

Expresión de la toxina Cry11Aa de *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* en *Asticcacaulis excentricus*, para el control de larvas acuáticas de dípteros de la familia Culicidae, vectores de enfermedades

Expression of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* toxins in *Asticcacaulis excentricus* to control dipteran larvae of vectors of diseases

Óscar Enrique Guevara*, Gemma Armengol**,
Neil Crickmore***, Sergio Orduz****

RESUMEN

Los genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* codifican para un diverso grupo de proteínas formadoras de cristales que exhiben actividad insecticida contra larvas de dípteros, lepidópteros y coleópteros, entre otros. La efectividad de los insecticidas basados en formulaciones de proteínas de *B. thuringiensis* puede ser mejorada usando bacterias prostecadas acuáticas como portadoras alternativas de los genes *cry*, ya que no se sedimentan rápidamente; las proteínas expresadas en el citoplasma están protegidas de los rayos ultra violeta y, lo más importante, las larvas de los mosquitos se alimentan de ellas. Una cepa de referencia de *Asticcacaulis excentricus* fue transformada con el plásmido pSOD3, el cual contiene el gen que codifica para la proteína Cry11Aa de *B. thuringiensis* serovar. *israelensis*. La expresión de la proteína recombinante fue evaluada por electroforesis de proteínas y por Western blot. El Western blot revelado con un anticuerpo policlonal anti-Cry11Aa mostró una banda de 72 kDa correspondiente a la proteína Cry11Aa. La toxicidad de las cepas de *A. excentricus* transformadas fue evaluada en bioensayos con larvas de primer estadio del mosquito *Culex quinquefasciatus*. Se alcanzó un promedio de mortalidad del 50% de las larvas de primer instar a concentraciones de 23 ng/mL de la toxina. Otros bioensayos indican que *A. excentricus* recombinante es tóxica para larvas de primer instar de las especies *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*. Los ensayos de flotabilidad indican que *A. excentricus* no sedimenta hasta pasados 7 días, mientras que *B. thuringiensis* serovar. *israelensis* sedimenta al cabo de algunas horas.

Palabras clave: *Asticcacaulis excentricus*, *Bacillus thuringiensis*, bacterias prostecadas, dengue, malaria.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis cry genes encode for a diverse group of crystal-forming proteins that exhibit insecticidal activity towards dipteran, lepidopteran and coleopteran larvae. The effectiveness of insecticides based on mosquito larvicidal *B. thuringiensis* strains can be enhanced by using aquatic prosthecated bacteria as alternative hosts, since they do not sink, cytoplasmic located toxins are protected from UV radiation and, most importantly, mosquito larvae feed on them. An *Asticcacaulis excentricus* reference strain was transformed with the *cry11Aa* gene from *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis*. Western blot and electrophoresis were used to test recombinant protein expression; Western blot revealed a 72 kDa protein corresponding to *B. thuringiensis* serovar. *israelensis* Cry11Aa. These aquatic bacteria toxicity achieved 50% mortality at 23 ng/mL concentration in first instar *Culex quinquefasciatus* larvae. Other bioassays indicated that recombinant *A. excentricus* is toxic against *Aedes aegypti* and *Anopheles albimanus* first instar larvae. Buoyancy tests demonstrated the advantage of *A. excentricus* over *B. thuringiensis*.

Key words: *Asticcacaulis excentricus*, *Bacillus thuringiensis*, prosthecated bacteria, dengue, malaria.

* Biólogo. Unidad de Biotecnología y Control Biológico. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Carrera 72ª No. 78B-141, Medellín, Colombia. Correo electrónico: oguevara@cib.org.co

** Ph. D., Unidad de Biotecnología y Control Biológico CIB. Correo electrónico: garmengol@cib.org.co

*** Ph. D., Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Sussex, Brighton, UK.

**** Ph. D., Jefe Unidad de Biotecnología y Control Biológico CIB. Profesor investigador. Universidad de Pamplona, Pamplona, Colombia. Correo electrónico: sorduz@cib.org.co

Recibido: agosto 27 de 2003. **Aceptado:** noviembre 11 de 2003.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por mosquitos vectores, como la malaria, la filariasis y el dengue, están catalogadas entre las más peligrosas para la salud humana. La lucha en contra de los mosquitos vectores ha sido reconocida como una de las mejores estrategias para el control de estas enfermedades (OMS, 1998).

Uno de los agentes de control biológico natural más utilizados en agricultura y salud ha sido la bacteria *Bacillus thuringiensis*, por su capacidad de sintetizar cristales proteicos insecticidas. Las formulaciones hechas con base en *B. thuringiensis* serovar. *israelensis* son el método más ampliamente utilizado en Estados Unidos para el control biológico de mosquitos (CMC, 2000). Estas bacterias no son perjudiciales para los otros animales ni el ambiente y no presentan riesgos de salud a las personas involucradas en su aplicación (Siegel, 2001). Sin embargo, estas bacterias tienen algunos inconvenientes: su fermentación requiere medios costosos, los cristales proteicos son sensibles a la luz ultravioleta y se sedimentan rápidamente, apartándose de la zona de alimentación de las larvas de mosquito, especialmente de los anofelinos.

Algunas bacterias acuáticas, entre las que se encuentra el género *Asticcacaulis*, ofrecen un gran potencial como vehículos de expresión alternativos para llevar toxinas que afectan a mosquitos vectores de enfermedades de importancia médica (Thanabalu *et al.*, 1992; Yap *et al.*, 1994a; Yap *et al.*, 1994b; Orduz *et al.*, 1995; Romero *et al.*, 2001). Sus ventajas están dadas por sus bajos costos de producción, ya que se pueden fermentar en medios simples, además se encuentran en ambientes naturales, en aguas con poco contenido de nutrientes y en las capas superiores (interfase aire-agua), donde las larvas de mosquito se alimentan. La presencia de la prosteca las hace permanecer en la superficie del agua, las ayuda a agruparse entre ellas y les da la facultad de anclarse a la materia orgánica flotante (Staley *et al.*, 1989).

En este trabajo se planteó explorar el desarrollo de sistemas de expresión alternativos para mejorar la calidad y eficacia de los programas existentes de control biológico contra mosquitos vectores de enfermedades.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plásmido. El plásmido pSOD3 (12.4 kb) fue construido a partir del plásmido pSOD2 (Romero *et al.*, 2001). Como cepa transportadora y donadora se utilizó *Escherichia coli* cam6527, la cual había sido previamente transformada con el plásmido que contiene el gen que codifica para la proteína Cry11Aa de *B. thuringiensis* serovar. *israelensis*. El gen *cry11Aa* fue amplificado por PCR con *primers* diseñados para insertar dos sitios de restricción (*KpnI* y *PstI*), uno corriente abajo y otro corriente arriba del gen *cry11Aa*. La secuencia de los *primers* era la siguiente: F2 (forward): 5'ATGGGGTACCGAAAATTTCTTCACTTCACTATAAA3'-R1 (reverse): 5'TTACTGCAGGATCTTAGAATACTCACTC3'. El plásmido pSOD2, que fue utilizado como receptor del gen *cry11Aa*, y el producto amplificado se cortaron con *KpnI* y *PstI*, y después se ligaron dando lugar al plásmido pSOD3 (figura 1).

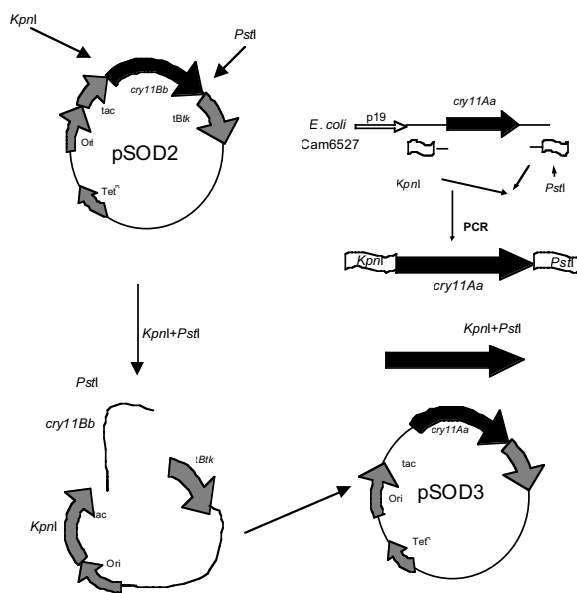


Figura 1. Construcción del plásmido pSOD3 utilizado para la transformación de *Asticcacaulis excentricus*.

Transformación de células de *Asticcacaulis excentricus*. Se tomaron colonias individuales de *A. excentricus* cepa 4724 colectada de agua de laguna y obtenida de la Colección Alemana de microorganismos y cultivos celulares (DMZ 2003), y se dejaron crecer a 30 °C a 200 rpm en 5 mL de medio PYE líquido (peptona 0.1%, extracto de levadura 0.05%) por 48 horas, alcanzando una $DO_{600} = 0.48$. Poste-

riormente, se inocularon 5 mL de este cultivo en 1 L de PYE y se dejó incubar por 48 horas a las mismas condiciones de crecimiento. Al finalizar la incubación se centrifugó el cultivo a 9000 rpm, a 4 °C por 10 minutos. El botón celular se resuspendió en 200 mL de agua fría estéril. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 9000 rpm, a 4 °C durante 10 minutos, se resuspendió el botón celular en 800 µL de agua fría estéril, se centrifugó nuevamente a 10000 rpm, a 4 °C por 10 minutos y el botón celular fue resuspendido en 200 µL de agua fría estéril, para luego ser dividido en alícuotas de 50 µL y almacenado a -20 °C.

La transformación se realizó por electroporación utilizando un equipo Bio-Rad bajo las siguientes condiciones: 2.5 kV, 200 Ohms, 25 µF. Se utilizaron cubetas estériles para electroporación de 2 mm previamente enfriadas en hielo. Se sirvieron 40 µL de células y 1 µL de DNA plasmídico a una concentración aproximada de 0.2 µg/µL, y se transfirieron a la cubeta de electroporación. Al utilizar el equipo se aplicó un pulso sencillo con una duración de 6.5 a 7.7 ms, inmediatamente después se agregó 1 mL de medio líquido PYE, se mezcló bien con una pipeta estéril y se transfirió a un tubo estéril dejándolo incubar a 30 °C, 200 rpm durante una hora, para permitir la recuperación de las células. Posteriormente se sirvió 1 mL de las células en agar PYE con tetraciclina 2 µg/mL como antibiótico de selección. Luego se incubaron a 30 °C durante 48 a 72 horas y se sembraron por aparte las colonias individuales obtenidas.

Evaluación de la expresión de la toxina en células transformadas de *A. excentricus* por electroforesis de proteínas e inmunodetección (Western blot).

Para evaluar la expresión de la proteína Cry11Aa en las células de *A. excentricus* transformadas con el plásmido pSOD3, se examinaron por microscopía de luz varias colonias y se escogieron aquellas que mostraran crecimiento característico en forma de rosetas. Se tomaron cultivos celulares de 200 mL crecidos en PYE, de uno, tres y cuatro días; se procedió a concentrarlos por centrifugación y se resuspendieron en 5 mL agua; posteriormente se tomaron 4.5 mL de este cultivo concentrado y se liofilizaron. Este liofilizado fue hidratado con 50 mL de agua estéril y utilizado en los ensayos de toxicidad, expresión y concentración de la proteína. Se utilizó el método de electroforesis de proteínas descrito por Coligan (1997) en geles de poliacrilamida al 10% con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Se comparó la expresión de la proteína Cry11Aa en *A.*

excentricus transformada, sin transformar y la expresión de un cultivo de 48 horas de *B. thuringiensis* serovar. *israelensis*. Como indicador de peso se utilizó el marcador mediano de peso molecular para proteínas (Promega). Luego, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en una cámara de transferencia de proteínas Mini-Trans-Blot (Bio-Rad), según especificaciones del fabricante. Posteriormente se sumergió la membrana en una solución con anticuerpos policlonales preparados en ratones contra las proteínas Cry de *B. thuringiensis* serovar. *israelensis* (anticuerpo primario); después de lavar, se expuso la membrana a una solución conjugada de enzima-anticuerpo (anticuerpo secundario) dirigida hacia el anticuerpo primario (IgG anti-ratón). Finalmente los antígenos fueron visualizados por reacciones cromogénicas con Fosfatasa alcalina, lo que permitió la visualización del complejo anticuerpo-enzima unido a la membrana. Para determinar la concentración de la proteína en el cultivo de *A. excentricus* + pSOD3, a partir de la membrana obtenida del Western blot, se procedió a medir la intensidad de las bandas por medio del programa Quantity one (Bio-Rad). Se realizó una curva estándar con concentraciones conocidas de la proteína Cry11Aa tomadas de la cepa recombinante de *B. thuringiensis* serovar. *israelensis* 4Q2-81 con el plásmido pHT640 portador del gen *cry11Aa* (Poncet *et al.*, 1993).

Flotabilidad de células de *Asticcacaulis excentricus*.

Se prepararon suspensiones de células de *A. excentricus* transformadas con el plásmido pSOD3, *A. excentricus* sin transformar, *Asticcacaulis* sp. (nativa) y cultivo en fase vegetativa de *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis*, y se realizaron dos montajes en tiempos diferentes. Las células se lavaron en agua destilada estéril y se colocaron 2 mL de cada suspensión bacteriana (de 2 días de cultivo, aproximadamente 1×10^8 células/mL) en cubetas selladas adecuadamente, lavadas con solución desinfectante-bactericida y alcohol etílico al 70% y secadas por 12 horas a 37 °C. Las cubetas permanecieron a temperatura ambiente y se realizaron registros fotográficos diarios durante siete días para determinar la flotabilidad de las suspensiones celulares (Liu *et al.*, 1996).

Bioensayos de toxicidad. Para los ensayos de toxicidad se utilizaron larvas de primer instar de *C. quinquefasciatus* mantenidas en el insectario de la Unidad de Biotecnología y Control Biológico de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Los bioensayos fueron realizados en vasos plásticos

(40 mL) los cuales contenían 10 mL de agua destilada y diez larvas por vaso. A cada vaso se le aplicó la cantidad de liofilizado necesario procedente de la cepa de *A. excentricus* transformada con pSOD3 para obtener las siguientes concentraciones finales: 16, 1.6, 0.16 y 0.016 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los ensayos se realizaron en cuatro días diferentes y con tres repeticiones cada uno. La mortalidad fue determinada después de 24 horas y los datos fueron sometidos al análisis Probit (Finney, 1971), con el cual se obtuvo la concentración letal media (CL_{50}). También se hicieron ensayos para determinar la toxicidad de *A. excentricus* recombinante contra larvas de primer instar de los mosquitos vectores de enfermedades *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*. Se tomaron 10 larvas de primer instar de cada especie, se hicieron cinco repeticiones por tratamiento y dos réplicas por ensayo. Cada vaso contenía 10 larvas de primer instar, 5 mL de agua y 100 μL de cultivo completo final de *A. excentricus* transformada después de 24 h de crecimiento. A los controles negativos sólo se les adicionó agua. Los porcentajes de mortalidad fueron evaluados a las 24 h de haber montado el ensayo.

RESULTADOS

Evaluación de la expresión de la toxina en células transformadas de *A. excentricus* por electroforesis de proteínas e inmunodetección (Western blot). La expresión de la proteína Cry11Aa fue detectada mediante ensayos de transferencia e inmunodetección como se mencionó. Se utilizó como control positivo una cepa de *B. thuringiensis* serovar. *israelensis* y como control negativo una cepa de referencia de *A. excentricus* en la cual no fue detectada la proteína de interés (figura 2). Se obtuvo una concentración de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína proveniente de un cultivo de cuatro días de crecimiento y una $\text{DO}_{600} = 0.6-0.8$. La concentración bacteriana fue estimada en 1×10^8 cél./mL, lo que nos daría una producción de 4×10^{-4} ng/cél.

Flotabilidad de células de *Asticcacaulis excentricus*. Los ensayos de flotabilidad demostraron claramente la tendencia de las bacterias prostecadas a permanecer en suspensión más tiempo que *B. thuringiensis* serovar. *israelensis* en medio acuático. Para *B. thuringiensis* se observó una total sedimentación al séptimo día del ensayo, por el contrario, las cepas de *Asticcacaulis* presentaron un alto nivel de flotabilidad manteniéndose en suspensión hasta la finalización del experimento (figura 3).

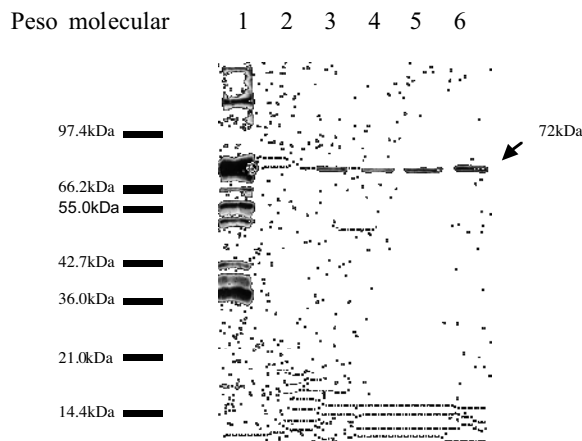


Figura 2. Evaluación de la expresión de la toxina en células transformadas de *A. excentricus* por electroforesis de proteínas e inmunodetección (Western-blot). El anticuerpo utilizado fue anti *B. thuringiensis* serovar. *israelensis* proteínas totales. Carril 1, *B. thuringiensis* serovar. *israelensis*; carril 2, *Asticcacaulis excentricus*; carril 3, *A. excentricus* + pSOD3 1 día de crecimiento; carril 4, *A. excentricus* + pSOD3 2 días de crecimiento; carril 5, *A. excentricus* + pSOD3 3 días de crecimiento; carril 6, *A. excentricus* + pSOD3 4 días de crecimiento.

Tabla 1. Concentración letal 50 (CL_{50}) de *A. excentricus* + pSOD3 frente a larvas de *A. aegypti* calculada mediante análisis PROBIT.

<i>A. excentricus</i> + pSOD3 cultivos crecidos por:	CL_{50} (ng/mL)	CL_{50} (cél./mL)	Nivel de confianza
24 horas	104.04	2.6×10^5	0.95
72 horas	32.14	8.0×10^4	0.95
96 horas	22.96	5.7×10^4	0.95

Bioensayos. En los ensayos de toxicidad, a partir de cultivos completos finales de *A. excentricus* + Cry11Aa, se obtuvieron las siguientes CL_{50} (evaluadas a las 24 horas) para larvas de primer instar de *C. quinquefasciatus*: 104 ng/mL, 32.1 ng/mL y 23 ng/mL, para cultivos de uno, tres y cuatro días de crecimiento, respectivamente, de *A. excentricus* transformada con el plásmido pSOD3 (tabla 1). Los resultados de mortalidad obtenidos para larvas de *A. aegypti* y *An. albimanus* fueron 93 y 89%, respectivamente.

DISCUSIÓN

La posibilidad de encontrar huéspedes apropiados para llevar toxinas de *B. thuringiensis* radica en las propiedades de los organismos que quieren ser controlados, como lo son sus características básicas de

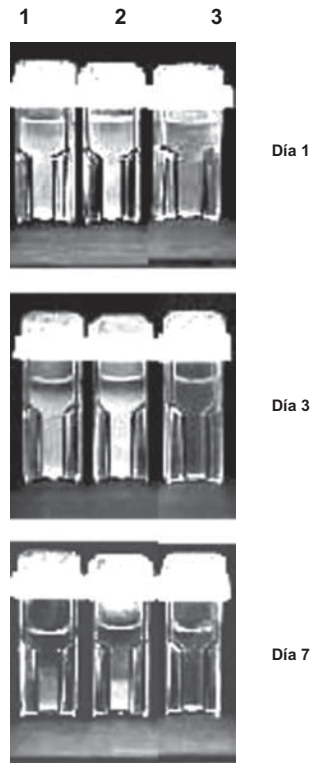


Figura 3. Ensayo de flotabilidad. 2 mL de cada suspensión bacteriana (de 2 días de cultivo, aproximadamente 1×10^8 cél./mL) fueron servidos en cubetas selladas adecuadamente, previamente lavadas con solución desinfectante-bactericida y alcohol etílico al 70% y secadas por 12 horas a 37 °C. Las cubetas permanecieron a temperatura ambiente y se realizaron registros fotográficos diarios durante siete días para determinar la flotabilidad de las suspensiones celulares. Línea 1. *A. excentricus* + pSOD3; línea 2. *A. excentricus*; línea 3. *B. thuringiensis* serovar. *israelensis*. Todas las suspensiones celulares fueron previamente homogeneizadas hasta alcanzar una $DO_{600} = 0.6-0.8$.

comportamiento alimenticio y su nicho ecológico. Por lo tanto, la búsqueda se centra en obtener un organismo capaz de producir proteínas recombinantes manteniendo su efectividad y actividad frente al organismo blanco, además de obtener un huésped que comparta el hábitat del organismo que quiere ser controlado. Los resultados reportados en este estudio muestran la posibilidad de aislar nuevas bacterias prostecadas que puedan servir como vehículos de expresión para mejorar así el rendimiento de los insecticidas basados en proteínas de *B. thuringiensis* para el control de larvas de mosquitos. Las bacterias prostecadas están mejor adaptadas para convivir e interactuar en mayor grado con las larvas de mosquitos vectores, ya que se encuentran en contacto directo con éstas, haciendo parte importante de su

dieta (Merritt *et al.*, 1992; Romero *et al.*, 2001) y superando varios de los problemas a los cuales están sometidas las toxinas de *B. thuringiensis* al ser expuestas al ambiente natural.

La concentración aproximada de la proteína Cry11Aa producida por *A. excentricus* transformada fue de 4×10^{-7} µg/cél. cuando los cultivos celulares alcanzaron una $DO_{600} = 0.6-0.8$. Los valores de las CL_{50} variaron según el número de días de crecimiento de las células transformadas. Los extractos crudos de proteasas de *A. excentricus* demostraron no degradar la proteína Cry11Bb de *Bacillus thuringiensis* serovar. *medellín* (Romero *et al.*, 2001), lo que puede explicar la razón del aumento en la toxicidad a medida que pasaron los días de crecimiento de las bacterias transformadas, ya que las proteínas se encuentran encapsuladas dentro de la célula y protegidas de las condiciones externas adversas, y sólo entran en contacto con el intestino cuando la larva ha digerido las bacterias. La proteína expresada demostró toxicidad frente a larvas de mosquitos, con una CL_{50} de 2.6×10^5 cél./mL ó 104 ng/mL (Wu *et al.*, 1997). La CL_{50} para la cepa control de *B. thuringiensis* serovar. *israelensis* 4Q2-81 (pHT640) (Poncet *et al.*, 1993) que expresa únicamente el *gen cry11Aa*, ha sido reportada en 57.9 ng/mL (Orduz *et al.*, 1995); esto muestra que *A. excentricus* + pSOD3 necesita aproximadamente dos veces esta cantidad de proteína para producir la misma mortalidad. Estudios previos han demostrado que la potencia en la producción de la proteína está relacionada con la selección de un promotor fuerte y con un sitio de unión del ribosoma adecuado, juntos denominados secuencias de control de la expresión (SCE) (Liu *et al.*, 1996). Otros aspectos que pueden interferir en la toxicidad son la capacidad de la larva de mosquito para digerir la bacteria y liberar la toxina, y la posibilidad de degradación de la toxina en el citoplasma de la bacteria recombinante antes de ser ingerida. Thanabalu *et al.* (1992) obtuvieron porcentajes de mortalidad significativos a concentraciones de *Caulobacter crescentus* transformada de 10^7 a 10^8 cél./mL usando proteínas de *Bacillus sphaericus* contra larvas de *C. quinquefasciatus*. Algunas especies de cianobacterias han sido usadas como vectores de expresión de los genes *cry* de *B. thuringiensis* alcanzándose CL_{50} de 0.3 µg/mL frente a larvas de *Aedes aegypti* (Murphy *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1997). La toxicidad frente a larvas de *C. quinquefasciatus* en los experimentos realizados por Romero *et al.*, (2001) utilizando el *gen cry11Bb* resultó dentro del rango de 10^4 y 10^5 cél./mL. Los resul-

tados del presente trabajo (tabla 1) estuvieron dentro del nivel de los valores más tóxicos frente a los encontrados por otros investigadores utilizando microorganismos acuáticos con CL_{50} s de 10^4 y 10^5 cél./mL. Además, los porcentajes de mortalidad obtenidos para *A. aegypti* y *An. albimanus* (93 y 89%, respectivamente) demuestran un amplio espectro de acción de *A. excentricus* recombinante frente a estas dos especies de mosquitos importantes en la transmisión de enfermedades a los humanos.

En los ensayos de flotabilidad se pudo determinar una diferencia importante de los tiempos de permanencia de las bacterias en las capas superficiales del agua, corroborando los datos presentados en experimentos anteriores por Romero *et al.* (2001). Esto es de suma importancia ya que se busca que las bacterias permanezcan en contacto directo con los organismos blanco. Se cree que el incremento en volumen debido a su apéndice (prosteca) les confiere una mayor capacidad de flotabilidad, además de la posibilidad de pegarse a material particulado, el cual las larvas de algunos mosquitos suelen morder (Staley *et al.*, 1989). Otro aspecto importante de algunas de las bacterias prostecadas como *Asticcacaulis* es que poseen un flagelo en los estadios tempranos de su desarrollo, lo que les concede la propiedad de moverse libremente dentro del medio acuático en el cual habitan y les permite entrar en contacto directo con las larvas del mosquito que se quiere atacar (Staley *et al.*, 1989).

El siguiente paso en este estudio será utilizar cepas nativas de bacterias prostecadas y transformarlas con uno o más genes mosquitocidas de *B. thuringiensis*, aumentar la capacidad de producción de la(s) proteína(s), y comprobar su expresión y toxicidad contra larvas de mosquitos patógenos.

CONCLUSIONES

En resumen, las bacterias del género *Asticcacaulis* comprobaron ser buenos huéspedes alternativos para producir y albergar toxinas mosquitocidas; también se observó su capacidad de mantenerse en las capas superiores del agua por más tiempo que *B. thuringiensis*.

Las bacterias prostecadas recombinantes son una alternativa para la lucha contra los mosquitos vectores de enfermedades en el campo de la biotecnología, ya que se ataca de una manera más acorde

con los parámetros alimenticios de las larvas de mosquitos. Las estrategias de control biológico para atacar al insecto vector en los primeros estadios de su vida y en su hábitat natural deben ser tomadas en cuenta en el desarrollo de nuevos insecticidas biológicos y han de estar dirigidas a reconocer nuevas cepas bacterianas que compartan los nichos ecológicos de las especies que se quieren controlar, y a incrementar la producción y la eficacia de las toxinas que se utilicen en los programas de control contra insectos vectores de enfermedades, tales como los pertenecientes a las familias Culicidae y Hemiptera. Actualmente se está evaluando el comportamiento de *A. excentricus* + pSOD3 simulando condiciones de campo; los resultados obtenidos hasta ahora han sido satisfactorios con respecto a la persistencia y acción mosquitocida de *A. excentricus* transformada.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) con la colaboración de la Wellcome Trust y la Universidad de Sussex.

BIBLIOGRAFÍA

- CMC. 2000. Colorado mosquito control. Inc. <http://www.comosquitocontrol.com/>
- Coligan, J. E. 1997. Current protocols in protein science. U.S.A: John Wiley & Sons, vol. 1, cap. 10.
- DMZ. 2003. <http://www.dsmz.de/strains/>
- Finney, D. 1971. *Probit analysis*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Liu, J.-W.; Yap, W. H.; Thanabalu, T.; Porter, G. 1996. Efficient synthesis of mosquitocidal toxins in *Asticcacaulis excentricus* demonstrates potencial of Gram-negative bacteria in mosquito control. *Nat. Biotechnol.* 14: 343-347.
- Merritt, R. W.; Dadd, R. H.; Walker, E. D. 1992. Feeding behaviour, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 349-376.
- Murphy, R. C.; Stevens, S. E. 1992. Cloning and expression of the *cryIVD* gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 and its resulting larvicidal activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1650-1655.
- OMS. 1998. World Health Organization, Fact sheet No. 94. <http://www.who.int/inf-fs/en/fact094.html>
- Orduz, S.; Restrepo, N.; Patiño, M. M.; Rojas, W. 1995. Transfer of toxin genes to alternate bacterial hosts for mosquito control. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 90: 97-107.
- Orduz, S.; Realpe, M.; Arango, R.; Murillo, L. A.; Delécluse, A. 1998. Sequence of the *cry11Bb1* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Medellin* and toxicity of its encoded protein. *Biochem. Biophys. Acta.* 1388: 267-272.
- Poncet, S.; Anello, G.; Delécluse, A.; Klier, A.; Rapoport, G. 1993. Role of the *CryIVD* polypeptide in the overall

- toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3928-3930.
- Romero, M.; Gil, Flor. M.; Orduz, S. 2001. Expression of mosquito active toxin genes by a colombian native strain of the Gram-negative bacterium *Asticcacaulis excentricus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96: 257-263.
- Siegel, J. P. 2001. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *J. Invertebr. Pathol.* 1: 13-21.
- Staley, J. T.; Fuerst, J. A. 1989. Budding and/or Appendaged Bacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, USA, 3: 1890-1945.
- Thanabalu, T.; Hindley, J.; Brenner, S.; Oel, C.; Berry, C. 1992. Expression of the mosquitocidal toxins of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* by recombinant *Caulobacter crescentus*, a vehicle for biological control of aquatic larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 905-910.
- Wu, X. Q.; Vennison, S. J.; Huirong, L.; Ben-Dov, E.; Zaritsky, A.; Boussiba, A. 1997. Mosquito larvicidal activity of transgenic *Anabaena* strain PCC 7120 expressing combinations of genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4971-4975.
- Yap, W. H.; Thanabalu, T.; Porter, A. G. 1994a. Influence of transcriptional and translational control sequences on the expression of foreign genes in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 176: 2603-2610.
- Yap, W. H.; Thanabalu, T.; Porter, A. G. 1994b. Expression of mosquitocidal toxin genes in a gas-vacuolated strain of *Ancylobacter aquaticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4199-4202.