los del control positivo para esta toxina, lo que ratifica los resultados obtenidos en los bioensayos.

Aunque análisis mediante HPLC es más rápido y presumiblemente más reproducible,^{6,12} no evidencia la acción directa de las beta exotoxinas sobre los insectos,¹³ además de ser necesario contar con un patrón puro de beta exotoxina para el análisis y de un equipamiento que no se encuentra presente en muchos laboratorios. Por lo que tradicionalmente se utilizan los bioensayos como método de referencia para detectar beta exotoxinas en las cepas de *Bacillus thuringiensis*.^{8,14-17}

En este trabajo se pudo determinar la ausencia de beta exotoxinas en 11 aislamientos con marcada actividad entomopatogena contra este vector, lo que permite ratificar su potencialidad para el desarrollo de biolarvicidas.

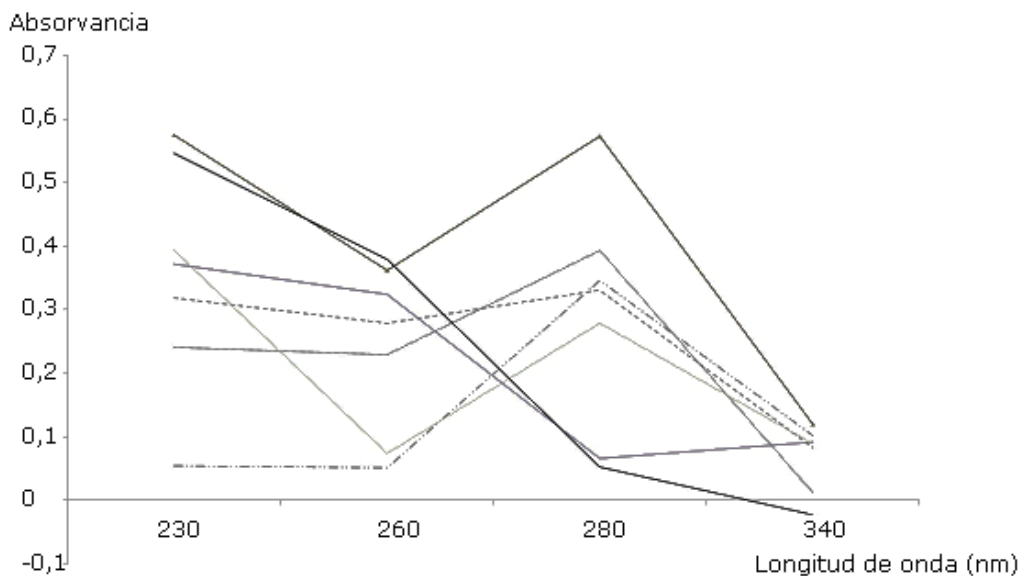


Fig. Espectros de absorción de luz ultravioleta de sobrenadantes autoclaveados de los cultivos de *Bacillus thuringiensis*, libres de células vegetativas endosporas y cristales. C(-) -C(+) --IPS-82 -A51 -M29 -U81—medio de cultivo estéril

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. Global Strategy for Dengue Prevention and Control. 2012-2020. WHO library Cataloguing in Publication Data ed. 2012.
2. Nartey R, Owusu-Dabo E, Kruppa T, Baffour-Awuah S, Annan A, Oppong S, et al. Use of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* as a viable option in an Integrated Malaria Vector Control programme in the Kumasi Metropolis, Ghana. *Parasites & Vectors*. 2013;6(116).
3. Palma L, Munoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins (Basel)*. 2014;6(12):3296-325.
4. Liu X, Ruan L, Peng D, Li L, Sun M, Yu Z. Thuringiensin: a thermostable secondary metabolite from *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against a wide range of insects. *Toxins (Basel)*. 2014;6(8):2229-38.
5. WHO. World Health Organization. Microbial Pest Control Agent: *Bacillus thuringiensis*. World Health Organization: Switzerland, Geneva. 1999.
6. Mac Innes TC, Bouwer G. An improved bioassay for the detection of *Bacillus thuringiensis* beta-exotoxin. *J Invertebr Pathol*. 2009;101(2):137-9.
7. Sauka DH, Perez MP, Lopez NN, Onco MI, Berretta MF, Benintende GB. PCR-based prediction of type I beta-exotoxin production in *Bacillus thuringiensis* strains. *J Invertebr Pathol*. 2014;122:28-31.
8. Hernandez CS, Ferre J, Larget-Thierry I. Update on the detection of beta-exotoxin in *Bacillus thuringiensis* strains by HPLC analysis. *J Appl Microbiol*. 2001;90(4):643-7.

9. Gonzalez A, Rodriguez G, Bruzon RY, Diaz M, Companionis A, Menendez Z, et al. Isolation and characterization of entomopathogenic bacteria from soil samples from the western region of Cuba. *J Vector Ecol.* 2013;38(1):46-52.
10. Gonzalez A, Diaz R, Diaz M, Borrero Y, Bruzon RY, Carreras B, et al. Characterization of *Bacillus thuringiensis* soil isolates from Cuba, with insecticidal activity against mosquitoes. *Rev Biol Trop.* 2011;59(3):1007-16.
11. Galán W, K A. Uso de un método sencillo para la detección de beta-exotoxina en cepas de *Bacillus thuringiensis*. *South Western Entomologist.* 1994;19(4):385-90.
12. de Rijk TC, van Dam RC, Zomer P, Boers EA, de Waard P, Mol HG. Development and validation of a confirmative LC-MS/MS method for the determination of ss-exotoxin thuringiensin in plant protection products and selected greenhouse crops. *Anal Bioanal Chem.* 2013;405(5):1631-9.
13. Gohar M, Perchat S. Sample preparation for beta-exotoxin determination in *Bacillus thuringiensis* cultures by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 2001;298(1):112-7.
14. Swiecicka I, Bideshi DK, Federici BA. Novel isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* that produces a quasicuboidal crystal of Cry1Ab21 toxic to larvae of Trichoplusiani. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(4):923-30.
15. Wellman-Desbiens E, Cote JC. Screening of the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains against *Lygushesperus* (Hemiptera: Miridae) nymphal population. *J Econ Entomol.* 2004;97(2):251-8.
16. Tsuchiya S, Kasaishi Y, Harada H, Ichimatsu T, Saitoh H, Mizuki E, et al. Assessment of the efficacy of Japanese *Bacillus thuringiensis* isolates against the cigarette beetle, *Lasioderma serricornis* (Coleoptera: Anobiidae). *J Invertebr Pathol.* 2002;81(2):122-6.
17. Sánchez-Soto A, Saavedra-González GI, Ibarra JE, Salcedo-Hernández R, Barboza-Corona JE, Del Rincón-Castro MC. Detection of β -exotoxin synthesis in *Bacillus thuringiensis* using an easy bioassay with the nematode *Caenorhabditis elegans*. *LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY* 2015; Accepted Article', doi: 10.1111/lam.12493.

Recibido: 2 de diciembre de 2015.

Aprobado: 26 de febrero de 2016.

Aileen González Rizo. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" Ave. Novia del Mediodía, Km 6 ½, La Lisa, La Habana, La Habana, Cuba.
Correo electrónico: aileen@ipk.sld.cu