

DETECCIÓN DE β -EXOTOXINA EN CEPAS NATIVAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* POR HPLC

Yamilé Baró Robaina, Cecilia Linares Jiménez y Gonzalo Dieksmeier Corcuera

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.^a B y 5.^a F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, ybaro@inisav.cu

RESUMEN

Se analizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) la presencia de β -exotoxina en nueve cepas de *Bacillus thuringiensis*, pertenecientes a la colección del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. La concentración de β -exotoxina en el patrón fue de 25 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, y en el producto comercial empleado como control positivo fue de 6 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. En las cepas evaluadas solo la LBT9 y LBT47 mostraron la presencia de este metabolito a concentraciones de 34 y 4,5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ respectivamente.

Palabras claves: *Bacillus thuringiensis*, β -exotoxina, cromatografía líquida (HPLC), detección

ABSTRACT

The presence of β -exotoxin in nine *Bacillus thuringiensis* strains belonging to Plant Health Research Institute collection was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). β -exotoxin concentration in the standard was 25 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, and in a commercial product, used as positive control, was 6 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. β -exotoxin was only detected in LBT9 with 34 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ and LBT47 with 4.5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, among the strains proved.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, β -exotoxin, liquid chromatography (HPLC), detection

INTRODUCCIÓN

Algunas cepas de *Bacillus thuringiensis* producen además de la δ -endotoxinas o proteínas Cry una exotoxina termoestable denominada β -exotoxina, la cual se secreta al medio de cultivo al inicio del proceso de esporulación. Esta molécula es un análogo nucleotídico de ADN con un peso molecular de 701 Da y se le atribuye acción insecticida contra diferentes órdenes de insectos como Lepidópteros, Dípteros, Coleópteros, Hemípteros, además de ácaros, nematodos, protozoarios y platelmintos [Hernández *et al.*, 2003].

Diversos métodos como la cromatografía de intercambio iónico, electroforesis capilar, ELISA y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se han descrito para la determinación de la β -exotoxina, como alternativas al bioensayo tradicional con *Musca domestica*, el cual resulta más trabajoso, prolongado en el tiempo y presenta algunas limitaciones como estimaciones inexactas de la potencia de la toxina impura y

poca reproducibilidad. De todos estos métodos la RP-HPLC se emplea más frecuentemente para la detección y cuantificación de este metabolito [Gohar y Perchat, 2001].

El presente trabajo tuvo como objetivo detectar y cuantificar la presencia de la β -exotoxina en nueve cepas cubanas de *Bacillus thuringiensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material biológico se emplearon nueve cepas de *B. thuringiensis* pertenecientes a la colección del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, las cuales se seleccionaron de acuerdo con su serotipo flagelar, y la toxicidad exhibida en el sobrenadante del cultivo esterilizado a 121°C frente a un grupo de organismos plaga (Tabla 1).

El estándar de β -exotoxina I lo suministró el doctor Jorge Ibarra (Laboratorio de Bioinsecticidas del Centro de

Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional de México), obtenido a partir de la cepa HD2 Berliner *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. La concentración final de la solución de β -exotoxina I inyectada en el HPLC fue de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Como control positivo se utilizó un producto comercial ruso que contiene β -exotoxina, producido a partir de una cepa de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*, y como control negativo se tomó la cepa HD1, estándar internacional de *B. thuringiensis* que no produce β -exotoxina.

Tabla 1. Serotipos de las cepas en estudio [Fernández-Larrea, 1999]

Cepas	Serotipo
LBT-4	<i>kenyae</i> (H4)
LBT-5	<i>thuringiensis</i> (H1)
LBT-7	<i>kenyae</i> (H4)
LBT-9	<i>thuringiensis</i> (H1)
LBT-12	<i>thuringiensis</i> (H1)
LBT-13	no determinado
LBT-16	<i>thuringiensis</i> (H1)
LBT-25	<i>israelensis</i> (H14)
LBT-47	no determinado

Las cepas se cultivaron en medio caldo triptona soya, en zaranda orbital a 150 r.min^{-1} a una temperatura de crecimiento de 30°C durante 48 h hasta que se completó el proceso de esporulación.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación el cultivo se centrifugó $10\,000 \text{ r.min}^{-1}$ en centrifuga refrigerada durante 20 min. El precipitado se descartó y el sobrenadante se trató en autoclave a 121°C durante 15 min. El pH de las muestras se ajustó a 3 con ácido fosfórico 85%. El sobrenadante se clarificó por centrifugación a $10\,000 \text{ r.min}^{-1}$ y se guardó a -20°C hasta su uso.

El proceso de separación se realizó según Levinson *et al.* (1990), para lo que se utilizó una columna LiChrospher RP-18 de fase reversa. La corrida se efectuó a 30°C en 50 milimoles. L^{-1} de KH_2PO_4 (pH 3) a una velocidad de flujo de 2 mL.min^{-1} , con detección a 260 nm. El volumen de inyección fue de $100 \mu\text{L}$. Se empleó un detector UV, inyector Rheodyne 7725i, bomba water 0,01A. Para el análisis de los cromatogramas se utilizó el software EZChrom versión 6.8.

Con el objetivo de evaluar si la β -exotoxina se eliminaba durante el procesamiento de la muestra, se adicio-

naron $100 \mu\text{L}$ de β -exotoxina estándar a la cepa LBT5 de *B. thuringiensis* una vez iniciado el crecimiento del microorganismo y concluido su desarrollo. La cromatografía se desarrolló en las condiciones descritas anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según los cromatogramas obtenidos en la detección de β -exotoxina para las cepas en estudio, se observó el pico correspondiente al patrón de β -exotoxina estándar a una concentración de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Fig. 1(A)). El pico que se observa en la muestra patrón apareció a un tiempo de retención de 11,33 min. El mismo pico apareció en la muestra correspondiente al producto comercial ruso a base de β -exotoxina, cepa utilizada como testigo positivo. Su concentración fue de $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Fig. 1(B)). La exotoxina no se detectó en la cepa HD1 estándar internacional de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Fig. 2), la cual no produce esa exotoxina [Galán *et al.*, 1994; Glare y Callaghan, 2000].

En el resto de las cepas en estudio, solo se observó el pico correspondiente a la β -exotoxina en las cepas LBT9 (Fig. 3(A)) y LBT47 (Fig. 3(B)). Los niveles de producción del metabolito en estas cepas fueron de 34 y $4,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente. En la cepa LBT7 también se observó la presencia de un pico que pudiera corresponder a la β -exotoxina, ya que presenta uno similar al del patrón y un tiempo de retención muy cercano.

Las cepas evaluadas presentan serotipos que están informados en la literatura como productores de la β -exotoxina [Galán *et al.*, 1994; Glare y Callaghan, 2000]; sin embargo, estos resultados reafirman lo obtenido por Levinson *et al.* (1990) y Hernández y Ferré (2001), los cuales mostraron que la producción de la exotoxina termoestable es más una propiedad específica de la cepa de *B. thuringiensis* que una propiedad serotipo específica. Se ha probado además que su presencia en una cepa en particular no implica la producción de la exotoxina por otras cepas pertenecientes al mismo serovar.

Aunque los estudios que relacionan la producción de la β -exotoxina y el tipo de serovar que presenta la cepa de *B. thuringiensis* son muy escasos, y en la mayoría de ellos se incluyen muy pocas cepas, algunos autores plantean que la producción de β -exotoxina está limitada a ciertos serotipos flagelares presentes en las cepas de *B. thuringiensis* [Hernández y Ferré, 2001].

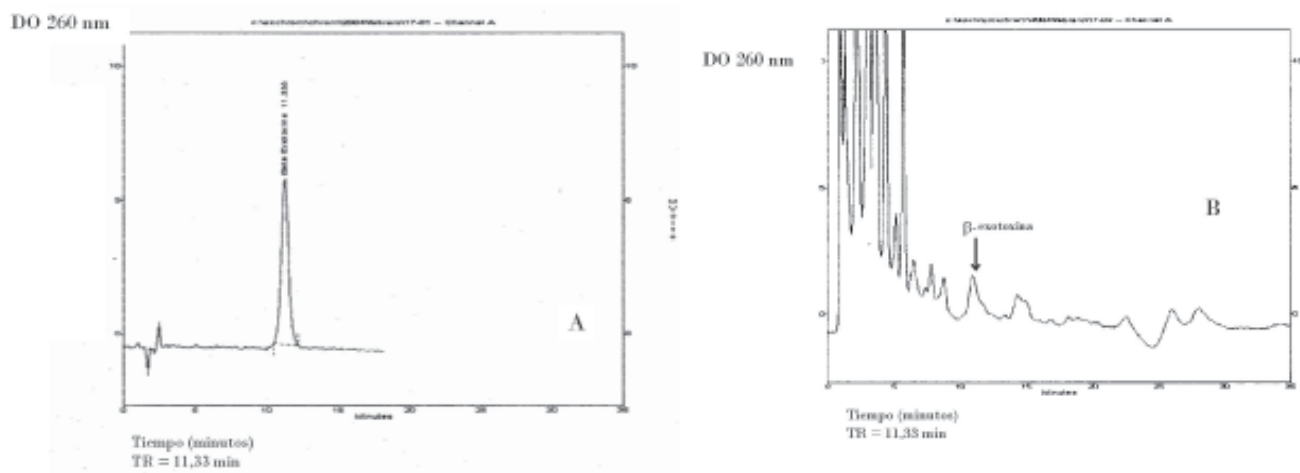


Figura 1. Cromatogramas obtenidos para el patrón de β -exotoxina ($25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (A) y para el producto comercial ($6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (control positivo) (B). Columna LiChrospher RP-18, 5 mm ($250 \times 4,6$ mm), flujo $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, λ 260 nm, volumen de inyección $100 \mu\text{L}$, fase móvil KH_2PO_4 , pH 3,0.

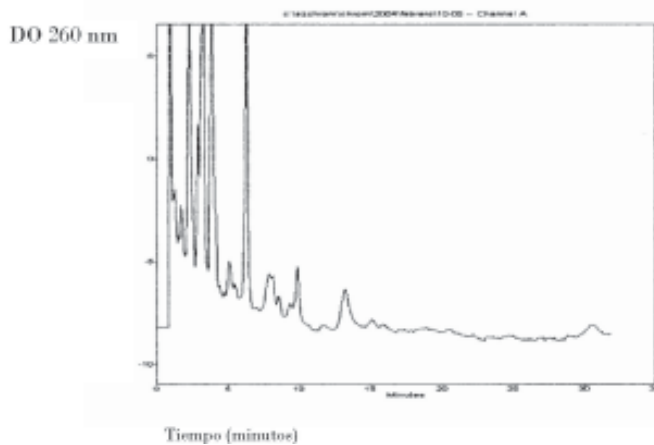


Figura 2. Cromatograma obtenido por HPLC para la cepa HD1 (control negativo). Columna LiChrospher RP-18, 5 mm ($250 \times 4,6$ mm), flujo $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, λ 260 nm, volumen de inyección $100 \mu\text{L}$, fase móvil KH_2PO_4 , pH 3,0.

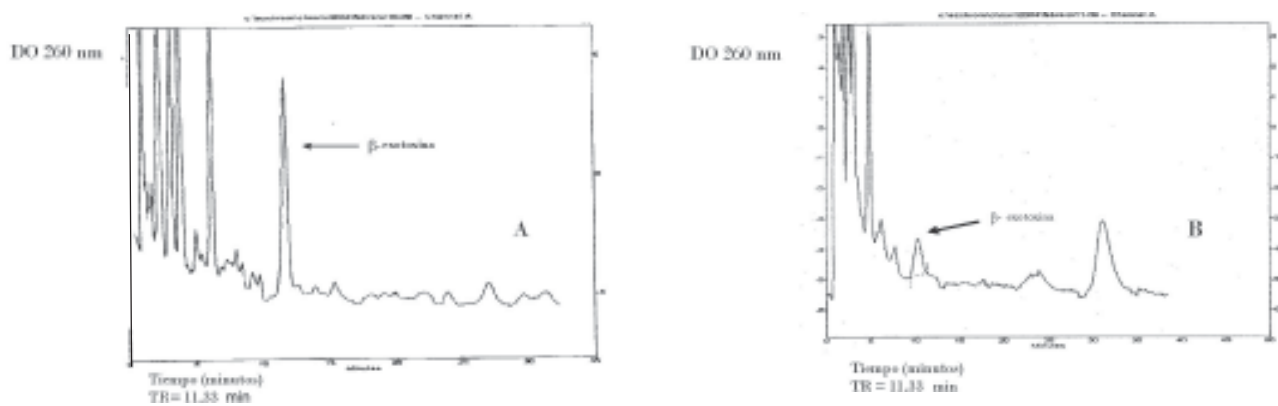


Figura 3. Cromatogramas obtenidos por HPLC para las cepas LBT9 $34 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (A) y LBT47 $4,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (B). Columna LiChrospher RP-18, 5 mm ($250 \times 4,6$ mm), flujo $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, λ 260 nm, volumen de inyección $100 \mu\text{L}$, fase móvil KH_2PO_4 , pH 3,0.

La clasificación de las cepas de *B. thuringiensis* en serovares se desarrolló sobre la base de los antígenos flagelares; sin embargo, las bases genéticas y bioquímicas del sistema de antígenos flagelares aún son desconocidas. Esto hace especialmente difícil encontrar una relación directa entre los genes determinantes del serovar y otros genes en *B. thuringiensis*, como los que determinan la síntesis de β -exotoxina [Hernández *et al.*, 2003]. En este estudio no fue posible establecer esta relación debido a que se emplearon muy pocas cepas, y las dos que resultaron positivas pertenecen a serotipos diferentes.

En estudios previos realizados en el Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal se demostró que el sobrenadante de cultivos obtenidos a partir de las cepas estudiadas en este trabajo, y esterilizado a 121°C, presentaron actividad tóxica contra un grupo de organismos plaga como ácaros y nematodos [Márquez *et al.*, 1999; 2003]; sin embargo, resulta interesante destacar que no pudo observarse en cada una de ellas el pico correspondiente a la β -exotoxina. Estos resultados pudieran tener explicación con lo afirmado por Levinson *et al.* (1990) en cuanto a que los patrones de aparición de la exotoxina termoestable sugieren que puede estar involucrado solo un único gen. La producción de exotoxina puede ser resultado de una sola reacción enzimática, a partir de moléculas precursoras presentes tanto en las cepas Exo⁺ como Exo⁻. Es probable que estos precursores estén involucrados en el control de la transcripción de los genes de la esporulación y no

como sugirieron Johnson y Peterson (1983) en la producción de la exotoxina, lo que implicaría que la β -exotoxina no se produzca por todas las cepas de *B. thuringiensis*.

Otra explicación a la no detección del metabolito en las restantes cepas pudo deberse también a niveles de concentración bajos en el medio de fermentación, a lo cual se suma la presencia de moléculas contaminantes en la solución que hace difícil su determinación. Oehler *et al.* (1982) emplearon una columna C₁₈ y como fase móvil H₂O y ácido trifluoracético; sin embargo, el método no dio resultado debido a que los contaminantes del sobrenadante del cultivo de *B. thuringiensis* coelúan con la toxina, lo cual se considera que también pudo ocurrir en los resultados presentes. Debido a esto y a su pequeña masa molecular, la utilización de un método altamente eficiente en el proceso de obtención de la exotoxina constituye un proceso clave para el recobrado y purificación de la β -exotoxina.

La adición de β -exotoxina estándar durante el proceso de crecimiento de la cepa LBT 5 dio como resultado la presencia del pico correspondiente a la β -exotoxina a concentraciones de 0,42 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ y 35,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figs. 4(A) y (B)). Esto indica que la β -exotoxina no se pierde durante el proceso de obtención previo a la cromatografía. La adición de β -exotoxina estándar a un grupo de cepas en estudio también la utilizaron Gohar y Perchat (2001) para corroborar la presencia de la toxina. A este procedimiento se le denominó *método del testigo externo*.

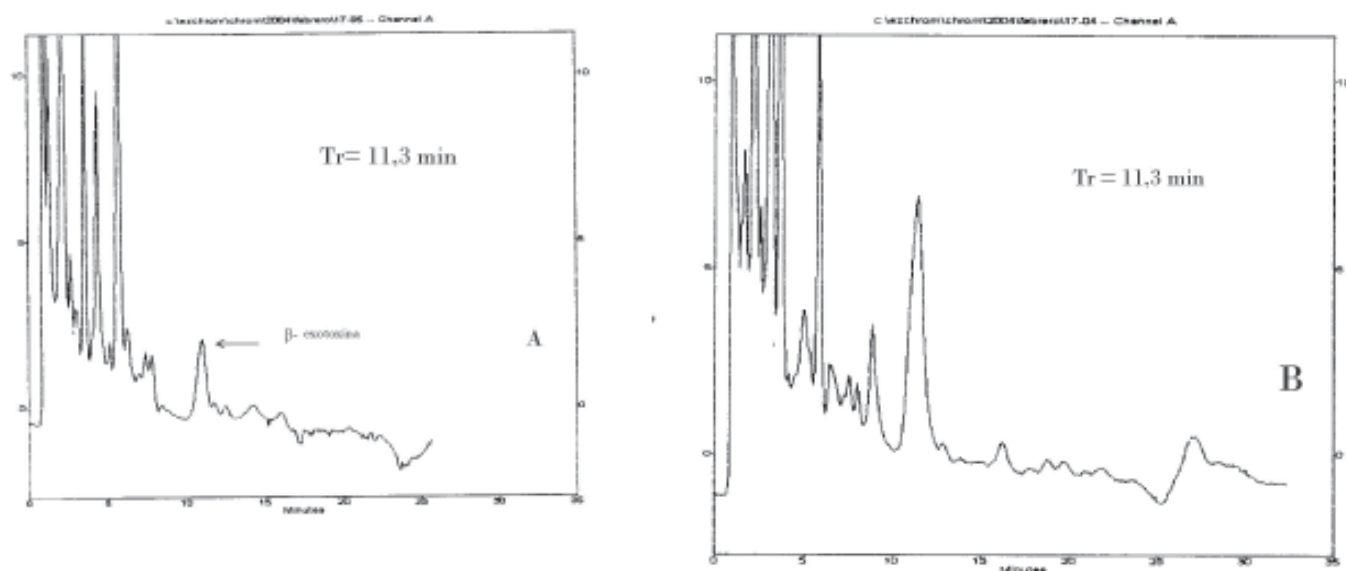


Figura 4. Cromatogramas de la cepa LBT5 contaminada con β -exotoxina estándar al inicio del cultivo (A) y una vez concluido el procesamiento de la muestra (B). Columna LiChrospher RP-18, 5 mm (250 x 4,6 mm), flujo 2 mL.min⁻¹, λ 260 nm, volumen de inyección 100 μL , fase móvil KH₂PO₄, pH 3,0.

Otra explicación a la ausencia del pico típico de la β -exotoxina en las cepas LBT4, LBT5, LBT7, LBT12, LBT13, LBT16 y LBT25 es la presencia de una segunda exotoxina denominada *tipo II*, la cual se produce a concentraciones mucho más bajas que la β -exotoxina tipo I. Este resultado fue corroborado por Levinson *et al.* (1990) al identificar la β -exotoxina tipo I en un grupo de cepas de *B. thuringiensis*; sin embargo, no se pudo detectar en una cepa de *B. thuringiensis* var. *morrisoni*, que exhibió actividad tóxica en el sobrenadante esterilizado a 121°C contra *Musca domestica*, *Diabotrica undecimpunctata* y *Leptinotarsa decemlineata*. El análisis realizado por estos autores dio como resultado la identificación de este nuevo tipo de exotoxina. Esta molécula es menos hidrofóbica y se sugiere que sea un análogo de uracilo de la exotoxina tipo I [Levinson *et al.*, 1990].

La existencia de esta toxina aclaró resultados confusos y contradictorios reportados en la literatura. Igualmente Gohar y Perchat (2001) lograron identificar la exotoxina tipo II al emplear RP-HPLC, pero con la utilización previa de precipitación con solventes orgánicos y una cromatografía de intercambio aniónico. Estos autores confirman que resulta de vital importancia la preparación previa de la muestra para la detección y cuantificación de este metabolito, e indican que una alternativa promisorio sería la utilización de detección fluorescente en lugar de absorción UV, lo que incrementaría ampliamente la sensibilidad y la selectividad de la determinación.

CONCLUSIONES

- Se detectó la presencia de β -exotoxina en las cepas LBT9 y LBT47 a concentraciones de 34 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ y 4,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente.

REFERENCIAS

- Fernández-Larrea, O.: «Aislamiento, selección y estudio de cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control fitosanitario». Informe Final PNCT, Biotecnología Agrícola, INISAV, Cuba, 1999.
- Galán, W.; K. Arévalo: «Uso de un método sencillo para detección de β -exotoxina en cepas de *Bacillus thuringiensis*», *South Western Entomologist* 19 (4):385-390, 1994.
- Glare, T.; M. Callaghan: *Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety*, Eds. John Wiley and Sons, 2000.
- Gohar, M.; S. Perchat: «Sample Preparation for β -Exotoxin Determination in *Bacillus thuringiensis* Cultures by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography», *Anal. Biochem.* 298:112-117, 2001.
- Hernández, C.; C. Martínez; H. Porcar; J. Ferré: «Correlation Between Serovars of *Bacillus thuringiensis* and Type I β -Exotoxin Production», *J. Invertebr. Pathol.* 82:57-62, 2003.
- Hernández, C.; J. Ferré: «Target-Thiery Update on the Detection of β -Exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by HPLC Analysis», *J. Appl. Microbiol.* 90:643-647, 2001.
- Johnson, D.; R. Peterson: «Limitations of HPLC for the Detection of β -Exotoxin in Cultures Filtrate of *Bacillus thuringiensis*», *European Journal of Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17:231-234, 1983.
- Levinson, B.; K. Kasyan; S. Chiu; T. Curier; J. González: «Identification of β -Exotoxin Production, Plasmids Encoding β -Exotoxin, and a New Exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by Using High Performance Liquid Chromatographic», *J. Bacteriol.* 172:3172-3179, 1990.
- Márquez, María E.; Orietta Fernández-Larrea; Lérida Almaguel: «Producción y evaluación de cultivos de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) con efecto acaricida sobre *P. latus* (Banks.) (Acarina: Tarsonemidae)», *Fitosanidad*. 3 (3):53-58, 1999.
- Márquez, María E.: «Actividad nematocida de cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Meloidogyne incognita* en Cuba» Tesis en opción al título académico de Maestro en Microbiología General, Universidad de La Habana, 2003.
- Oehler, D.; R. Gingrich; M. Haufler: «High Performance Liquid Chromatographic Determination of β -Exotoxin Produced by the Bacterium *Bacillus thuringiensis*», *J. of Agric. Food Chem.* 30:407-408, 1982.