

Extracción y purificación de los metabolitos secundarios con actividad biológica de la cepa *Bacillus thuringiensis* autóctona de la Comarca Lagunera

Laura Andrea Pérez-García^a, Kenia Mirozlava Favela-González, Cindy Nataly del Rio Arellano^a, Norma M. De la Fuente-Salcido^{a*}.

^a Departamento de Bioprospección y Bioprocesos, Universidad Autónoma de Coahuila-Unidad Torreón, Facultad de Ciencias Biológicas, Posgrado en Ingeniería Bioquímica, Blvd. Torreón-Matamoros Km 7.5, CP 27275, Torreón, Coahuila de Zaragoza, México.
*normapbr322@gmail.com

Palabras clave: bacteriocinas, lipasas, β -exotoxina

Introducción

En la actualidad diversos metabolitos biosintetizados por el género *Bacillus*, se encuentran en desarrollo para ser considerados como una importante alternativa para generar diferentes productos biológicos efectivos para inhibir el desarrollo de bacterias dañinas y hongos fitopatógenos. Una de las especies más conocidas como una fuente biosintética muy importante de metabolitos, es *Bacillus thuringiensis*. Estos metabolitos secundarios son las δ -endotoxinas y β -exotoxinas¹. Las bacteriocinas son una clase de péptidos con actividad antimicrobiana, se utilizan en el diseño de tratamientos post-cosecha para el biocontrol de hongos y bacterias fitopatógenos²³. Las lipasas son enzimas hidrosolubles con capacidad para actuar en la interfaz entre las fases acuosa y orgánica. Esta propiedad de las lipasas para catalizar la hidrólisis de enlaces éster en sustratos lipídicos insolubles en agua, les confiere un gran potencial biotecnológico⁴. Por lo anterior, se identificaron y caracterizaron los metabolitos secundarios (lipasas y bacteriocinas) de *B. thuringiensis* autóctono de la región de la Comarca Lagunera.

Metodología

Se realizó la producción, extracción y purificación de metabolitos secundarios de las cepas *B. thuringiensis* CF 13 y 42 (*Bt 13* y *Bt 42*). La cinética de crecimiento en caldo de cultivo soya tripticaseína (CST) (28°C/200 rpm/24 h), la recolectaron por centrifugación (12,000 rpm/20 min/4 °C) y purificaron parcial con sulfato de amonio (60%) proporcionaron muestras con metabolitos y se separaron por centrifugación. Las muestras se filtraron (0.45 μ m Merck Millipore), se separaron por cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de intercambio iónico acoplada a un sistema de FPLC (Fast protein liquid chromatography) y se cuantificó la cantidad de proteína (Bradford⁵). Las muestras se calentaron (5 min/100 °C) con 2-mercaptoetanol y se corrió una electroforesis desnaturizante Tris-tricina (SDS-PAGE)⁶ y se tiñó con azul de Coomassie para detectar las bandas y peso molecular. La actividad antimicrobiana se determinó por difusión en pozos de agar (0.7 % agar soya tripticasa-CST-inoculado con 1×10^8 cel/mL de *B. cereus* 183), crecido en caldo nutritivo (30 °C/150 rpm), se dejaron solidificar y se perforaron pozos (8 mm de diámetro) para depositar 100 μ L de cada muestra y el control positivo fue yoduro de potasio (KI 3 %). Las cajas se incubaron a 4 °C (*overnight*) y posteriormente se incubaron a 30 °C/24 h. Se determinó la inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de pozos para calcular la actividad antibacteriana (UA).

Resultados y discusión

Las cepas *Bt 13* y *Bt 42* producen cristal esférico (Fig. 1), detectados microscópicamente durante las cinéticas de crecimiento de ambas cepas (Fig. 2).

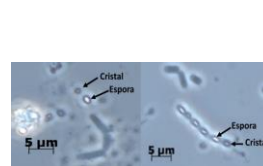


Figura 1. Cristal y espора de las cepas *Bt 13* y *Bt 42* respectivamente.

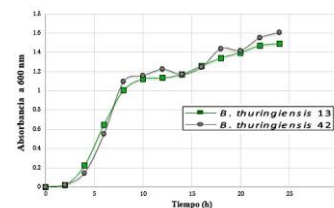


Figura 2. Cinética de crecimiento de *Bt 13* y *Bt 42* en medio CST durante 24 horas a 30°C \pm 2.

Se determinó en las muestras 0.421, 0.2476 de proteínas en *Bt 13* y *Bt 42*, y 0.0120 mg mL⁻¹ de Lipasa 13 en *CF13*. La actividad inhibitoria (Fig. 3) contra la cepa *Bacillus cereus* 183 (tabla 1).

Tabla 1. Actividad antimicrobiana

Muestras	Promedio de diámetro (mm)	Area de inhibición (UA)
Control	16.40	150.7 \pm 0.36
<i>Bt 13</i>	16.45	151.3 \pm 0.59
<i>Bt 42</i>	27.20	530.8 \pm 0.19
Lipasa13	26.25	490.9 \pm 0.62

*1 Unidad arbitraria (UA) = 1mm



Figura 3. Actividad antimicrobiana. A, *Bt 13*; B, Control +; C, Lipasa 13; D, *Bt 42*; E, Control -.

Las muestras pasaron por el proceso de purificación y posteriormente se corrió un gel SDS-PAGE para verificar las bandas y las fracciones de la cromatografía (Fig.4).

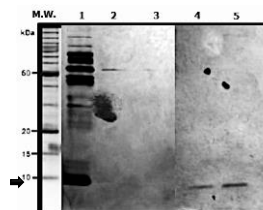


Figura 4. Electroforesis SDS-PAGE (16%). M.W.: Marcador de peso molecular; 1) extracto total (antes de pasar por la purificación); 2 y 3) bandas en la parte superior alrededor de los 50 kDa; 4 y 5) bandas aproximadamente de 10 kDa (bacteriocina).

Conclusiones

Se identificaron los metabolitos secundarios (bacteriocinas y lipasas) de *Bt 13* y *Bt 42*, con actividad antimicrobiana con importancia biotecnológica.

Referencias

1. Lu Y.; Wu K., Jiang Y.; Guo Y.; Desneux N. *Nature* **2012**, 487, 362–365.
2. Whiffen L. K.; Midgley D. J.; McGee P. A. *Soil Biol. Biochem* **2007**, 39, 691–694.
3. Du Toit E. A.; Rautenbach M. J. *Microbiol. Methods* **2000**, 42, 159–165.
4. Hassan M.; Javadzadeh Y.; Lotfipour F.; Badomchi R. *Adv. Pharm. Bull* **2011**, 1, 75–79.
5. Bradford, M. M. *Anal Biochem* **1976**, 72, 248-254.
6. Pacheco-Cano R. D.; Fuente-Salcido N. M.; Salcedo-Hernández R.; Barboza-Corona J.E. *Microbiol Res* **2014**, 169, 948-953.