

## Artículo original

# Desarrollo de un Dot blot para la detección de $\delta$ -endotoxinas Cry1Aa de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* en un medio de cultivo

Marubetsy Alcina<sup>a</sup>, Mariana C. Eleizalde<sup>b</sup>, Lucinda Tavares-Marques<sup>b</sup>, Roxana Gajardo<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biología Celular. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. <sup>b</sup>Grupo de Inmunobiología. Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios. Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos. Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez. Venezuela. <sup>c</sup>Laboratorio de Procesos Fermentativos. Instituto de Biología Experimental. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.

Recibido 4 de diciembre de 2019; aceptado 25 de junio de 2020

**Resumen:** *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) es el principal agente de control biológico de lepidópteros. Su producción como bioinsecticida requiere de medios de cultivo que permitan el crecimiento de la bacteria y la obtención de la  $\delta$ -endotoxina contenida en su cristal parasporal. En Venezuela, el desarrollo de metodologías que permitan evaluar la capacidad de *Btk* para producir cristales tóxicos ha sido limitado. Por este motivo, se planteó diseñar una prueba que permita detectar las  $\delta$ -endotoxinas, durante el desarrollo de un cultivo de *Btk* a través de inmunoensayos. Para ello, la proteína Cry1Aa purificada se empleó para la producción de un suero hiperinmune en modelo leporido. La cinética de anticuerpos fue monitoreada a través de un ELISAi, y el reconocimiento específico de la proteína por parte del suero fue verificado mediante Western blot y Dot blot. Finalmente, se evaluó la cinética de la síntesis de la proteína Cry1Aa, evidenciándose el incremento progresivo en el reconocimiento de esta proteína hasta la fase estacionaria del cultivo. Así, se logró la optimización de un método sencillo y reproducible para el seguimiento de la cinética de producción de esta  $\delta$ -endotoxina en un cultivo de *Btk*, lo que contribuirá en la evaluación de escalamientos en la producción de bioinsecticida.

**Palabras clave:** *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*; inmunodetección; Dot blot; proteína Cry1Aa; bioinsecticida.

## Development of a Dot blot for the detection of $\delta$ -endotoxins Cry1Aa from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in a culture medium

**Abstract:** *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) is the main biological control agent for lepidoptera. Its production as a bioinsecticide requires culture media that allow the bacteria to grow and produce the  $\delta$ -endotoxin contained in its parasporal crystal. In Venezuela, the development of methodologies that allow evaluating the capacity of *Btk* to produce toxic crystals has been limited. For this reason, it was proposed to design a test to detect  $\delta$ -endotoxins, during the development of a *Btk* culture through immunoassays. For this, the purified Cry1Aa protein was used for the production of a hyperimmune serum in a leporid model. Antibody kinetics was monitored through an ELISAi, and the specific recognition of the protein in the serum was verified by Western blot and Dot blot. Finally, the kinetics of Cry1Aa protein synthesis was evaluated, showing the progressive increase in the recognition of this protein until the stationary phase of the culture. Thus, the optimization of a simple and reproducible method for monitoring the kinetics of production of this  $\delta$ -endotoxin in a *Btk* culture was achieved, which will contribute to the evaluation of escalations in the production of bioinsecticide.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*; immunodetection; Dot blot; Cry1Aa protein; bioinsecticide.

\* Correspondencia:

E-mail: roxana.gajardo@ciens.ucv.ve

## Introducción

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es una bacteria grampositiva, esporogénica, perteneciente al grupo *Bacillus cereus* [1]. Esta bacteria ha sido aislada en diversos ambientes, incluyendo suelos, insectos, polvo almacenado en algunos

productos y en hojas de plantas coníferas y caducifolias [2-9]. Desde hace muchos años, *Bt* ha sido estudiado por su actividad patógena contra insectos de diferentes órdenes, siendo la variedad *kurstaki* (*Btk*) una de las más estudiadas por su actividad entomopatogénica contra larvas de lepidópteros [10]. La toxicidad selectiva de *Bt* se debe

a la presencia de diferentes proteínas denominadas Cry [1]. Así esta bacteria es el organismo más empleado en preparaciones de bioinsecticidas por su alta efectividad para controlar insectos plagas [11].

El ciclo de vida de *Bt* está caracterizado por dos etapas: la división de la célula vegetativa y el desarrollo de la espora. Esta última etapa comienza por el empobrecimiento de los nutrientes en el medio de cultivo el cual dura aproximadamente 12 horas e introduce una serie de cambios que culminan en la producción de dos compartimientos: el esporangio y la espora. Es allí cuando se producen los cristales con actividad entomopatógena [12], los cuales están constituidos por  $\delta$ -endotoxinas denominadas proteínas Cry [13]. Las proteínas Cry representan una gran familia que actualmente consta de aproximadamente 300 isoformas, divididas en 75 grupos. De estos grupos se ha reportado que las familias de proteínas Cry1 y Cry2 poseen  $\delta$ -endotoxinas que afectan principalmente a lepidópteros, y en menor medida a dípteros y coleópteros, siendo Cry1 el grupo más dominante con 41 holotipos representativos (Cry1Aa- Cry1Ld) [14].

El mecanismo de acción de las proteínas Cry es un proceso de varios pasos. Cuando el cristal es ingerido se solubiliza y procesa por medio de proteasas, a pH básico en el intestino de la larva. Una vez que la toxina se encuentra activa, se une a receptores específicos en la cara apical de la membrana epitelial del intestino medio del insecto. La unión de la toxina oligomérica a ese receptor, facilita la formación de poros en las células [15]. Los poros formados alteran el equilibrio de electrolitos y agua que conduce a la destrucción de las células columnares y caliciformes [16]. La destrucción de las células trae como consecuencia la parálisis del tracto digestivo de la larva del insecto, el cese de la ingesta de alimentos y por último, su muerte [17]. Adicionalmente, se puede producir un efecto sinérgico entre las  $\delta$ -endotoxinas y las esporas, ya que estas últimas al tener acceso al hemocele, pueden germinar y potenciar el efecto insecticida de la  $\delta$ -endotoxina que conforman el cristal de la bacteria [17].

En Venezuela, son escasas las investigaciones sobre *Bt* como bioinsecticida y la mayor parte de estas están centradas en la búsqueda y aislamiento de nuevas cepas [18-21]. En este sentido, el Laboratorio de Procesos Fermentativos cuenta con un amplio cepario de la bacteria, con aislados autóctonos de distintas regiones de Venezuela. Sin embargo, ha habido pocas investigaciones en torno al desarrollo de bioinsecticidas con base en este microorganismo, especialmente los concernientes a la formulación de medios de cultivo con subproductos agroindustriales de bajo costo, con miras a la producción a gran escala de *Bt* [22-24]. A pesar de ello, gracias a estos diseños de medios de cultivo, actualmente en el país se cuenta con un extenso número de formulaciones para el crecimiento de *Bt*, en los que se ha estimado de manera indirecta la formación del cristal a través del conteo de esporas. No obstante, esta no es una medida confiable de la cantidad de cristales que la bacteria pueda generar en un medio de cultivo específico, debido a

que la esporulación puede suceder sin la formación de estos [25]. Por otro lado, la evaluación de la formación del cristal, mediante la observación del mismo, se puede hacer solo cuando el cultivo está en fase estacionaria de crecimiento, lo que implica que se debe esperar el tiempo necesario para que dicha síntesis haya ocurrido y pueda ser visualizada en microscopio de contraste de fases, lo que además involucra experiencia por parte de la persona que manipula la muestra. Por lo tanto, es necesario promover investigaciones, con esas cepas nativas creciendo sobre esos medios formulados, que permitan optimizar las evaluaciones de las múltiples formulaciones surgidas, en forma directa, a través de la cinética de síntesis del cristal. Incluso, este tipo de prueba sería de gran utilidad al momento de evaluar la formación de la inclusión parasporal durante el escalamiento del proceso, que finalmente derivará en el desarrollo de un bioinsecticida con base en *Bt* de producción nacional. Por tal motivo, este trabajo tuvo como finalidad diseñar una metodología que permita evaluar de forma rápida la cinética de síntesis de cristales, a fin de valorar la producción de *Btk* en cultivos sumergidos.

## Materiales y métodos

**Material biológico:** Cuatro conejos Nueva Zelanda hembras de 2 Kg aproximadamente, procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INHRR), mantenidos con alimento comercial y agua *ad libitum*. Además, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) cepa HD1 (CVCM1819) y *Bacillus cereus* (*Bc*) (CVCM1832), utilizada como control negativo en los ensayos serológicos ya que no produce cristales entomopatógenos [26]. Ambas cepas bacterianas fueron obtenidas en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM).

**Obtención del complejo espora cristal:** Una vez obtenido el cultivo por lote de *Btk*, en fase estacionaria, se centrifugó a 3.500 xg y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, el precipitado se resuspendió en agua destilada y se centrifugó nuevamente a 3.500 xg. Este procedimiento se repitió tres veces. El sedimento fue almacenado a -10 °C.

**Obtención de cristales parasporales:** La fracción enriquecida de cristales parasporales se obtuvo siguiendo la metodología reportada por Mounsef *et al.* [27], donde un solvente orgánico interactúa con las esporas permitiendo su separación de los cristales.

**Electroelución de la proteína Cry1Aa:** Con la fracción enriquecida de cristales se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE por sus siglas en inglés) teñido con sulfato cúprico (Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O, 1%) [28]. Una vez visualizada la banda de 140 KDa correspondiente a Cry1Aa, se escindió del gel para ser sometida a una electroelución en un campo eléctrico de 8 mA durante 5 h, de acuerdo a la metodología descrita por Jacobs y Clad [29].

#### *Determinación de la concentración de la proteína Cry1Aa:*

Una vez obtenida la proteína se procedió a utilizar el método colorimétrico del ácido bicinónico (BCA) [30], utilizando el estuche comercial Micro BSA™ Protein Assay Kit (Pierce) siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

*Preparación del inmunógeno:* Se añadieron 100 µg de proteína Cry1Aa electroeluida a 3 mL de adyuvante de Freund (completo para la primera inmunización, e incompleto para las dos restantes). La mezcla se mantuvo en agitación continua hasta su emulsificación [28].

*Obtención del suero hiperinmune anti Cry1Aa:* Para la obtención del suero preinmune se tomó una muestra de sangre del conejo y se centrifugó a 435 xg para separar el suero del paquete eritrocítico. Posteriormente, se realizaron tres inmunizaciones vía subcutánea en cuatro puntos diferentes, cada 21 días con el inmunógeno elaborado previamente. Las muestras de sangre se tomaron cada 15 días postinmunización y fueron centrifugadas a 435 xg para separar el suero de los glóbulos rojos (suero postinmunización).

#### *Evaluación de la cinética de anticuerpos mediante ELISAI:*

Una vez estandarizadas las condiciones del antígeno y conjugado del ensayo, se procedió a la evaluación de la cinética de producción de anticuerpos anti Cry1Aa mediante el ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISAI). Para ello, se emplearon 0,2 µg/pozo de antígeno diluido en buffer carbono bicarbonato (pH 9,6) e incubados toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. El suero fue diluido 1/400 en PBS-T (buffer fosfato salino, pH 7,2, 0,1% de Tween 20). Se añadieron 100 µL/pozo del suero y se incubaron durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda. Posteriormente, se agregaron 100 µL/pozo del anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano, el cual fue diluido 1/25.000 en PBS-T e incubado 37 °C en cámara húmeda. La reacción fue revelada con 50 µL/pozo del cromógeno TMB (3,3', 5,5'tetrametilbenzidina) como sustrato [31,32] y detenida con 50 µL/pozo de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 N). Todos los lavados se realizaron con NaCl-T (1,5 M, 0,05% de Tween 20). Las placas fueron leídas a 450 nm.

#### *Detección de cristales de Btk por Western blot:*

Una vez estandarizadas las condiciones de suero y conjugado para el ensayo de Western blot, se procedió a la detección de la proteína Cry1Aa en el complejo espора-cristal, utilizando como control negativo un cultivo en fase estacionaria de *B. cereus* y como control positivo la proteína electroeluida. Se emplearon 50 µg de complejo espора-cristal. Para ello, cada una de estas muestras fue sometida a una SDS-PAGE y luego transferidas a un papel de nitrocelulosa según Towbin [33]. La membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% diluida en TBS (buffer tris salino, pH 7,2) durante 2 h a 37 °C. El Western blot se realizó con suero anti Cry1Aa diluido 1/200 con leche descremada al 1,25% en TBS (SD, solución dilución) e incubado durante 1 h a 37 °C.

El conjugado anti IgG de conejo fue diluido 1/10.000 en SD e incubado bajo las mismas condiciones. Para revelar la membrana se utilizó el sustrato diaminobenzidina y la reacción se neutralizó con agua destilada [34]. Los lavados se realizaron con TBS-T (TBS, 0,1% de Tween 20).

#### *Evaluación de la cinética de cristales de Btk en un cultivo*

*por lote mediante Western blot:* Se tomaron 20 mL de cultivo de *Btk* a las 0, 24, 48, 60, 72 y 80 h en el medio de referencia A80 [35] para obtener el complejo espора-cristal como se describió anteriormente. Cada una de estas muestras fue sometida a una SDS-PAGE y luego transferidas a un papel de nitrocelulosa. El Western blot se realizó con suero anti Cry1Aa diluido 1/200, conjugado anti IgG de conejo diluido 1/10.000 y sustrato diaminobenzidina, siguiendo la metodología explicada anteriormente.

#### *Evaluación de la cinética de cristales de Btk en medio A80 a*

*través de Dot blot:* En membranas de nitrocelulosa se fijaron 0,2 µg de proteína Cry1Aa y 0,52 µg de complejo-espора cristal de cada una de las muestras del cultivo por lote de *Btk*, obtenidas a las 0, 24, 48, 60, 72 y 80 h. Una vez secadas las membranas se incubaron en una solución de leche descremada al 5% en TBS por 2 h a 37 °C. Posteriormente, las membranas fueron lavadas tres veces durante 5 min con solución de lavado (SL: NaCl 1,5 M, Tween 20 al 0,1%) e incubadas con el suero anti Cry1Aa diluido 1/50 en SD, durante 1 h a 37 °C. Se repitieron los lavados con SL y las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti IgG conjugado a peroxidasa de rábano diluido 1/5.000 en SD durante 1 h a 37 °C. Nuevamente, las membranas fueron lavadas con SL sin Tween 20. El revelado se realizó con el sustrato diaminobenzidina y la reacción se neutralizó con agua.

## **Resultados y discusión**

El principal obstáculo para la producción de pesticidas con base en *Bt* es el alto costo de producción de la bacteria, por lo que se han generado investigaciones para diseñar medios de cultivo alternativos de bajo costo que permitan el desarrollo de la capacidad entomopatógena de la misma [23,24,36,37]. Por esto, es necesario evaluar la eficiencia de estos medios de cultivo en cuanto a la producción de los cristales parasporales en la bacteria durante el desarrollo de la fermentación y el escalamiento del proceso. Hasta ahora se ha utilizado una metodología para estimar la cantidad de cristales de forma indirecta, utilizando el recuento de esporas viables, luego de someter el cultivo a un choque térmico que elimina las células vegetativas, pues se presume que la cantidad de cristales formados es equivalente al título de esporas [38]. No obstante, esta predicción puede ser errónea, debido a que una deficiencia en la concentración de alguna de las sales minerales en el medio de cultivo permitiría la escasa formación de esporas sin ninguna presencia del cristal [25]. Es por ello que en esta investigación se desarrolló una metodología que permite

detectar la cinética de formación de cristales producidos en un cultivo de *Btk* en el medio A80.

Inicialmente, se evaluó el aislamiento de los cristales por el método de Mounsef *et al.* [27], mediante una SDS-PAGE. Este método de purificación de cristales parasporales, se basa en la hidrofobicidad de las esporas, es decir, su capacidad de interactuar a través de fuerzas de Van der Waals con el solvente polar hexano. Este protocolo mostró ser de utilidad, ya que permitió eliminar gran cantidad de proteínas ajenas a las que componen el cristal, manteniendo la actividad biológica de las mismas y permitiendo obtener una fracción enriquecida de estos cuerpos parasporales. En consecuencia, se observaron las dos bandas esperadas, de 140 y 65 KDa, correspondientes a Cry1Aa y Cry2A, características de la variedad *kurstaki* [1], mientras que, bandas correspondientes a proteínas propias de las esporas y células vegetativas se observaron de manera muy tenue [39]. Este resultado podría deberse a que las esporas del cultivo no están constantemente interactuando con el hexano, lo que coincide con lo reportado por Doyle [40], quien expone que las esporas de *Bt* son altamente hidrofóbicas con una adherencia al solvente orgánico del 61%. De esta manera se obtuvo una fracción enriquecida de cristales más no la proteína Cry1Aa totalmente pura (datos no mostrados).

En virtud de que el polipéptido de interés es visualizado como una banda dominante en el gel de poliacrilamida, se realizó la extracción del mismo mediante una electroelución como paso final de la purificación, con la finalidad de obtener una respuesta de anticuerpos dirigida únicamente contra la proteína Cry1Aa y no contra la totalidad de componentes presentes en la fracción enriquecida, cuya inmunogenicidad es desconocida [28]. La purificación e integridad de la proteína electroeluida fue verificada a través de una nueva electroforesis SDS-PAGE, donde se pudo observar la proteína Cry1Aa, de 140 KDa, totalmente purificada (Figura 1). Esta metodología ha sido utilizada con éxito anteriormente para purificar proteínas Cry de otras variedades de *Bt* [41].

Una vez obtenida la proteína Cry1Aa electroeluida se realizaron los ensayos de inmunización en modelo lepórico para obtener el suero hiperinmune, sobre la base de que exposiciones repetidas a una proteína antigénica resulta en la producción de anticuerpos con incremento en la afinidad por el antígeno [42]. De acuerdo a ello, la cinética de los anticuerpos anti Cry1Aa fue evaluada mediante un ELISAI (Figura 2).

En la figura 2 se puede observar una tendencia al incremento a medida que aumenta el tiempo postinmunización, como es de esperarse, pues los primeros anticuerpos que se sintetizan una vez que el sistema inmune ha detectado al antígeno son de tipo IgM [42], los cuales no son determinados en este ensayo. Es a partir del día 14 que se comenzaron a registrar anticuerpos tipo IgG contra Cry1Aa, lo que coincide con los períodos de aparición reportados para este isotipo empleando otros antígenos en el mismo modelo experimental [43]. A partir de este momento, es cuando el incremento observado en la Densidad Óptica (DO) a 450

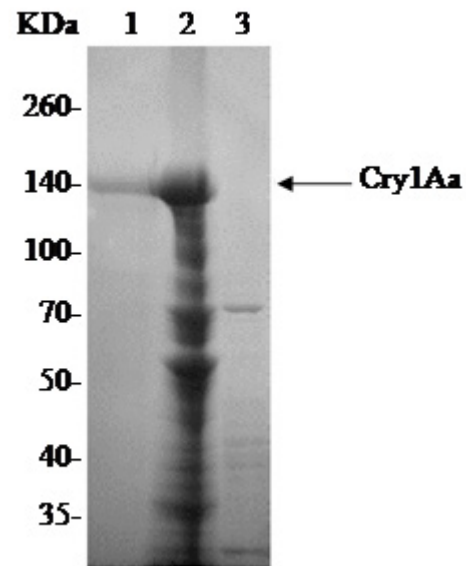


Figura 1. Visualización por electroforesis unidimensional (SDS-PAGE) de la proteína Cry1Aa electroeluida. Gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie coloidal. Carril 1: 2  $\mu$ g de proteína Cry1Aa electroeluida. Carril 2: 16  $\mu$ g del complejo espora-cristal. Carril 3: 15  $\mu$ g de esporas de *Bacillus cereus*.

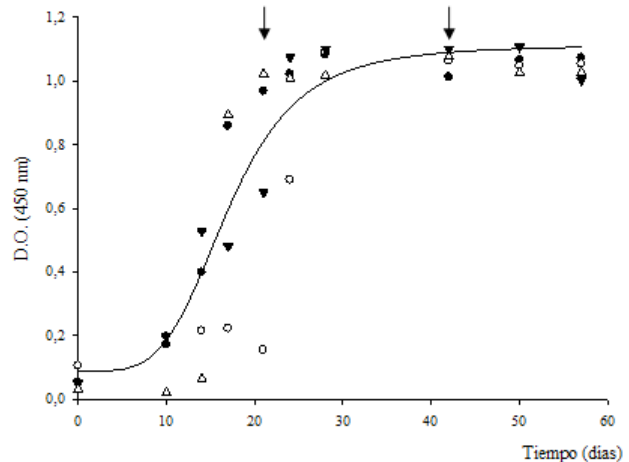


Figura 2. Cinética de anticuerpos tipo IgG contra la proteína Cry1Aa obtenidos en modelo lepórico por ELISAI. Concentración de antígeno 0,2  $\mu$ g/pozo. Diluciones de suero y conjugado, 1/400 y 1/25.000, respectivamente. Sustrato TMB. ● = Conejo 1. ○ = Conejo 2. ▼ = Conejo 3. △ = Conejo 4. La línea representa la tendencia sigmoide de generación de anticuerpos. Las flechas indican los días en que fueron realizadas las inmunizaciones.

nm se hace de pendiente más elevada hasta el día 24, tres días después de la segunda inmunización. Esto se traduce en una síntesis acelerada de anticuerpos tipo IgG durante este período. En adelante, la DO se mantuvo constante hasta el último día de experimentación.

El reconocimiento específico de los anticuerpos presentes en el suero contra la proteína Cry1Aa fue confirmado mediante un Western blot previamente estandarizado, utilizando como control positivo el complejo espora-cristal y como control negativo las esporas de *B. cereus* (Figura



3). Al utilizar el complejo espora-cristal como antígeno no se observó ningún reconocimiento en la membrana tratada con el suero preinmune (Figura 3, carril 1) a diferencia del resultado obtenido al emplear el suero hiperinmune (día 57 postinmunización) (Figura 3, carril 2), donde se distinguió un fuerte reconocimiento de la proteína de 140 KDa correspondiente a Cry1Aa. Por su parte, *B. cereus* se utilizó debido a que este microorganismo es muy similar a *Bt*, pero incapaz de producir cristales entomopatógenos [26]. Al incubar las esporas de *B. cereus* con suero positivo no se observó interacción alguna, lo que confirmó la ausencia de uniones inespecíficas de los anticuerpos a proteínas distintas a la de *Btk* (Figura 3, carril 3).

De acuerdo a los resultados mostrados en las figuras anteriores (1, 2 y 3), se puede inferir que la proteína Cry1Aa es un buen inmunógeno, ya que fue capaz de inducir una respuesta inmune [42,44]. Tomando en cuenta que el tamaño de la proteína juega un papel importante en la generación de anticuerpos [45], es posible que la Cry1Aa de 140 KDa podría estar favoreciendo la inducción de dicha respuesta inmune. Además, el fuerte reconocimiento de la proteína Cry1Aa indica su capacidad antigénica [45], siendo la producción de anticuerpos eficiente en el modelo lepórico. No obstante, otros investigadores han expuesto que las  $\delta$ -endotoxinas podrían ser proteínas de baja antigenicidad, al requerir una mayor concentración de esta como inmunógeno para poder desarrollar una respuesta inmune humoral en el conejo [46-48], lo que contrasta con los resultados obtenidos en esta investigación, donde solo 300  $\mu$ g de Cry1Aa fueron suficientes para generar una respuesta humoral significativa. Posiblemente, estas diferencias podrían deberse a las variaciones en cuanto a

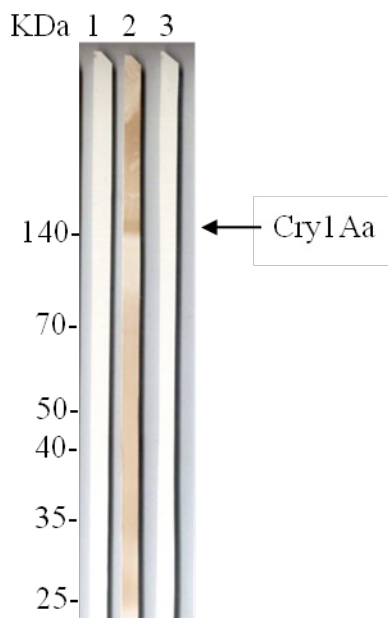


Figura 3. Detección de la proteína Cry1Aa mediante Western blot a partir de un cultivo de *Btk*. Carril 1: Complejo espora-cristal incubado con suero preinmune. Carril 2: Complejo espora-cristal incubado con suero hiperinmune. Carril 3: Esporas de *Bacillus cereus* incubadas con suero hiperinmune.

la pureza del inmunógeno, cantidad inoculada, adyuvante, ruta de inmunización y sujeto experimental utilizados entre las distintas investigaciones, siendo estos factores determinantes para la generación de una respuesta inmune eficiente [28,45].

Finalmente, se procedió a evaluar la cinética de producción de cristales cuando *Btk* fue cultivada en medio A80 por la técnica de Dot blot (Figura 4). Esta técnica, aunque no ofrece información acerca del tamaño de la biomolécula, si puede confirmar la presencia o ausencia de la misma de una manera rápida y eficiente [49]. Debido a estas ventajas, la técnica Dot blot ha sido utilizada por otros autores con otras finalidades, como por ejemplo predecir de forma preliminar la actividad insecticida de una cepa [50], detectar toxinas de *Btk* en muestras de suelo [47] y desarrollar metodologías que permitan estimar la concentración de cristales en medios formulados usando un anticuerpo comercial[48].

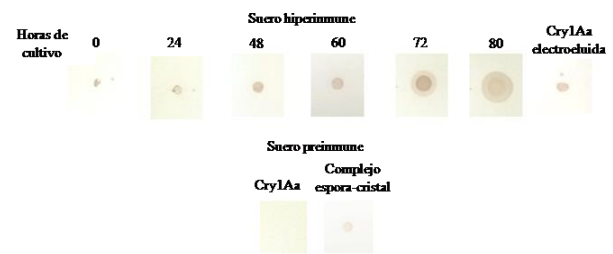


Figura 4. Evaluación de la cinética de síntesis de cristales de *Btk* en medio A80 a través de un Dot blot, utilizando un suero hiperinmune anti Cry1Aa obtenido en modelo lepórico. Control positivo: Cry1Aa electroeluida, enfrentada a suero hiperinmune. Controles negativos: Cry1Aa electroeluida y complejo espora-cristal, enfrentados con el suero preinmune. Antígenos: 0,2  $\mu$ g proteína Cry1Aa electroeluida y 0,52  $\mu$ g de complejo espora-cristal. Diluciones de suero y conjugado 1/50 y 1/5000 respectivamente. Sustrato:diaminobenzidina.

En la figura 4 es posible observar un reconocimiento basal de proteínas por parte del suero positivo en las primeras horas de cultivo (0 y 24 h), período en el cual el tipo celular predominante es vegetativo [23,51]. Este resultado podría deberse a que los conejos utilizados estuvieron expuestos a la microbiota edáfica donde probablemente estaba presente la bacteria. Al respecto, se sabe que *Bt* es altamente cosmopolita, ya que es capaz de ocupar un gran número de ecosistemas terrestres como son las zonas de desiertos, bosques húmedos tropicales, alta montaña, playas, cuevas, entre otros [5,52-54]. Esto explicaría el reconocimiento observado en el complejo espora-cristal al utilizar el suero preinmune como control, y no con la proteína Cry1Aa electroeluida. En este sentido se debe destacar que en medio A80, la fase exponencial de crecimiento de *Btk* ocurre durante las primeras horas de cultivo [22,23], período en el que no se esperaría la presencia de proteínas Cry, puesto que estas  $\delta$ -endotoxinas están asociadas a la fase estacionaria, en la cual se producen las esporas [51], lo que podría estar relacionado con el gradual incremento en el reconocimiento por parte del suero positivo a partir de las 48 h hasta las 80 h [23]. Se podría inferir entonces que dicho incremento está

relacionado con la cantidad de proteína Cry1Aa presente en el medio. Estos resultados fueron similares a los reportados por Carareto y Lemos [48], quienes evaluaron la detección de  $\delta$ -endotoxinas de *Bt* var. *israelensis* en un medio de cultivo, logrando resultados satisfactorios.

Los resultados obtenidos en el Dot blot fueron confirmados por la técnica de Western blot, al visualizar el reconocimiento de proteínas de pesos menores a 50 KDa, en cultivos de 0 a 24 h (datos no mostrados). Igualmente, en este ensayo se observó el aumento en el reconocimiento de la proteína de 140 KDa, correspondiente a Cry1Aa, desde las 48 hasta las 80 h, al mismo tiempo que ocurría una disminución en el reconocimiento de las proteínas de bajo peso molecular. De acuerdo a esto, se infiere que estas últimas podrían estar asociadas a células vegetativas, las cuales están ausentes al final de la fase estacionaria [55]. Asimismo, al utilizar esporas de *B. cereus*, como control negativo, no hubo reconocimiento por parte del suero hiperinmune.

Finalmente, los resultados obtenidos demuestran que el suero hiperinmune anti Cry1Aa es útil para detección de la  $\delta$ -endotoxina y esto fue constatado mediante el uso de diversas técnicas inmunoquímicas, entre las que resalta el Dot blot, dada su sencillez y rapidez; además, no requiere de equipos sofisticados, lo que se traduce en menor costo y dependiendo del antígeno empleado puede ser altamente sensible y específico [49,55]. Adicionalmente, la técnica de Dot blot presenta otra ventaja y es que toda la proteína se adhiere a la membrana mientras que en otras técnicas serológicas, como el ELISAi, no toda la proteína se adhiere, siendo el remanente eliminado en el primer lavado, lo que disminuye la cantidad de proteína a ser reconocida [31]. Es por este motivo que el Dot blot podría constituir una herramienta útil para el análisis de medios de cultivo de bajos costos con base en la detección de la  $\delta$ -endotoxina, para la producción a gran escala de un bioinsecticida que tendría como principio activo los cristales de *Btk*. Su uso implicaría una sustitución a largo plazo de los insecticidas químicos disminuyendo sus efectos negativos en los agroecosistemas y la salud humana.

### Agradecimientos

Trabajo financiado parcialmente por: Proyecto FONACIT PEII2012-885 N° 2013001716 y MPPCTI, FONACIT, Proyecto estratégico N° 210022000981

### Referencias

- Priest F, Kaji D, Rosato Y, Canhos V. Characterization of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria by ribosomal gene restriction fragment length polymorphisms. *Microbiol.* 1994; 140:1015-22. Doi: <https://doi.org/10.1099/13500872-140-5-1015>
- Burges HD, Hurst JA. Ecology of *Bacillus thuringiensis* in storage moths. *J Invertebr Pathol.* 1977; 30:131-9. : [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(77\)90210-5](https://doi.org/10.1016/0022-2011(77)90210-5)
- Kaelin P, Gadani F. Occurrence of *Bacillus thuringiensis* on cured tobacco leaves. *Curr Microbiol.* 2000; 40:205-9. Doi: <https://doi.org/10.1007/s002849910041>
- Porcar M, Caballero P. Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic event. *J Appl Microbiol.* 2000; 89:309-16. Doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01115.x>
- Martin P, Travers R. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 1989; 55:2437-42. Disponible en: <https://aem.asm.org/content/aem/55/10/2437.full.pdf>. Acceso 10 de octubre 2019
- Arango J, Romero M, Orduz S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Appl Microbiol.* 2002; 92:466-74. Doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01545.x>
- Hansen B, Damgaard P, Eilenberg J, Pedersen J. Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. *J Invertebr Pathol.* 1998; 71:106-14. Doi: <https://doi.org/10.1006/jipa.1997.4712>
- Maduell P, Armengol G, Llagostera M, Orduz S, Lindow S. *Bacillus thuringiensis* is a poor colonist of leaf surfaces. *Microb Ecol.* 2008; 55:212-19. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9268-4>
- Smith RA, Couche GA. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Appl Environ Microbiol.* 1991; 57:311-15. Disponible en: <https://aem.asm.org/content/aem/57/1/311.full.pdf>. Acceso 10 de octubre 2019.
- Sauka D, Benitende B. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos. *Rev Argent Microbiol.* 2008; 40:124-40. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2130/213016787013.pdf>. Acceso 11 de septiembre 2019.
- Rosas-García NM. Avances en el desarrollo de formulaciones insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*. *Rev Colomb Biotecnol.* 2008; 10:49. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/776/77610105.pdf>. Acceso 10 de octubre 2019.
- Bechtel D, Bulla L. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol.* 1976; 127:1472-81. Disponible en: <https://jb.asm.org/content/jb/127/3/1472.full.pdf>. Acceso 10 de octubre 2019.
- Bravo A. Familia de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*. En: Bravo A, Cerón J, editores. *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bogotá: Buena Semilla; 2004. p. 49-68.
- Crickmore N, Baum J, Bravo A, Lereclus D, Narva K, Sampson K, Schnepf E, Sun M, Zeigler DR. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. 2018. Disponible en: <http://www.btnomenclature.info/> Acceso 11 de septiembre 2019.

15. Pardo LL, Soberon M, Bravo A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action insect resistance and consequences for crop protection. FEMS Microbiol Rev. 2013;37:3-22. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x>
16. De Maagd R, Bravo A. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends Genet. 2001; 17:193-9. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(01\)02237-5](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(01)02237-5)
17. Bravo A. Mecanismo de acción de las proteínas bioinsecticidas de *Bacillus thuringiensis*. En: Bravo A, Cerón J, editores. *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bogotá: Buena Semilla; 2004. p. 69-100.
18. Gillis A. El arsenal de *Bacillus thuringiensis*: su uso en manejos agrícolas y en la industria alimentaria. Entomotropica. 2013; 28:106-7.
19. Gillis A, Santana MA. Detección de genes *cry1* y *cry2* en cepas venezolanas de *Bacillus thuringiensis* y sus posibles aplicaciones en el campo de la Biotecnología Agrícola. En: Müller-Karger C, Wong S, La Cruz A, editores. IV Latin American Congress on Biomedical Engineering 2007, Bioengineering Solutions for Latin America Health. Berlin, Heidelberg: Springer. IFMBE Proceedings; 2007.
20. Guevara I. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* obtenidas de muestra de suelo de alta montaña. Tesis de Licenciatura. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela; 2016. Disponible en: <http://saber.ucv.ve/handle/123456789/14921>. Acceso 11 de septiembre 2019.
21. Vitelli-Flores J, Gajardo R, Lage L, Fajardo Y, Dorta B, Rodríguez V. Aislamiento y caracterización molecular, ribotipificación, de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas en suelos y larvas muertas de *Hylesia metabus* en la región nororiental de Venezuela. Rev Soc Ven Microbiol. 2010; 30:90-6. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1994/199419354003.pdf>. Acceso 11 de septiembre 2019
22. Peñalver C. Producción de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki*. Tesis de Licenciatura. Caracas Venezuela: Universidad Central de Venezuela; 2005.
23. Brazón J. Producción de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* con base en subproductos agroindustriales de bajo costo. Trabajo Especial de Grado. Caracas Venezuela: Universidad Central de Venezuela; 1998.
24. Alvarado I. Producción de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* usando subproductos agroindustriales de bajo costo y alta disponibilidad en Venezuela. Tesis de Licenciatura. Caracas Venezuela: Universidad Central de Venezuela; 2016. Disponible en: <http://saber.ucv.ve/handle/123456789/14891>. Acceso 11 de septiembre 2019.
25. Arcas J. Producción de bacterias entomopatógenas. En: Lecuona RE, editor. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plagas. Buenos Aires, Argentina: Talleres Gráficos Mariano Mas; 1996. p. 207-22.
26. Kolstø A, Carlson CA. A complete physical map of a *Bacillus thuringiensis* chromosome. J Bacteriol. 1993; 175: 1053-60. Disponible en: <https://jb.asm.org/content/jb/175/4/1053.full.pdf>. Acceso 10 de octubre 2019.
27. Mounsef JR, Salameh D, Awad MK, Chamy L, Brandam L, Lteif R. A simple method for the separation of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals. J Microbiol. Methods. 2014; 107:147-9. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.10.003>
28. Harlow E, Lane D. Antibodies: A Laboratory Manual. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988.
29. Jacobs E, Clad A. Electroelution of fixed and stained membrane proteins from preparative sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels into a membrane trap. Anal Biochem. 1986; 154:583-9. Doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90033-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90033-3)
30. Smith P, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano M, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. 1985; 150:76-85. Doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
31. Crowther JR. The ELISA Guidebook. Series: Methods in molecular biology. Volume 149. Totowa (NY): Human Press; 2001.
32. Reyna-Bello A, Eleizalde MC, Silva AM. Assessment of chromogen suitability in ELISA for detection of anaplasmosis and trypanosomosis. J Immunoassay Immunochem. 2007; 28:1-11. Doi: <https://doi.org/10.1080/15321810601025432>
33. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci. 1979; 76:4350-4. Disponible en: <https://www.pnas.org/content/pnas/76/9/4350.full.pdf>. Acceso 11 de septiembre 2019.
34. Thermo Fisher Scientific (Firm). Western Blotting Handbook and Trouble shooting Guide: Featuring Thermo Scientific Supersignal Substrates and Pierce Western Blotting Accessories. USA: Thermo Scientific; 2014.
35. Arcas J. A new medium for growth and d-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Biotech Letters. 1984; 6:495-500. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF00139991>
36. Tirado-Montiel M. Waste water treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. Water Res. 2001; 35:3807-16. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(01\)00103-8](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(01)00103-8)
37. Brar S. Efficient centrifugal recovery of *Bacillus thuringiensis* biopesticides from fermented wastewater and wastewater sludge. Water Res. 2006; 40:1310-20. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.01.028>
38. Ertola R. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides. En: Aiba S, editor. Horizons of biochemical

- engineering. Tokyo: University of Tokyo Press; 1987. p. 189-99.
39. Aronson A, Soon Han E, McGaughey W, Johnson D. The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Appl Environ Microbiol.* 1991; 57:981-6. Disponible en: <https://aem.asm.org/content/aem/57/4/981.full.pdf>. Acceso 11 de septiembre 2019.
  40. Doyle F. Hydrophobic characteristics of *Bacillus* spores. *Curr Microbiol.* 1984; 10:329-32. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF01626560>
  41. Malik K, Riazuddin S. Immunoassay-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* -endotoxins, entomocidal to cotton aphids (*Aphis gossypii*) and whiteflies (*Bemisia tabaci*). *Pak J Bot.* 2006; 38:757-65. Disponible en: [https://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/38\(3\)/PJB38\(3\)757.pdf](https://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/38(3)/PJB38(3)757.pdf). Acceso 10 de octubre 2019.
  42. Abbas A, Lichtman A, Pober J. Inmunología celular y molecular. 5ª ed. España: McGraw-Hill Interamericana; 2004.
  43. Eleizalde MC, Caballero H, Reyna-Bello A. Evaluación y mejoramiento del ensayo inmunoenzimático (ELISA) para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina, utilizando la MSP5 recombinante como antígeno. *Revista científica FCV-LUZ.* 2007; XVII:349-56. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/959/95917406.pdf>. Acceso 10 de octubre 2019.
  44. Torres M, Moreno L. Efectos inmunológicos y adyuvantes de las proteínas Cry1A. *Rev Educ Bioquímica.* 2017; 36:118-28. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2017/reb174d.pdf>. Acceso 11 de septiembre 2019.
  45. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne, BA. *Kuby Immunology.* 4ª ed. USA: WH. Freeman and Company; 2001.
  46. KrywienzyckJ, Dulmage HT, Hall IM, Beegle C, Arakawa K, Fast PG. Occurrence of *kurstaki*-1 crystal activity in *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* serovar (H1). *J Invertebr Pathol.* 1981; 37:62-5. Doi: [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(81\)90055-0](https://doi.org/10.1016/0022-2011(81)90055-0)
  47. Tapp H, Stotzky G. Dot blot enzyme-linked immunosorbent assay for monitoring the fate of insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* in soil. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61:602-9. Disponible en: <https://aem.asm.org/content/aem/61/2/602.full.pdf>. Acceso 11 de septiembre 2019.
  48. Carareto ML, Lemos M. Methodology for fast evaluation of *Bacillus thuringiensis* crystal protein content. *Braz J Microbiol.* 2000; 31:216-9. Doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-8382200000300012>.
  49. Yang Y, Ma H. Western blotting and ELISA techniques. *Method Res.* 2009; 1:67-86. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/3d11/e0f187b2c05cfe29640b5d41bff5db0fef94.pdf>. Acceso 10 de octubre 2019.
  50. Reguero M, Cerón J, Uribe D, Mora CS, Amaya L. Obtención y caracterización de anticuerpos policlonales contra endotoxinas con actividad bioinsecticida CryI, CryIII y CryIV, asociadas al cristal de tres cepas patrón de *Bacillus thuringiensis*. *Rev Colomb Cienc Quim Farm.* 1994; 22:31-5. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquiifa/article/viewFile/56503/55456>. Acceso 11 de septiembre 2019.
  51. Juárez V. Genética y biología molecular de *Bacillus thuringiensis*. En: Bravo A, Cerón J, editores. *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bogotá: Buena Semilla; 2004. p.17-47.
  52. Chak K, Chao D, Tseng M, Kao S, Tuan S, Feng T. Determination and distribution of cry-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60:2415-20. Disponible en: <https://aem.asm.org/content/aem/60/7/2415.full.pdf>. Acceso 11 de septiembre 2019.
  53. Bernhard K, Jarret P, Meadows M, Butt J, Ellis DJ, Roberts GM, Pauli S, et al. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization and activity against insect pests. *J Invertebr Pathol.* 1998; 70:59–68. Disponible en: <https://assets.publishing.service.gov.uk/media/57a08dabed915d622c001b0b/R7484a.pdf>. Acceso 10 de octubre 2019.
  54. Bravo A, Sarabia S, López L, Ontiveros H, Abarca C, Ortiz A, Ortiz M, et al. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64:4965-72. Disponible en: <https://aem.asm.org/content/aem/64/12/4965.full.pdf>. Acceso 10 de octubre 2019.
  55. Dulmage H, Yousten A; Singer S, Lacey L. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. UNDP/World Health Organization/WHO Special programme for research and training in tropical diseases (TDR). 1990.
  56. Giardina S, García J. Hemoparásitos. Epidemiología y Diagnóstico. Caracas: Editorial Cuadernos USB; 1990.