

## DETECCIÓN DE $\beta$ -EXOTOXINA EN EL SOBRENADANTE DE LA FERMENTACIÓN Y EN LA SUSPENSIÓN CONCENTRADA DE UN NEMATICIDA EN DESARROLLO A BASE DE *BACILLUS THURINGIENSIS*

Yamilé Baró Robaina, María Elena Márquez Gutiérrez, Carlos Romeu Carballo y Yaremis Ulloa Martín

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.<sup>a</sup> B y 5.<sup>a</sup> F, Playa, Ciudad de La Habana, C. P. 11600, ybaro@inisav.cu

Las cepas de *Bacillus thuringiensis* producen, además de las proteínas Cry, una exotoxina termoestable de bajo peso molecular denominada  $\beta$ -exotoxina. Este metabolito presenta un amplio espectro de toxicidad que abarca diversos órdenes de insectos. Se han descrito algunos métodos para su detección, de los cuales el HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia) es el más utilizado, y por él se detectan dos tipos de  $\beta$ -exotoxina (tipo I y tipo II). Su uso a nivel mundial como insecticida biológico en la agricultura se ha limitado en vertebrados por su posible efecto tóxico. Es por ello que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado que las cepas de *B. thuringiensis* que producen este compuesto no deben utilizarse para el control biológico de insectos, o los productos comerciales obtenidos a partir de este microorganismo deben estar libres de  $\beta$ -exotoxina [WHO, 1999].

El Laboratorio de Bioplaguicidas del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (Inisav) cuenta con un cepario de *B. thuringiensis*, en el que las cepas se han caracterizado por métodos bioquímicos, serológicos y moleculares, donde se ha incluido la detección de  $\beta$ -exotoxina por precipitación con solventes orgánicos y HPLC [Baró, 2005; Carreras, 2008]. Desarrolla además productos bioplaguicidas a base de esta bacteria, por lo que la detección de  $\beta$ -exotoxina es un paso importante. En este trabajo se realizó la determinación de  $\beta$ -exotoxina en el sobrenadante del caldo de fermentación y en la suspensión concentrada obtenida por centrifugación de un producto nematocida en desarrollo obtenido en el laboratorio de bioplaguicidas del Inisav, y

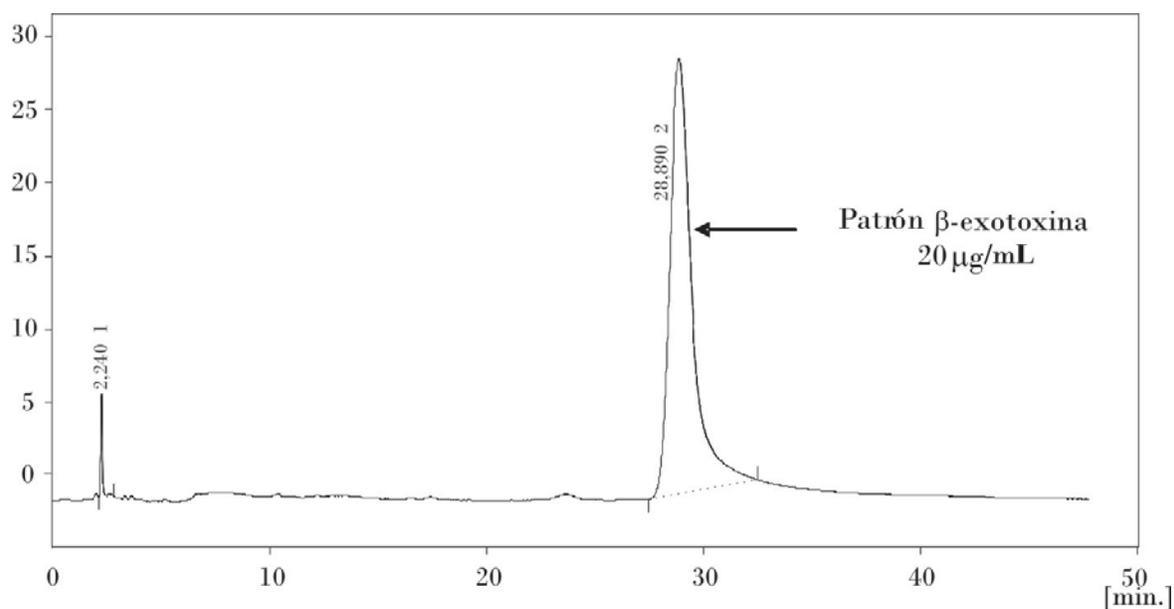
en la planta de bioplaguicidas de Güira de Melena, municipio de La Habana.

El estándar de  $\beta$ -exotoxina I fue suministrado por el doctor Jorge Ibarra (Laboratorio de Bioinsecticidas del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional de México (Cinvestav)), obtenida a partir de la cepa HD2 Berliner *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. La concentración final de la solución patrón de  $\beta$ -exotoxina I inyectada en el HPLC fue de  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

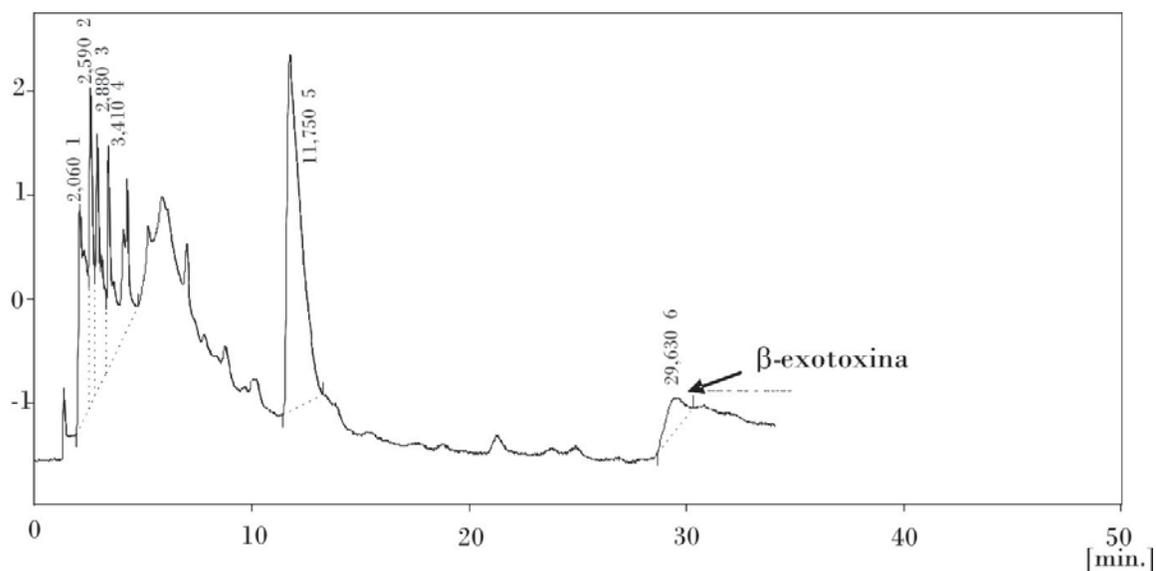
Para la determinación del compuesto se tomaron 0,2 mL del sobrenadante del producto y 10 g de la suspensión concentrada, que se resuspendieron en 20 mL de H<sub>2</sub>O destilada estéril; posteriormente se realizó el procedimiento descrito por Gohar y Perchat (2001), para lo que se tomaron 0,2 mL de las muestras y se les adicionó acetona hasta una concentración final del 90%, se incubó 15 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó a  $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ . El precipitado resultante se disolvió en agua destilada y se adicionó acetonitrilo hasta una concentración del 40%, se centrifugó nuevamente y la concentración de acetonitrilo del sobrenadante se llevó hasta el 90%. El precipitado se colectó por centrifugación y se solubilizó en 0,1 mL de agua destilada. El proceso de separación se realizó según Levinson *et al.* (1990). Se empleó una columna C<sub>18</sub> de fase reversa. La corrida se efectuó a 25°C en 50 milimoles  $\cdot \text{L}^{-1}$  de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3) a una velocidad de flujo de  $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  con detección a 260 nm. El volumen de inyección fue de 100 mL.

La Fig. 1 muestra los cromatogramas obtenidos en el proceso de detección de la  $\beta$ -exotoxina en las muestras analizadas. En el sobrenadante del producto de la cepa LBT25 se detectó el compuesto a la concentración de  $0,13 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (LBT25 Laboratorio Bioplaguecidas, Inisav) y  $0,63 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (LBT25 Planta de Bioplaguecidas, Güira de Melena). Márquez (2005) cuantificó la producción de  $\beta$ -exotoxina en la cepa LBT25 a una concentración de  $0,045 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Estos resultados no son contradictorios, ya que los niveles de producción del

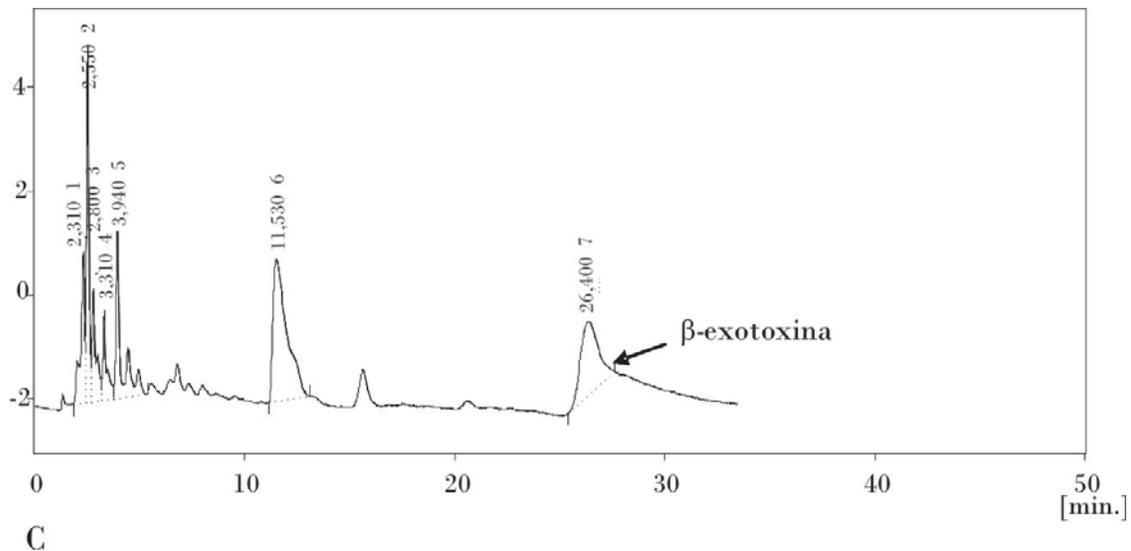
metabolito pueden ser muy variables, aun al cultivarse las cepas en el mismo medio de cultivo. Esto ha sido demostrado por otros autores al resaltar que resulta difícil producir esta toxina con rendimientos constantes debido a que su producción depende de diversos factores difíciles de establecer [Gohar y Perchat, 2001; Henández *et al.*, 2001]. En la suspensión concentrada del producto no se detectó  $\beta$ -exotoxina, lo que indica que en el proceso de recobrado y formulación se elimina el compuesto, lo cual se corroboró con el análisis.



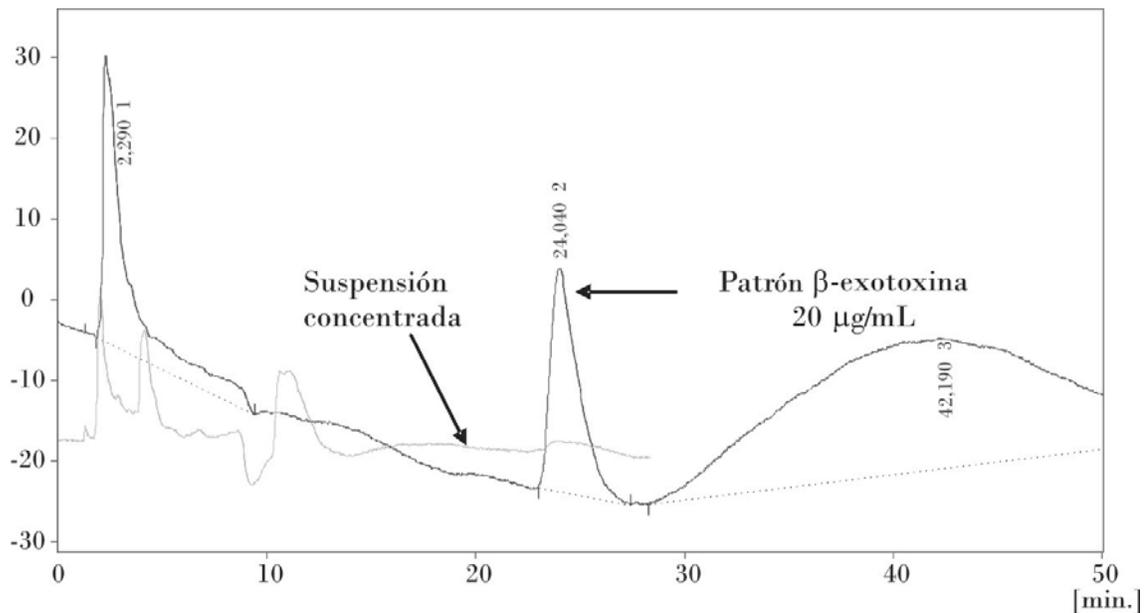
A



B



C



D

Figura 1. Cromatogramas obtenidos en la detección de  $\beta$ -exotoxina. (A) Patrón de  $\beta$ -exotoxina  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; (B) LBT25  $0,13 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; (C) LBT25  $0,63 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (D) Suspensión concentrada.

Este resultado es importante, ya que al obtener una suspensión concentrada libre de  $\beta$ -exotoxina el producto cumple las exigencias de organizaciones internacionales como la OMS y la EPA (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos), y puede utilizarse para el control de nematodos.

El empleo de la  $\beta$ -exotoxina como parte de las formulaciones a partir de *B. thuringiensis* resulta muy polémico, debido al efecto mutagénico y clastogénico encontrado en diferentes sistemas de ensayo; sin em-

bargo, algunos países como Rusia y China han desarrollado y comercializado diferentes productos a partir de este metabolito para el control de especies pertenecientes principalmente al orden Díptera, y que no pueden ser controladas por las  $\delta$ -endotoxinas [Hernández *et al.*, 2001].

## REFERENCIAS

Baró, Y.: «Detección y evaluación de las toxinas producidas por cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*», tesis en opción al título académico de Maestro en Bioquímica, Universidad de La Habana, 2005.

*Baró y otros*

- Carreras, B.: «Aislamiento y caracterización de cepas autóctonas de *Bacillus thuringiensis* con potencialidades para el control de plagas», tesis en opción al grado científico de Doctora en Ciencias Biológicas, Universidad de La Habana, 2008.
- Gohar, M.; S. Perchat: «Sample Preparation for  $\beta$ -exotoxin Determination in *Bacillus thuringiensis* Cultures by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography», *Anal. Biochem.* 298:112-117, EE. UU., 2001.
- Hernández, C.; J. Ferré; I. Larget-Thiéry: «Update on the Detection of  $\beta$ -exotoxin in *Bacillus thuringiensis* Strains by HPLC Analysis», *J. of Appl. Microbiol.* 90:643-647, EE. UU., 2001.
- Levinson, B.; K. Kasyan; S. Chiu; T. Curier; J. González: «Identification of  $\beta$ -exotoxin Production, Plasmids Encoding  $\beta$ -exotoxin, and a New Exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by Using High Performance Liquid Chromatographic», *J. Bacteriol.* 172:3172-3179, EE. UU., 1990.
- Márquez, M.: «Selección y evaluación tóxico-patogénica de cepas cubanas de *Bacillus thuringiensis* con actividad nematocida», tesis en opción al grado científico de Doctora en Ciencias Agrícolas, Universidad Central de Las Villas, Cuba, 2005.
- WHO: «Guideline Specifications for Bacterial Larvicides for Public Health Uses», WHO Document WHO/CDS/CPC/WHOPES/99.2, World Health Organization, Génova, 1999.