

INFLUENCIA DE LOS NUTRIENTES SOBRE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE *BACILLUS THURINGIENSIS* LBT-25

Eslinda Fernández,¹ Orietta Fernández-Larrea¹ y Roberto Núñez**

¹ Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/5a. B y 5a. F, Miramar, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

² Instituto de Oceanología. Ave 1a. no. 18406 e/ 184 y 186, Reparto Flores, Playa, Ciudad de La Habana

RESUMEN

Se determinaron los valores necesarios de almidón, harina de soya y levadura torula para optimizar el medio de cultivo M10 seleccionado para la propagación de la cepa de *Bacillus thuringiensis* LBT-25. Se utilizó el modelo de crecimiento no restringido y un diseño 2³. En la optimización del M10 se debe tomar como centro del plan experimental concentraciones de almidón entre 1-5 g/L, por debajo de 3 y 8 g/L para la harina de soya y la levadura torula, respectivamente.

Palabras clave: medio de cultivo, optimización, cinética de crecimiento

ABSTRACT

The necessary values were determined to optimize the cultural media M10 selected for the propagation of the *Bacillus thuringiensis* LBT-25 strain. It was used the pattern of not restricted growth and a 2³ design. In the optimization of the M10 it should be taken like center of the experimental plan, concentrations of starch among 1-5 g/L; below 3 and 8 g/L for the soya flour and the yeast torula, respectively.

Key words: culture medium, optimization, kinetics of growth

INTRODUCCIÓN

Una alternativa para el control efectivo de plagas es el uso de insecticidas biológicos dentro de un programa de manejo integrado. Los insecticidas derivados del *Bt* constituyen el ejemplo más importante de este tipo de productos y ocupan la mayor parte del mercado mundial de bioinsecticidas [Juárez-Pérez, 1997]. Se han utilizado comercialmente por más de treinta y cinco años y han sido aceptados como productos biodegradables y de uso seguro para los vertebrados y el medio ambiente [Bravo *et al.* 1998].

Bt se caracteriza por producir una gran variedad de toxinas con diversas propiedades, dentro de las cuales las delta-endotoxinas y beta-exotoxinas se consideran las más importantes desde el punto de vista biológico. Las delta-endotoxinas se producen en forma de cuerpos de inclusión o cristales paraesporales y forman una familia de proteínas cuyos miembros pueden ser tóxicos contra diversos grupos de invertebrados: seis órdenes de insectos, nemátodos, ácaros, platelmintos y protozoos [Cerón *et al.*, 1995]. Específicamente la cepa LBT-25 es tóxica contra ácaros, nemátodos y coleópteros.

Es muy importante tener en cuenta el medio de cultivo por utilizar para la producción de las delta-endotoxinas, pues en la literatura se hace referencia a que diferentes medios pueden cambiar tanto la toxicidad hacia diferen-

tes insectos blanco como la potencia insecticida de productos obtenidos de la misma cepa [Salama *et al.*, 1983]. Yudina *et al.* (1992) y Farrera *et al.* (1998) demostraron que diferentes fuentes de nutrientes pueden afectar la velocidad de síntesis de las deltas endotoxinas y el tamaño de los cristales. Lo anteriormente planteado se demostró en el estudio de selección del medio M10 para la cepa LBT-25 [Fernández *et al.*, 2000].

También puede suceder que cepas diferentes en un mismo medio de cultivo tengan diferente producción de proteínas Cry, y esto puede estar dado por la existencia de multicopias de genes *cry*, promotores fuertes, o la existencia de un ARNm de larga vida [Agaïsse y Lereclus 1995; Baum y Malvar, 1995], por lo que el objetivo del presente trabajo es determinar la influencia que ejercen los distintos nutrientes del medio de cultivo M10 sobre la velocidad de crecimiento de la cepa de *Bacillus thuringiensis* LBT-25.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar el experimento se hizo crecer la cepa LBT-25 en el medio de cultivo M10: (g/L) almidón, 5,0; levadura torula, 10,0; harina de soya, 5,0; CaCO₃, 0,03, y se aplicó un diseño 2³. Se realizó un estudio cinético de la influencia de la concentración de la fuente de carbono en

el crecimiento del microorganismo, trabajando con concentraciones de almidón de 1, 2, 3, 5 y 7 g/L. El mismo estudio se realizó para las fuentes de nitrógeno. Para la levadura torula se ensayaron concentraciones de 3, 5, 7 y 10 g/L, y para harina de soya de 1, 2, 3, 5 y 7 g/L. Se tomó 1 mL de muestra cada dos horas, se le determinó concentración y estadio fisiológico de la bacteria. Finalmente se calcularon las velocidades específicas de crecimiento (μ) en la fase exponencial, utilizando el modelo de crecimiento no restringido.

Para los análisis de regresión realizados para los cálculos de velocidad específica se utilizó el programa EXCEL, 1997. La modelación de los datos del experimento de in-

hibición por sustrato se realizó con el programa CINFERT versión 2.1.

RESULTADOS

En este experimento se evaluó la influencia de la concentración de los componentes del medio M10 sobre la velocidad específica de crecimiento.

En las Figs. 1, 2 y 3 se presenta el comportamiento de los valores de la velocidad de crecimiento (μ) del cultivo de la cepa LBT-25, cuando se utiliza el almidón como fuente de carbono y energía, la harina de soya y la levadura torula como fuentes de nitrógeno principalmente.

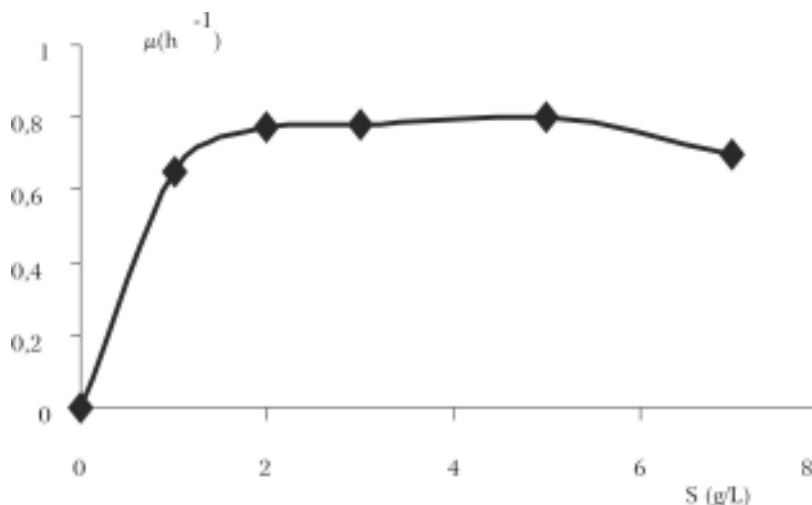


Figura 1a. Dependencia de μ con respecto a la concentración de almidón para el cultivo *Bacillus thuringiensis* LBT-25.

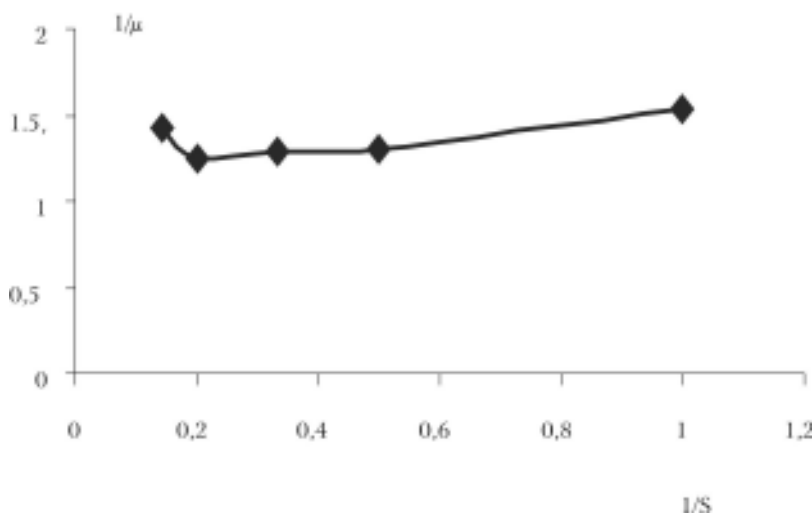


Figura 1b. Ploteo de $1/\mu$ vs. $1/S$ para el almidón.
 $1/\mu$: Inverso de la velocidad de crecimiento.
 $1/S$: Inverso de la concentración de sustrato.

En la Fig. 1a se puede apreciar que existen dos zonas muy bien delimitadas y una tercera que se observa parcialmente. Al inicio hay una dependencia lineal del valor de μ con respecto a la concentración de almidón, después una saturación, y por encima de concentraciones de almidón de 5 g/L el valor de μ disminuye ligeramente, por lo que se observa una desviación del modelo de Monod por la denominada inhibición por altas concentraciones de sustrato.

En la Fig. 2 se aprecia una zona donde existe una dependencia lineal, con pendiente positiva, del valor de μ con respecto a la concentración de harina de soya. Entre 1-3 g/L se muestra una saturación, y por último a concentraciones mayores que 3 g/L el valor de μ disminuye ligeramente con el aumento de la concentración, observándose inhibición en esta zona. Por esta razón es recomendable estudiar concentraciones por debajo de 1 g/L para calcular $\mu_{\text{máxima}}$.

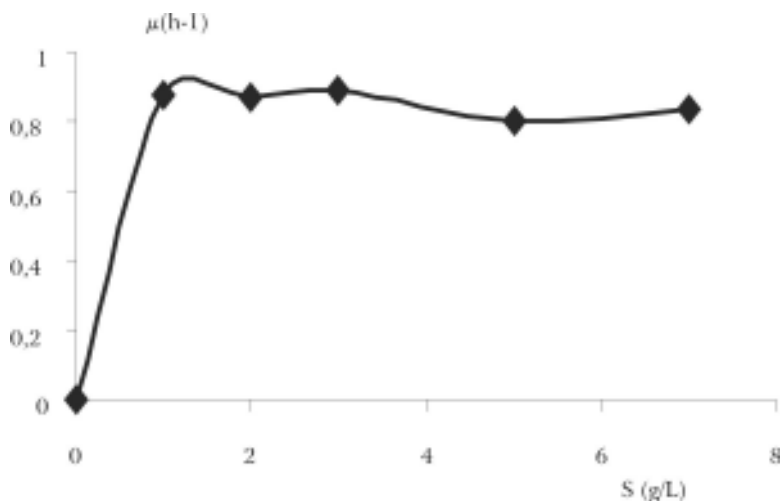


Figura 2a. Dependencia de μ con respecto a la concentración de harina de soya para el cultivo *Bacillus thuringiensis* LBT-25.

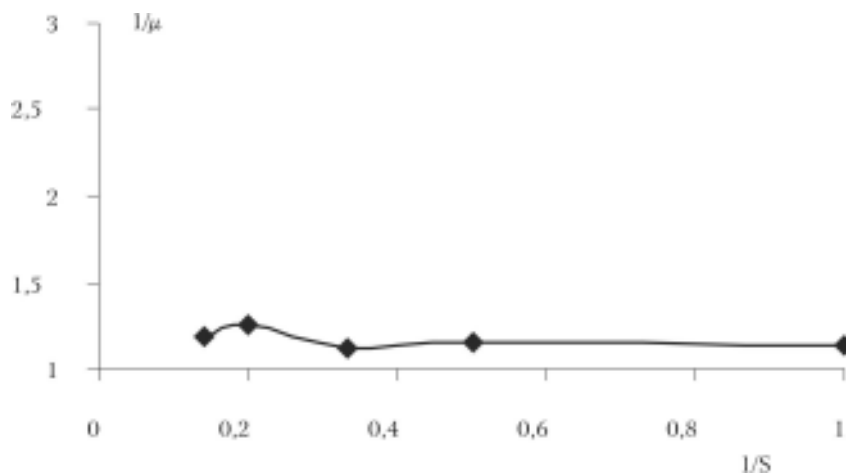


Figura 2 b. Ploteo de $1/\mu$ vs. $1/S$ para la harina de soya.
 $1/\mu$: Inverso de la velocidad de crecimiento.
 $1/S$: Inverso de la concentración de sustrato.

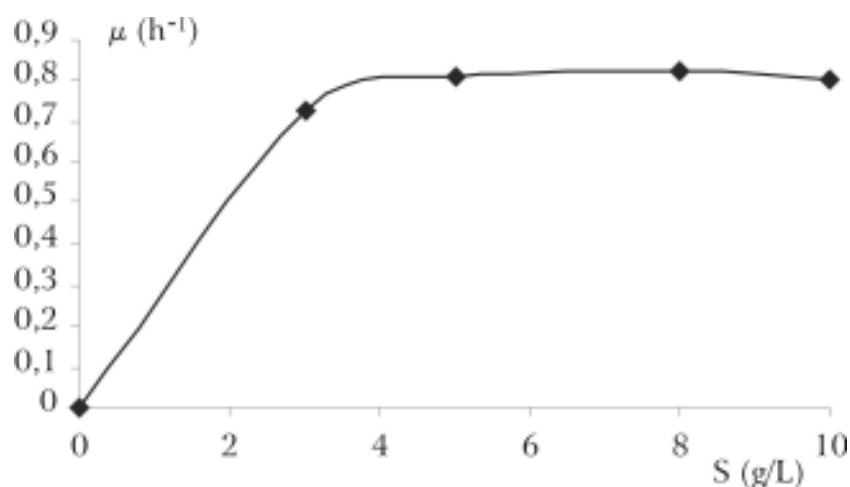


Figura 3a. Dependencia de μ con respecto a la concentración de levadura torula para el cultivo *Bacillus thuringiensis* LBT-25.

Para la levadura torula hasta 8 g/L no se observó inhibición por exceso de sustrato según la representación de los dobles recíprocos en el rango de concentraciones estudiado (Fig. 3a).

En la Tabla 1 se observan los parámetros cinéticos necesarios para aplicar el modelo Monod-Haldane.

Las concentraciones recomendadas para la optimización del almidón se encuentran entre 2-5 g/L, tomando como centro del diseño 3 g/L (Fig. 1).

Para la levadura torula se recomienda optimizar en la zona entre 5-10 g/L y tomar 7 g/L como centro del plan, con el fin de no provocar inhibición del crecimiento microbiano por altas concentraciones de sustrato y hacer la fermentación lo más económicamente posible.

Tabla 1. Valores de μ y K_s para los diferentes sustratos presentes en el medio de cultivo M10 para la cepa LBT-25

Sustratos	μ_{\max} (h ⁻¹)	K_s
Almidón	0,866 ± 0,018	0,320
Levadura torula	0,910 ± 0,062	0,743

Para el caso de la harina de soya no se pudieron determinar los parámetros cinéticos porque no se detectó claramente una zona de no inhibición en las condiciones de trabajo realizadas.

DISCUSIÓN

La mayoría de los sustratos son capaces de presentar una acción inhibitoria reversible sobre el crecimiento de las poblaciones microbianas [Goldberg, 1980; Koch, 1997]. Especialmente significativa es la capacidad inhibitoria de los sustratos constituyentes de los medios de cultivos industriales. Ellos como norma son inhibidores del creci-

miento. Los sustratos orgánicos de las aguas residuales, incluso la glucosa, el sustrato más habitual en los laboratorios de investigación, puede presentar una clara inhibición del crecimiento en muchos microorganismos al incrementar su concentración inicial en el medio de cultivo [Margaritis y Rowe, 1987; Pearson and Ward, 1988].

El análisis de las posibles vías de inhibición que pueden conducir a la disminución de la actividad metabólica de las células ha permitido obtener diferentes modelos de inhibición por sustratos [Núñez, 1988].

En el caso de la influencia de la concentración de los diferentes sustratos que componen el medio M10 se obtuvo una ligera inhibición para las concentraciones de almidón mayores que 5 g/L, que fue la utilizada en el medio para todos los experimentos.

La explicación de este fenómeno pudiera estar dada por la acumulación de altas concentraciones de algunos productos que pueden inhibir algunas enzimas clave de las rutas metabólicas centrales o los procesos de transporte, y en consecuencia hacer disminuir la velocidad de crecimiento de la población.

La inhibición que se presenta con más frecuencia es la causada por productos ácidos del metabolismo que cambian el pH del medio de cultivo. Se sabe que los iones H⁺ en numerosas reacciones enzimáticas pueden actuar como inhibidores no competitivos [Chávez, 1990], pero en nuestros experimentos no se tuvo en cuenta la influencia del pH.

Como explicamos anteriormente, se observa en nuestros resultados que la relación entre velocidad específica de crecimiento y la concentración de sustrato sigue una cinética de saturación. La μ también está en función de otras condiciones de crecimiento, como agitación, aeración, temperatura, condiciones redox del medio, productos intermediarios, cambio de las propiedades reológicas

del medio, sistemas de entrada de nutrientes a la célula, etc. [Koch, 1997; Beltán *et al.*, 2002].

Estos resultados concuerdan con los análisis derivados de la teoría de Monod a altas concentraciones de sustrato y del crecimiento lento de Koch (1997) a bajas concentraciones, a partir de las cuales se puede inferir que en los sistemas cerrados como el cultivo batch, la fase exponencial no puede desarrollarse indefinidamente porque se comience la fermentación con altas concentraciones de sustrato. Por el contrario, con este procedimiento se puede lograr una respuesta inversa en el crecimiento microbiano. De ahí que se haga necesario comenzar con cantidades de sustratos óptimas y alejadas de la zona de inhibición del crecimiento del microorganismo.

Si durante el proceso de cultivo se controlan determinados factores como el pH, la temperatura y se asume que no se forman productos inhibidores del crecimiento, la μ se hace sólo dependiente de la concentración de sustrato.

Generalmente entre los sustratos componentes del medio de cultivo hay uno que se consume a una mayor velocidad que los restantes, o rige el crecimiento porque es necesario para el crecimiento y buen desarrollo celular, el cual se nombra *sustrato limitante*. En este caso no sólo habría que tener en cuenta la cinética de crecimiento y de consumo de nutrientes, sino los mecanismos de entrada de estos a la célula y los modelos existentes [Koch, 1997; Ramla and Bassi, 2002].

Las fuentes de sustrato limitante más frecuentes son la fuente de carbono, la de nitrógeno o el aceptor final de electrones, como el oxígeno molecular o el nitrato. En este experimento aparentemente el sustrato limitante para el crecimiento es el almidón, y debe estar dada por la relación C-N, la cual por ser baja canaliza el metabolismo hacia el crecimiento celular.

CONCLUSIONES

- En la optimización del M10 se debe tomar como centro del plan experimental, concentraciones de almidón entre 1-5 g/L; por debajo de 3 y 8 g/L para la harina de soya y la levadura torula, respectivamente.

REFERENCIAS

Agaisse, H. y Lereclus, D.: «How Does *Bacillus thuringiensis* Produce So Much Insecticidal Crystal Protein», *J. Bacteriol.* 177: 6027-6032, 1995.

Andrew's: Substrate Inhibition Model of Cell Growth. Biochemical engineering. <http://www.cpi.edu/dept/chem.-eng/Biotech-Environ/GrowPresent/inhib.htm>. 2001.

Baum, J. M.; T. Malvar: «Regulation of Insecticidal Crystal Protein Production in *Bacillus thuringiensis*», *Mol Microbiol.* 18:1-12, 1995.

Beltrán, L.; S. Díaz; C. Verdugo; A. Zamora; G. Buitrago; N. Moreno: Culture Media Design for Fermentation of *Bacillus thuringiensis*. <http://www.ibon.una1.edu.co/rr21.html>, 2002.

Bravo, A.; S. Sarabia; L. López; H. Ontiveros; C. Abarca; A. Ortiz; R. Quintero: «Characterization of *Cry* Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection», *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 64 (12):4965-4972, 1998.

Cerón, J.; A. Ortiz; R. Quintero; L. Guereca; A. Bravo: «Specific PCR Primers Directed to Identify *CryI* and *CryIII* Genes Within a *Bacillus thuringiensis* Strain Collection», *Appl. Environ. Microbiol.* vol.61(11):3826-3831, 1995.

Chávez, P. M. A.; J. Díaz; U. Pérez; J. Delfí: *Temas de enzimología*, t. 1, Edición Revolucionaria, La Habana, 1990.

Farrera, R. R.; F. Pérez-Guevara; M. de la Torre: «Carbon:Nitrogen Ratio Interacts with Initial Concentration of Total Solids of Insecticidal Crystal Protein and Spore Production in *Bacillus thuringiensis* HD-73», *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49:758-765, 1998.

Goldberg, I.: «Optimization of Medium for a High Yield Production of Spore Crystal Preparation of *Bacillus thuringiensis* Effective Against the Egyptian Cotton Leaf Worm *Spodoptera littoralis* Boisid», *Biotechnol. Letters* 2(10): 419-126, 1980.

Juárez-Peréz, V.; M. Ferrandis; R. Frutos: «PCR-Based Approach for Detection of Novel *Bt. Cry* Genes», *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 63 (8):2997-3002, 1997.

Koch, J.: <http://www.helios.bto.edu.ac.uk/microbes/bt.htm>, 1997.

Koller, C. N.; L. S. Bauer; R. M. Hollingworth: «Characterization of the pH-Mediated Solubility of *Bacillus thuringiensis* Var. San Diego. Native δ -endotoxin Crystals», *Biochemical and Biophysical Research Communications* 184(2):692-699, 1992.

Núñez, R.: «Obtención del bioproducto IDO-225 para combatir derrames de petróleo en el mar». Tesis para optar por el título de Maestro en Ciencias Biológicas, 1998.

Pearson, D.; O. P. Ward: «Bio Insecticide Activity, Bacterial Cell Lyses and Proteolytic Activity in Cultures of *Bacillus thuringiensis* Subsp. *Israelensis*», *J. Applied Bacteriol.* 65(4):195-202, 1988.

Ramla, L.; A. S. Alf; M. W. Bassi: <http://palmailis.mpob.gov.my/webpubs/tt133.pdf>. 2002.

Salama, H. S.; M. S. Foda; H. T. Dulmage; A. El-Sharaby: «Novel Fermentation Media for Production of Delta-Endotoxins from *Bacillus thuringiensis*», *J. Invertebr. Pathol.* 41:8-19, 1983.

Yudina, T. G.; O. V. Salamakha; E. V. Olekhovich; N. P. Rogstyk; N. S. Egorov: «Effect of Carbon Source on the Biological Activity and Morphology of Parasporal Crystal from *Bacillus thuringiensis*», *Microbiology* 61:402-407, 1992.