

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN EXTRACTOS CRUDOS DE CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis* AISLADAS DE BOYACÁ Y CUNDINAMARCA

TOTAL PROTEIN OF CRUDE EXTRACTS AND QUANTIFICATION THE NATIVE *Bacillus thuringiensis* STRAINS ISOLATED FROM BOYACÁ AND CUNDINAMARCA

TORRES CABRA, Eneida ¹

HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, Javier ²

PERÉZ RUBIANO, Claudia Constanza ³

RESUMEN

Las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* (Bt) producen durante la esporulación cristales paraesporales que son tóxicos contra larvas de insectos lepidópteros, coleópteros y dípteros plaga. En el presente estudio se cuantificaron 10 aislamientos nativos de Bt provenientes del Banco de Cepas Nativas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, aisladas de suelo de los municipios de Ráquira, Santa Sofía, Villa de Leyva y Sutamarchán, en Boyacá; y Susa, Cundinamarca. Se obtuvo extractos crudos de proteínas totales de las 10 cepas, incubándolas en medio de cultivo Luria Bertani (LB) por 15 días a 37 °C. Para la cuantificación de proteína total de la mezcla espora-cristal se usó el método de Bradford, utilizando como patrón estándar una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA). Después de 5 minutos se realizó la determinación en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. El azul más intenso lo presentaron las cepas ZBUJTL35 y ZBUJTL39, con una concentración de 560,71 y 526,43 µg/ml respectivamente. El método de Bradford es una técnica simple y rápida para estimar la concentración de proteínas. Estas cepas serán utilizadas para evaluar su toxicidad sobre larvas de *Bemisia tabaci*.

1 Bióloga. M.Sc.
Fundación Universitaria Juan de Castellanos
Facultad de Ciencias Agrarias
Grupo de Investigación CEAS
etorres@jdc.edu.co

2 Lic. Biología. M.Sc.
Universidad Jorge Tadeo Lozano
Facultad de Ciencias e Ingeniería
Departamento de Ciencias Naturales y Ambientales, GENBIMOL
javier.hernandez@utadeo.edu.co

3 Bióloga., M.Sc.
Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia Facultad de Ciencias.
Grupo Micram
claudia4499@hotmail.com

Recibido: 26/06/2013

Aceptado: 28/10/2013

Palabras clave: bacteria, Coomassie azul brillante G-250, esporulación, proteína Cry, reactivo de Bradford.

ABSTRACT

The Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* (Bt) produce parasporal crystal during sporulation which are toxic against insect larvae of lepidopteran, coleopteran and dipteran. In the present study, 10 native isolations of Bt strains were quantified from the Native Strains Bank of the Jorge Tadeo Lozano University, isolated from soil in the municipalities of Ráquira, Santa Sofía, Villa de Leyva and Sutamarchán, in Boyacá; and also in Susa, Cundinamarca. Crude extracts of total proteins from the 10 strains incubated in Luria-Bertani medium (LB) for 15 days at 37 °C were obtained. For quantification of total protein of the spore crystal mixture was used the Bradford method using a standard pattern a calibration curve with bovine serum albumin (BSA). After 5 minutes, the determination was realized in the spectrophotometer at a wavelength of 595 nm. The brighter blue were presented by the strains ZBUJTL35 and ZBUJTL39, with a concentration of 560.71 and 526.43 mg / ml, respectively. The Bradford method is a simple and fast technique to estimate the protein concentration. The strains will be used to determine the toxicity over Bemisiatabaci larvae.

Key words: *bacteria, Bradford reagent, Coomassie Brilliant Blue G-250, Cry protein, sporulation.*

INTRODUCCIÓN

Las proteínas Cry son un grupo de proteínas de inclusión paraesporal de Bt, llamadas proteínas insecticidas de cristal (ICPS's) (Höfte & Whiteley, 1989), también denominadas δ -endotoxinas, las cuales son codificadas por los genes cry, (Schnepf *et al.*, 1998). Actualmente, las cepas aisladas muestran un amplio rango de especificidad contra insectos de diferente orden (Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Himenoptera, Homoptera y Acari) y otros invertebrados (Nematelmintos y platelmintos) (Feiltelson, 1993).

Es de resaltar que en este momento más del 90% de los bioplaguicidas comerciales basados en entomopatógenos, utilizan en sus formulaciones mezclas de esporas e ICP's procedentes de varias cepas de Bt (Joung & Cote, 2000). Los productos a base de Bt que contengan δ -endotoxinas, tienen que especificar en su etiqueta el porcentaje de ingrediente activo de cada tipo de toxina (Brussock

& Currier, 1990), dado que, la producción de proteínas Cry de Bt dependen tanto del medio de cultivo donde se reproduce, como de la cepa utilizada (Solis, 2005).

Las proteínas son sintetizadas como componentes estructurales y catalíticos de la mayoría de las reacciones celulares, la cuantificación de estas proteínas se puede realizar por diferentes métodos, muchos se basan en la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz UV, para la formación de derivados químicos o la capacidad de unirse a ciertos colorantes. En particular, los principales métodos para la cuantificación de proteínas a través de derivados colorimétricos son: Bradford, Biuret, Lowry y ácido bicinonínico (BCA) (Fernández & Galván, 2010).

Dentro de los métodos colorimétricos está el originalmente propuesto por Bradford (1976), que se fundamenta en la unión proteína-colorante, donde el azul brillante

G-250 Coomassie se adhiere a la proteína, el colorante se torna de rojizo a azulado y el máximo de absorción del colorante cambia de 465 a 595 nm (Fernández & Galván, 2010). De esta manera, el objetivo de este estudio fue realizar la cuantificación de la proteína Cry de los aislamientos nativos de Bt para determinar su concentración.

METODOLOGÍA

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Fundación Universitaria Juan de Castellanos (FUJC), y el Laboratorio de Investigación Química y de Tecnología de Alimentos de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), ubicados en la ciudad de Tunja.

Material biológico: Se utilizaron 10 cepas de aislamientos nativos de Bt provenientes del Banco de Bacilos Esporulados de la Universidad Jorge Tadeo Lozano (UJTL), estas muestras fueron recolectadas del suelo en diferentes regiones productoras de tomate. Para este estudio se utilizaron 10 cepas de aislamientos nativos de *B. thuringiensis* provenientes de 5 municipios de Colombia, departamentos de Cundinamarca y Boyacá (Tabla 1). Las cepas se conservaron por triplicado en una tira de papel filtro dentro de una ampolleta color ámbar. Cada cepa tiene asignado un código compuesto por la zona muestreada, que corresponde al departamento (ZC: zona Cundinamarca, ZB: zona Boyacá,), seguido de las iniciales de la Universidad Jorge Tadeo Lozano (UJTL), y el número de la cepa (Tabla 1).

Preparación de medio de cultivo *Luria Bertani* (LB) y siembra de cepas Bt. Para la preparación de 1 litro de medio, se pesaron 10 g de triptosa, 5 g de extracto de levadura, 13 g de agar y 10 g de NaCl. El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Después el LB preparado se sirvió en cajas de Petri en cámara de flujo laminar, colocando aproximadamente 15 ml en cada una de las cajas.

Posteriormente, las cepas nativas de Bt que estaban almacenadas en tiras de papel dentro de una ampolleta, se sembraron por triplicado en medio LB, incubándose por siete días a 30 °C. Se realizó un diseño al azar con 6 repeticiones por cada cepa. Finalmente, a partir de estas bacterias se obtuvo los extractos crudos.

Descripción macroscópica de colonias de Bt y coloración de Gram. Una vez crecidas las cepas se sembraron nuevamente en medio LB por estría múltiple por 24 h a 30 °C, con el propósito de obtener colonias aisladas para hacer descripción macroscópica y coloración de Gram verificando su pureza.

Obtención de extractos crudos. Los bacilos cultivados en medio LB, se tomaron asépticamente con una asa y se pasaron a tubos falcón de 15 ml, agregándose 4 ml de bicarbonato de sodio (amortiguador que permite la solubilización de las proteínas totales) (Bravo & Cerón, 2004) agitándose en vórtex por 10 segundos y se mantuvieron a 4 °C para su análisis posterior.

Tabla 1. Departamento, municipio y número de cepa de aislamientos nativos de Bt del Banco de Cepas Nativas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano

DEPARTAMENTO	MUNICIPIO	CÓDIGO DE LA CEPA
Cundinamarca	Susa	ZCUJTL9 - ZCUJTL11 ZCUJTL14
	Ráquira	ZBUJTL21 - ZBUJTL23
Boyacá	Santa Sofía	ZBUJTL24
	Villa de Leyva	ZBUJTL33 - ZBUJTL34- ZBUJTL35
	Sutamarchán	ZBUJTL39

Para la preparación de bicarbonato de sodio (pH 10.5) utilizado como buffer, se pesaron 0,33 g de bicarbonato de sodio 0,1 M (NaHCO₃) y 0,65 g de carbonato de sodio 0,1 M (Na₂CO₃), aforándose con agua destilada a 100 ml.

Preparación del Reactivo Bradford. Se pesaron 10 mg de azul de Coomassie G-250 en balanza analítica, se adicionaron 5 ml de etanol al 95 % v/v y 10 ml de ácido fosfórico al 85% v/v, aforándose a 100 ml con agua destilada, esta solución se filtró con papel Whatman y se almacenó en frasco color ámbar a 4 °C (Bradford, 1976).

Preparación de la solución concentrada de albúmina de suero bovina (BSA) 1000 µg/ml. Se pesaron 4 mg de BSA en balanza analítica y se disolvieron en 4 ml de agua destilada, homogenizando la solución. Después, se hizo una curva de calibración a partir de diferentes concentraciones de BSA, las soluciones se prepararon con concentración de 100-1000 µg/ml, a partir de BSA y agua destilada (Buffer), llevándolas a un volumen final 1 ml (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones de BSA usadas para la elaboración de la curva de calibración

Concentración BSA (µg/ml)	Cantidad de BSA(µl)	Cantidad de buffer(µl)
100	100	900
200	200	800
w400	400	600
500	500	500
600	600	400
800	800	200
1000	1000	0

Determinación de proteínas por la técnica de Bradford. Se mezclaron en un tubo de vidrio 100 µl cada una de las concentraciones de BSA con 5 ml de reactivo de Bradford, después de 5 minutos se realizó la lectura en el espectrofotómetro (Thermo Scienti-

fic Genesys 10s Vis-serial) a una longitud de onda de 595 nm, ajustando el cero de absorbancia con el blanco.

Partiendo de la Ley de Beer-Lamber, se realizó una curva ordenando en el eje X las concentraciones y en el eje Y las absorbancias, luego se realizó la regresión línea y se obtuvo la ecuación $Y=mx+b$ y el R^2 .

Cuantificación de proteínas totales en los extractos crudos por la técnica de Bradford. Para cuantificar las concentraciones de proteína total en los extractos crudos de los aislamientos nativos, se empleó un diseño experimental aleatorio en donde se consideraron para la lectura 2 réplicas y 3 repeticiones para cada réplica, de cada una de las 10 muestras (cepas) de estudio y un blanco (el volumen de la solución de proteínas se reemplaza por agua), es recomendable realizar por lo menos dos replicas, tanto por el cálculo de la curva patrón como para la cuantificación de la muestra. Para validar los resultados obtenidos, se realizó un análisis de varianza. De esta manera se tomaron 100 µl de cada una de ellas y se agregaron 900 µl de Buffer (Bicarbonato). Posteriormente, en tubos de vidrio (16 X 150) se mezclaron 100 µl de la mezcla anterior con 5 ml de reactivo de Bradford, pasados 5 minutos se realizó la lectura en el espectrofotómetro a una absorbancia a 595 nm (Bradford, 1976).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción macroscópica de colonias de Bt y coloración de Gram. Los 10 aislamientos nativos se aislaron en el medio de cultivo LB por 24 horas a 30 °C, esta bacteria se caracteriza por un crecimiento rápido en medio *Luria Bertani* (LB) a una temperatura óptima entre 28 °C y 32 °C y un pH óptimo de 7.0 (Holt *et al.*, 2000). Terminada la incubación las colonias formadas presentaron una morfología circular,

borde irregular y de color crema. Además, son bacilos Gram positivos esporulados en la coloración de Gram (Ibrahim *et al.*, 2010) (Figura 1).

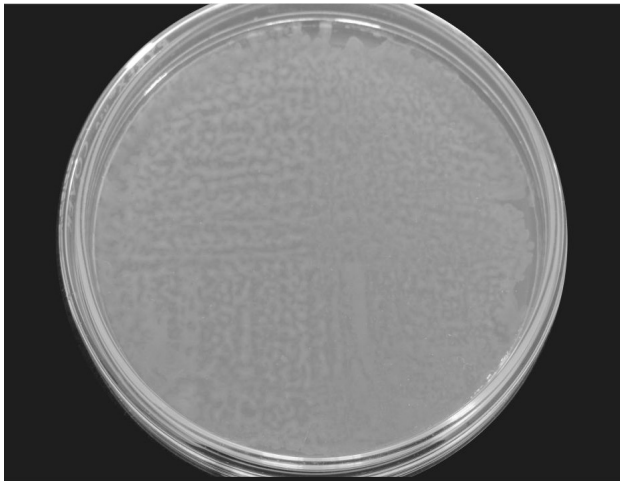


Figura 1. Cepa de Bt incubada en medio de cultivo Luria Bertani.

Obtención y cuantificación de proteínas totales de los extractos crudos en bacilos nativos esporulados. Se obtuvo extractos crudos de espora-cristal, teniendo en cuenta que una de las características más importantes de Bt es la de sintetizar durante la fase estacionaria de su ciclo de crecimiento, una inclusión parasporal denominada cristal o δ -endotoxina (Schnepf *et al.*, 1998). Con los datos obtenidos se realizó la curva (Figura 2) que permitió determinar la ecuación de corrección de los datos experimentales.

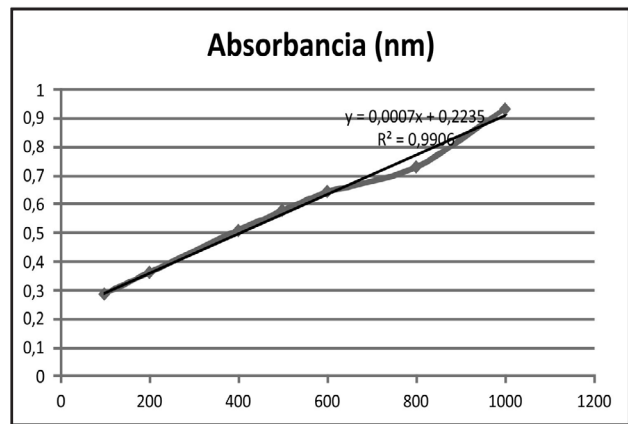


Figura 2. Curva de calibración de Bradford longitud de onda 595 nm elaborado a partir de concentración de BSA.

La ecuación de la recta para la regresión fue $y=0,0007x+0,2235$ y el coeficiente de correlación, $R^2 = 0,9906$ este valor debe ser lo más cercano a 1, esto sugiere una relación lineal entre la absorbancia y la concentración (variables). El R^2 calculado indica que el 99 % de la información está ajustada a la variable Y (absorbancia), confirma además que el grado de relación entre las variables es alto (Pateiro & González, 2006).

Además, para determinar la cuantificación de proteína total de la mezcla espora-cristal presente en las cepas de estudio, se utilizó el método de Bradford, utilizando como patrón estándar una curva de calibración BSA pues el método Bradford es bastante sensible a la BSA (Stoscheck, 1990).

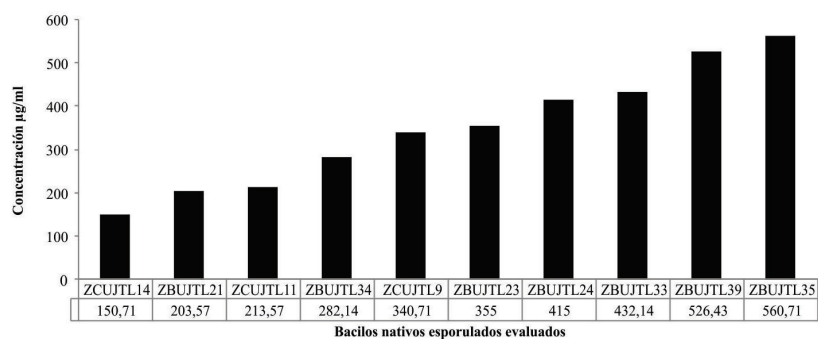


Figura 3. Concentración de proteína total del extracto crudo de 10 cepas nativas de *B. thuringiensis*.

De otro lado, en la Figura 3 se presenta la concentración obtenida para cada una de las cepas nativas de Bt analizadas. Las cepas de Bt, las que presentaron mayor concentración de proteínas fueron la ZBUJTL35 con un valor de 560,71 $\mu\text{g/ml}$, seguido de 526,43 $\mu\text{g/ml}$ (ZBUJTL39) y las de menor valor fueron la ZCUJTL14 con 150,71 $\mu\text{g/ml}$ y 203,57 $\mu\text{g/ml}$ (ZBUJTL21). Lecadet & Dedonder (1971) afirman que la síntesis de la inclusión paraesporal ocupa una proporción entre el 20 - 30 % de la proteína producida por Bt. Sin embargo, la actividad biológica de una cepa no se define por la producción de cantidades determinadas de proteínas sino por su potencial en los ensayos biológicos (Ramírez & Ramírez, 2009).

En la cuantificación de proteínas totales en extractos crudos de cepas nativas de Bt se empleó la técnica de Bradford, que es sensible e involucra la unión del Coomassie Brilliant Blue G-250 a una proteína absorbiendo a 595 nm de λ (Bradford, 1976). La unión del colorante a la proteína provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante de 365 a 595 nm, por lo cual el cambio en la absorbancia a 595 nm es proporcional a la concentración de proteína en la muestra (Fernández & Galván, 2010).

La unión del colorante a la proteína es un proceso muy rápido aproximadamente 2 minutos, y el complejo proteína-colorante permanecen dispersos en solución por un tiempo relativamente largo, aproximadamente 1 hora, con lo que se puede decir que el procedimiento es muy reproducible y rápido, y no requiere de mucho tiempo (Bradford, 1976).

El azul más intenso lo presentó la cepa ZBUJTL35 y ZBUJTL39, teniendo en cuenta que a mayor cantidad de proteínas, mayor color desarrollado y por lo tanto, mayor absorbancia (Fernández & Galván, 2010).

CONCLUSIONES

El método Bradford es una técnica colorimétrica, que se caracteriza por ser sensible, simple, rápida y económica para cuantificar proteínas Cry.

En cuanto a la concentración de proteínas totales, de las 10 cepas nativas de Bt del Banco de Bacilos esporulados de la Universidad Jorge Tadeo Lozano el valor más alto lo presentó la cepa ZBUJTL35 con 560,71 $\mu\text{g/ml}$ y el valor más bajo fue de 150,71 $\mu\text{g/ml}$ para la cepa ZCUJTL14.

Posterior a la cuantificación de la proteína Cry de Bt se deben realizar ensayos biológicos específicos que permitan medir su actividad tóxica contra insectos plaga. Por consiguiente, la evaluación como insecticida será objeto de otra investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical biochemical* 72 (1): 248-254.

BRAVO, A. & CERÓN, J. 2004. *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. ED., La Buena Semilla. Colombia. 294 pp.

BRUSSOCK, S. M., & CURRIER, T. C. 1990. Use of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis to quantify *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *Analytical Chemistry*. 87 pp.

FEILTELSON, J. 1993. The *Bacillus thuringiensis* family tree. *Advanced Engineered Pesticides*. 63 -71.

- FERNÁNDEZ, E. & GALVÁN, A. 2010. Métodos para la cuantificación de proteínas. En: Archivos de interés: Prácticas Generales de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. Disponible en <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/27%20m%20c3%89todos%20para%20la%20cuantificaci%20c3%93n%20de%20prote%20c3%8dnas.pdf> Accesado: 28/08/2013.
- JOUNG, K. B. & COTE, J.C. 2000. A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Technical Bulletin No. 29. Horticultural Research and Development Centre. Canada. 16 pp.
- HÖFTE, H., & WHITELEY, H. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiological reviews 53 (2): 242-255.
- HÖLT, J., KRIEG, N., SNEATH, P., STALEY, J., & WILLIAMS, S. 2000. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. ED., Lippincott Williams & Wilkins. 605-607.
- IBRAHIM, M. A., GRIKO, N., JUNKER, M., & BULLA, L. A. 2010. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. Bioeng Bugs 1 (1): 31-50.
- LECADET, M., & DEDONDERT, R. 1971. Biogenesis of the crystalline inclusion of *Bacillus thuringiensis* during sporulation. European Journal of Biochemistry 23 (2): 282-294.
- PATEIRO-LÓPEZ, B., & GONZÁLEZ-MANTEIGA, W. 2006. Multivariate partially linear models. Statistics & Probability Letters 76 (14): 1543-1549.
- RAMÍREZ, L., & RAMÍREZ, N. 2009. Aislamiento y caracterización molecular y biológica de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* para el control de Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), Insecto plaga del tomate (*Lycopersicon esculentum*). Pontificia Universidad Javeriana. Tesis. Colombia. 184 pp.
- SCHNEPF, E., CRICKMORE, N., VAN RIE, J., LERELUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., & DEAN, D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and molecular biology reviews 62 (3): 775-806.
- SOLÍS, B. C. 2005. Cuantificación por Densitometría de la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis*. Fitosanidad 9 (1): 43-46.
- STOSCHECK, CM. 1990. Quantitation of Protein. Methods in Enzymology 182: 50-68.