

CUANTIFICACIÓN POR DENSITOMETRÍA DE LA PROTEÍNA CRY DE *BACILLUS THURINGIENSIS*

Bertha Carreras Solís

Instituto de investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5ª. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, c.e.: mmarquez@inisav.cu

RESUMEN

Las toxinas proteicas Cry producidas por varias cepas de *Bacillus thuringiensis*, crecidas en el medio de fermentación GTE, fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, y las bandas proteicas obtenidas fueron entonces cuantificadas por densitometría. El resultado se comparó con la producción del estándar HD1 en el medio de fermentación LB. Se concluyó que en la producción de esta bacteria, tan importante es el medio de cultivo donde ella se reproduce como la cepa con que se trabaja.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, proteínas Cry, patrón Cry

ABSTRACT

Toxin proteins Cry produced by diverse *Bacillus thuringiensis* strains grown in fermentation medium GTE, were separated by sodium dodecil sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and the toxin protein bands were then quantified by densitometry. The result was compared with the production of the standard HD1 in the fermentation medium LB. It is concluded that the fermentation medium, where the strains reproduces, is as important as the utilized strain for the production of this important bacteria.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Cry protein, Cry pattern

INTRODUCCIÓN

La toxicidad de la proteína cristal de *Bacillus thuringiensis* contra las plagas agrícolas es ampliamente conocida. Esta bacteria es el insecticida microbiano más importante, y una poderosa fuente de genes para la transformación de plantas a fin de hacerlas resistentes a los insectos [Rowe y Margaritis 1987]. Las proteínas que componen el cristal se analizan mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), de acuerdo con la técnica descrita por Laemmli (1970) y Schagger y von Jagow (1987).

La cuantificación de los productos de *Bacillus thuringiensis* tradicionalmente se ha expresado en términos de concentración de 10^8 - 10^9 esp/mL, y más recientemente en términos de unidades internacionales (UI), basada en los ensayos biológicos de los productos comparados a un estándar.

En el registro de estos productos por la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) de Estados Unidos se han llevado a cabo cambios recientes, de manera que, desde finales de 1990, todas las etiquetas de los productos listan la cantidad de toxina como porcentaje de ingrediente activo (% i.a.). Las unidades internacionales ya no son aceptadas como un método de medida. Los productos a base de *B. thuringiensis* que contengan una mezcla de clases de las δ -endotoxinas, activas contra diferentes grupos

de insectos (por ejemplo lepidópteros y coleópteros), tienen que especificar el porcentaje de ingrediente activo de cada tipo de toxina [Brussock y Currier, 1990].

El medio de fermentación típicamente usado para la producción de *B. thuringiensis* y la naturaleza misma de esta bacteria hace muy compleja la cuantificación de porcentaje de ingrediente activo. Muchos medios de producción efectivos de bajo costo contienen grandes cantidades de crudo y proteínas insolubles, las cuales pueden ser distinguidas de la proteína cristal a ser cuantificada. Se ha utilizado la técnica de Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE) para separar la proteína cristal del resto de las proteínas del medio de crecimiento [Brussock y Currier, 1990]. Este método resultó útil para cuantificar la cantidad de *B. thuringiensis* en una gran variedad de muestras de producción que incluyen caldos de fermentación y formulados finales de los productos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron cinco aislados de *B. thuringiensis* provenientes de diferentes hábitats y regiones del país conservados en discos de papel de filtro de 5 mm de diámetro (Tabla 1).

Tabla 1. Procedencia de los aislados

Cepa	Procedencia
LBT-7	<i>Galleria melonella</i> (Matanzas)
LBT-40	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Cría INISAV)
LBT-48	Polvo de arroz granero (S. Spíritus)
LBT-52	Polvo de arroz granero (S. Spíritus)
LBT-53	Polvo de arroz granero (S. Spíritus)

Para la reproducción de estos aislados se utilizaron frascos erlenmeyer de 500 mL con 50 mL de medio GTE (glucosa-triptona-extracto de levadura), desarrollado por Carreras (2003), a los que se les añadió un disco de papel de filtro. Los cultivos fueron agitados en una zaranda orbital hasta esporulación total.

Se determinó cualitativamente la presencia del cristal proteico por observación al microscopio óptico 100X con objetivo de inmersión, mediante tinción simple con violeta cristal 0,5%.

Determinación de la composición de proteínas Cry por SDS-PAGE. Cuantificación por densitometría

Se tomó 1,5 mL de un cultivo completamente cristalífero y se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 min en centrífuga Eppendorf 5415C; el pellet fue lavado dos veces con 1 mL de NaCl 1 M y tres veces con 1 mL de agua destilada esterilizada, y finalmente resuspendido en 100 µL de agua destilada y 100 µL de buffer de lisis 2X según la metodología desarrollada por Bravo *et al.* (1998). La muestra fue calentada durante 6 min a 100°C. Se tomaron 15 µL de la muestra para realizar la SDS-PAGE 10%. La tinción de las bandas de proteínas obtenidas se realizó con azul de Coomassie 0,1% R-250 de acuerdo con lo propuesto por Brussock y Currier (1990).

Los valores de área e intensidad de las bandas de interés obtenidas en el gel de poliacrilamida se midieron en un densitómetro molecular analysis (BioRad). Estos valores

fueron intercalados en una curva estándar realizada con varias concentraciones en mg/mL de BSA (suero de albúmina bovina Sigma. Mo, USA). Los valores se compararon con los de la cepa HD1 crecida en medio LB de referencia diseñado por Sambrook *et al.* (1989), y se les realizó un análisis de varianza y un test de significación de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cepas presentaron un patrón de proteínas Cry semejante al del estándar internacional de *B. thuringiensis* HD1. En este estándar se producen inclusiones que contienen mezclas de δ -endotoxinas: 1 Cry1 (130-140 kDa) y 2 Cry2 (70 kDa) en el mismo cristal [Glare y O'Callaghan, 2001].

La banda de 130-140 kDa corresponde generalmente a las toxinas Cry1, y es la más frecuentemente encontrada en las cepas de *B. thuringiensis* [Yamamoto y Powell, 1993]. Aunque puede generalizarse que todas ellas son activas solo contra lepidópteros, existen excepciones. Por ejemplo, Cry1Ab y Cry1Ac son tóxicas tanto para lepidópteros como para dípteros [Smith y Ellar, 1994]. El caso más extraño es la toxina Cry1Ba, para la cual se ha reportado actividad contra lepidópteros, coleópteros [Bradley, 1995] y áfidos [Warren *et al.*, 1996].

Según Ziniu y Biwang (1998), en la mayoría de las cepas de *B. thuringiensis* estudiadas en relación con la toxicidad contra nemátodos están involucradas proteínas de 130-140 kDa. Ejemplos son los componentes proteicos de las toxinas Cry5 y Cry12, que son estimados tóxicos tanto para las formas larvianas como para las adultas de los nemátodos [Payne *et al.*, 1992 y Narva *et al.*, 1991].

La variabilidad patogénica que muestran las proteínas en el rango de 130-140 kDa es muy grande, y esto se ve claramente en los siguientes ejemplos [Galán *et al.*, 1996]:

Proteínas Cry (peso molecular, kDa)	Insecto u organismo plaga
Cry 4 (135 kDa y 128 kDa)	Dípteros
Cry5 (152.3, 141.8 y 140 kDa)	Nemátodos, ácaros
Cry7 (130 kDa)	Coleópteros
Cry8 (130 y 134 kDa)	Coleópteros y ácaros
Cry9 (126 y 130 kDa)	Lepidópteros
Cry12 (142 kDa)	Nemátodos y ácaros

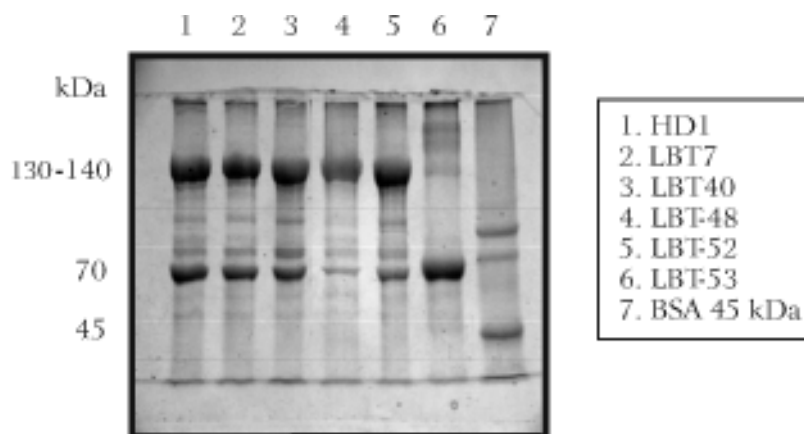


Figura 1. Patrón de proteínas Cry característico en cada cepa de *Bt*.

Para la cuantificación de la proteína Cry se tomó como referencia a la cepa HD1 porque, además de ser el estándar internacional de *B. thuringiensis*, la producción de proteína Cry es muy buena al tener promotores muy fuertes [Agaissie y Lereclus, 1995].

El análisis de la producción de proteínas Cry de esta cepa en el medio de referencia LB y en el medio GTE, así como en cinco de las cepas, se observa en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Producción de proteínas Cry (mg/mL)

Cepa	Banda 130-140 kDa media (mg/mL) Cry1	Banda 67kDa media (mg/mL) Cry2
HD1 (GTE)	408,3 a	210 b
HD1 (LB)	428 a	20,5 a
LBT-53	875 bc	165 ab
LBT-52	1 015 c	280 bc
LBT-48	681,6 ab	250 bc
LBT-40	801,6 bc	363,3 c
LBT-7	645 ab	113,3 ab

Medias con letras diferentes difieren significativamente, $p < 0,05$.

El medio GTE no solo permite un crecimiento más rápido de la bacteria, sino que también brinda información útil referente a la importancia de suministrar fuentes nitrogenadas orgánicas en el ajuste de los medios de cultivo, aspecto muy importante que ha de tenerse en cuenta en los medios de producción donde se trabaja con materias primas complejas [Carreras, 2003].

La comparación de la producción de proteína Cry (mg/mL) de cada cepa de *Bt* y del estándar Internacional HD1 en el medio de cultivo GTE y en el medio de referencia LB se detalla a continuación:

HD1 (GTE) respecto a HD1 (LB). No hubo diferencias significativas en cuanto a la producción de Cry1, pero sí en cuanto a la producción de Cry2. La cepa HD1 en el medio LB produjo una concentración de Cry2 significativamente menor.

HD1 (LB) respecto a las otras cepas en medio GTE. En cuanto a la producción de Cry1 las cepas LBT-53, LBT-52 y

LBT-40 tuvieron una producción significativamente mayor. La producción de Cry1 de las cepas LBT-48 y LBT-7 no difiere significativamente de la cepa HD1 en medio LB.

Las cepas LBT-52, LBT-48, LBT-40 tuvieron una producción significativamente mayor de Cry2. Las LBT-53 y LBT-7 no difieren significativamente en la producción de Cry2 respecto a la HD1 en LB.

HD1 (GTE) respecto a las otras cepas en medio GTE. Se obtuvo el mismo resultado para la producción de Cry1, pero se recogieron producciones significativamente mayores de Cry2 en LB a excepción de la cepa LBT-40.

El medio GTE permitió una producción de proteína Cry permisible a ser cuantificada por SDS-PAGE.

Acorde con los resultados, se puede considerar que la producción de proteínas Cry depende tanto del medio de cultivo como de la cepa. Respecto a la producción de proteínas Cry, medio de cultivo, cepas y toxicidad, en la literatura se hace referencia a que diferentes medios pue-

den cambiar tanto la toxicidad hacia diferentes insectos blancos como la potencia insecticida de productos obtenidos de la misma cepa [Salama *et al.*, 1983]. Yudina *et al.* (1992) y Farrera *et al.* (1998) demostraron que diferentes fuentes de nutrientes pueden afectar la velocidad de síntesis de las δ -endotoxinas y el tamaño de los cristales.

También puede suceder que cepas diferentes en un mismo medio de cultivo tengan diferente producción de proteínas Cry, y esto puede estar dado por la existencia de multicopias de genes *cry*, promotores fuertes o la existencia de un ARNm de larga vida [Agaïsse y Lereclus 1995; Baum y Malvar, 1995].

CONCLUSIONES

- La producción de proteínas Cry de *B. thuringiensis* depende tanto del medio de cultivo donde se reproduce como de la cepa utilizada.

REFERENCIAS

- Agaïsse, H.; D. Lereclus: «How Does *Bacillus thuringiensis* Produce so much Insecticidal Crystal Protein», *J. Bacteriol.* 177:6027-6032, 1995.
- Baum, J. M.; T. Malvar: «Regulation of Insecticidal Crystal Protein Production in *Bacillus thuringiensis*», *Mol Microbiol* 18:1-12, 1995.
- Bradley, D. «The Insecticidal CryIB Crystal Protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* Has Dual Specificity to Coleopteran and Lepidopteran Larvae», *J. Invertebr. Pathol.* 65:162-173, 1995.
- Brussock, S. M.; T. C. Currier: «Use of Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis to Quantify *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxins», *Analytical Chemistry of Bacillus thuringiensis*. Chapter 9, 1990, pp. 78-87.
- Carreras, B.: «Caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control fitosanitario». Tesis en opción al título académico de Maestro en Microbiología, Mención en Microbiología General, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 2003.
- Farrera, R. R.; F. Pérez-Guevara; M. de la Torre: «Carbon:Nitrogen Ratio Interacts with Initial Concentration of Total Solids of Insecticidal Crystal Protein and Spore Production in *Bacillus thuringiensis* HD-73», *Appl. Microbiol Biotechnol.* 49:758-765, 1998.
- Galán, L. J.; J. A. García; M. E. Santos; I. Quintero: «Mecanismo molecular de acción de la delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*», *Avances en la biotecnología de B. thuringiensis*, Univ. Autónoma de Nuevo León, México, 1996, pp. 129-155.
- Glare, T. R.; M. O'Callaghan: *Characterization in Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety*, Inglaterra, 2001, pp. 6-10.
- Laemmli, N. K.: «Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4», *Nature* 227:680, 1970.
- Narva, K. E.; J. M. Payne; G. E. Schwab; L. A. Hickie; T. Galasan; A. J. Sick: «Novel *Bacillus thuringiensis* Microbes Active Against Nematodes and Genes Encoding Novel Nematode-Active Toxins Cloned from *Bacillus thuringiensis* Isolates», GeneBank 85 (GeneWorks 2.4, release 14.0, October 94), 1991.
- Payne, J. M.; R. J. C. Cannon; A. L. Bagley: *Novel Bacillus thuringiensis Isolates for Controlling Acarides*, PCT International Patent Application No. WO 92/19106, 1992.
- Rowe, G. E.; A. Margaritis: «Bioprocess Developments in the Production of Bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*», *J. Ferm. Bioeng.* (6): 87-120, 1987.
- Salama, H. S.; M. S. Foda; H. T. Dulmage; A. El-Sharaby: «Novel Fermentation Media for Production of Delta-Endotoxins from *Bacillus thuringiensis*», *J. Invertebr. Pathol.* 41:8-19, 1983.
- Sambrook, J.; E. F. Fritsch; T. Maniatis: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold. Spring Harbor, New York, 1989.
- Schagger, H.; G. von Jagow: «Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa», *Analytical Biochemistry* 166:368-379, 1987.
- Smith, G. P.; D. J. Ellar: «Mutagenesis of Two Surface-Exposed Loops of the *Bacillus thuringiensis* CryIC-Endotoxin Affects Insecticidal Specificity», *Biochem. J.* 302:611-616, 1994.
- Warren, G. M.; M. G. Koziel; M. A. Mullins; G. J. Nye; B. Carr; N. M. Desai; K. Kostichka; N. B. Duck; J. J. Estruch: «Novel Pesticidal Proteins and Strains». Patent WO 96/10083. World Intellectual Property Organization, 1996.
- Yamamoto, T.; G. K. Powell: «*Bacillus thuringiensis* Crytal Protein: Recent Advances in Understanding Its Insecticidal Activity», *Advanced Engineered Pesticides*, Marcel Dekker, Inc., E. U., 1993, pp. 3-42.
- Yudina, T. G.; O. V. Salamakha; E. V. Olekhovich; N. P. Rogstyk; N. S. Egorov: «Effect of Carbon Source on the Biological Activity and Morphology of Parasporal Crystal from *Bacillus thuringiensis*», *Microbiology* 61:402-407, 1992.
- Ziniu, Y.; H. Biwang: «Biocontrol of Plant-Parasitic Nematodes by Bacteria», *Journal of Fujian Agricultural University* 27(3):316-321, 1998.