

# **AISLAMIENTO DE METABOLITOS PRODUCIDOS POR LA CEPA INIFAT-101 DE *BACILLUS SUBTILIS*, PARA EL BIOCONTROL DE MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS**

**Liuba Plana Pérez<sup>1</sup>, José País Chanfrau<sup>2</sup>, Yanet Terrero Socorro<sup>2</sup>, Grisel Tejeda González<sup>1</sup>, Janet Rodríguez Sánchez<sup>1</sup>, Wilder Rodríguez<sup>1</sup>, Nilda Morales González<sup>1</sup> y Grisel Croche<sup>1</sup>.**

*<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt”.*

*<sup>2</sup>Bloque de Desarrollo Biotecnológico, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB*

## **RESUMEN**

En el presente trabajo se logra aislar mediante Cromatografía de Interacciones Hidrofóbicas un metabolito a partir de la Cepa INIFAT-101 de *Bacillus subtilis*, crecida en medio enriquecido con sacarosa, en cultivo estático y con comprobada actividad biológica bactericida y fungicida, el cual se analizó y cuantificó por electroforesis SDS-PAGE, HPLC-RP, realizándole un estudio de actividad biológica frente a *Xanthomona vesicatoria*, *Alternaria porri* y *Alternaria solani*.

## **ABSTRACT**

The present work describe the isolation and partial purification of a metabolite from a wild strain *Bacillus subtilis* INIFAT-101 by Chromatography of Hydrophobic Interactions, grown in culture medium rich in saccharose in static cultivation and with proved biological activity germicide and fungicide. The metabolite was analyzed and quantified by SDS-PAGE electrophoresis, HPLC-RP, carried out to study the biological activity against *Xanthomona vesicatoria*, *Alternaria porri* and *Alternaria solani*.

## **INTRODUCCIÓN**

El uso de microorganismos productores de sustancias fisiológicamente activas comienza a ser en nuestros días una alternativa eficaz en el control de patógenos de plantas, pues los pesticidas químicos usados convencionalmente han quedado en desventaja como consecuencia de los serios problemas ambientales que han ocasionado y el daño que representan para la salud del hombre.

Existen gran cantidad de formulaciones a partir de cultivos bacterianos y fúngicos que son aplicadas por el mundo para el biocontrol con resultados positivos (Ratnadass *et al.*, 2006). Las bacterias están presentes en el suelo en una concentración media de  $10^3$ - $10^4$  UFC/g de suelo y son los microorganismos vivientes más frecuentes en las muestras de suelo, cifrándose su peso en 10.000 kg/ha (Kilian *et al.*, 2002). Las concentraciones bacterianas pueden oscilar incluso en un factor de 50, en función de los factores medioambientales bióticos y abióticos (Ratnadass *et al.*, 2006). Las especies de *Bacillus* son las que se aíslan con mayor frecuencia de las muestras de suelo, en su mayoría productoras de antibióticos. En la bibliografía técnica se describen múltiples mecanismos potenciales de acción que, después de una aplicación de *B. subtilis*, pueden contribuir a incrementar los rendimientos de las cosechas, por la reducción de la incidencia de microorganismos fitopatógenos (Tejeda *et al.*, 1997).

El objetivo del presente trabajo consiste en aislar y purificar los metabolitos producidos por la cepa INIFAT-101 de *B. subtilis* y estudiar la potencialidad biológica de dichos metabolitos aislados.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Fermentación**

Se utilizó la cepa INIFAT-101 de *B. subtilis* crecida en medio M-2 (Tejeda *et al.*, 1997).

Se utilizó un fermentador de 6L B.E. Marubishi (Tokio, Japón) de 5 L de volumen efectivo con control automático de temperatura (37°C), pH (7.0), agitación (200 r.p.m.) y flujo de aire (1 v.v.m.).

### **Determinación de las proteínas totales y análisis de electroforesis.**

Se partió de un crudo de fermentación de 5 L de una muestra de *B. subtilis*, el cual se clarificó mediante un pase de centrifugación a una velocidad de 10,000 r.p.m. durante 30 min. a 4 °C en una centrífuga Hitachi SCR78 tipo Himac (Tokio, Japón).

Se tomó 1.5 mL de sobrenadante para aplicar a un gel de 15 % de poliacrilamida de electroforesis (SDS-PAGE), al cuál se le realizó previamente la técnica de COMASSIE para determinar la concentración de proteínas totales; luego se precipitó con TFA (Ácido Trifluoroacético) y se lavó con acetona a -20 °C, aplicándose en los pocillos 15 y 20 µg respectivamente. Se aplicaron 5 proteínas patrones (A, B, C, D y E): A: Albúmina bovina 66 kDa, B: Albúmina de huevo 45 kDa, C: Tripsinógeno 24 kDa, D: µ- Lactoglobulina 18.4 kDa, E: Lisosima 14.3 kDa.

Los reactivos utilizados fueron todos de calidad purísima.

### **Aislamiento y purificación de metabolitos.**

La muestra inicial se equilibró con metanol, agitándose lentamente durante 30 min. en la cámara a 4 °C, se centrifugó en dos frascos de 300 mL a 10, 000 r.p.m. durante 30 min. y se aplicó a una columna XK16, con un volumen de gel empacado de 20 mL, utilizando una bomba peristáltica LKB Pharmacia (Upssala, Suecia), a un flujo de 9-10 mL/min., previamente equilibrada con tampón de equilibrio (50 % metanol + 50 mM tampón fosfato a pH 5.0) y con un valor de conductividad de 0.62 mS/cm.

El absorbente utilizado fue la resina de hidrofobicidad, usada en cromatografía líquida, LiChroprep RP -18 (Merck, Darmstadt, Alemania), tamaño de partícula 5-20 µm.

Se eluyó con 20 mL de metanol 100 % (Bernal *et al.*, 2002) y los picos de la elusión fueron cuantificados mediante RP-HPLC (Azevedo *et al.*, 1993; Razafindralambo *et al.*, 1993; Eshita *et al.*, 1995; Kajimura *et al.*, 1995) utilizando una columna analítica C18 208TP54 VYDAC (Hesperia, CA, USA), con dimensiones de Ø4 x 250 mm.

El sistema tampón utilizado en RP-HPLC, consistió en 1 % (v/v) TFA para solución A y CH<sub>3</sub>CN + 0.5 % de TFA, para solución B. Se corrió un gradiente lineal desde 10 hasta 60 % B, durante 30 min. y se regeneró con 100 % B durante 10 min., posteriormente se equilibró con 10 % B, a un flujo constante de 0.22 mL/min. La temperatura se fijó a 45 °C y la detección UV se realizó a 226 nm. Las señales UV se registraron mediante el *software* BioCROM (CIGB, Habana, Cuba).

## Actividad Biológica

El *test* de actividad biológica se divide en dos grupos: el de actividad bactericida, que se realiza in vitro frente a *Xanthomonas vesicatoria* (López *et al.*, 1995), utilizando el método de Inhibición Zonal en placas (Martínez *et al.*, 2007) y el de actividad fungicida in vitro frente a *Alternaria porri* y *Alternaria solani* (Castellanos *et al.*, 1995), microorganismos estos que afectan con gran incidencia los cultivos establecidos sobre suelos tropicales, como los de Cuba (Ver tablas I y II). En este último ensayo se utilizaron placas Petri con medio CZAPEK (Herrera.1985), a las que se le añadió 5 mL de la muestra de interés en el agar fresco. Después de gelificarse se colocó en su centro un disco de 5 mm del hongo fitopatógeno. Las placas se incubaron a 28°C durante 7 días, y luego se realizaron las mediciones del crecimiento micelial del hongo, calculando así el nivel de actividad.

**Tabla I.** Especie bacteriana utilizada en el ensayo y el hospedante más común en el que se puede encontrar de manera natural.

Bacteria Fitopatógena	Hospedante	Nombre Común
<i>X. vesicatoria</i>	<i>Licopersicum esculentum Mill.</i>	Tomate

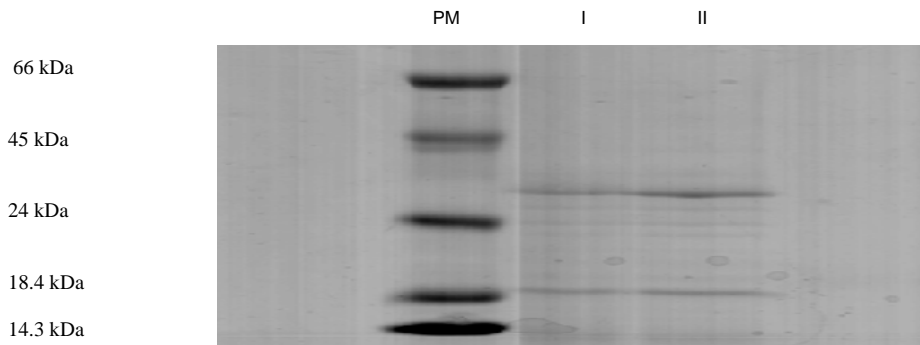
**Tabla II.** Especies fúngicas empleadas en el ensayo y los hospedantes más comunes en los que se pueden encontrar de manera natural.

Hongos Fitopatógenos	Hospedante	Nombre Común
<i>A. solani</i>	<i>Licopersicum esculentum Mill.</i>	Tomate
	<i>Solanum tuberosum L.</i>	Papa
<i>A. porri</i>	<i>Allium sativum L.</i>	Ajo
	<i>Allium cepa L.</i>	Cebolla

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Determinación de las proteínas totales y análisis de electroforesis.

La concentración de proteínas totales, determinada por la técnica de COMASSIE, dio un valor de 0.064 mg/mL, y en la electroforesis SDS-PAGE (fig.1) se evidenció la presencia de 2 bandas proteicas de 30 y 19 kDa aproximadamente para ambos casos; con la aplicación por carril de 15 y 20 µg.



**Figura 1.** Electroforesis SDS-PAGE (15 % de poliacrilamida). I. Carril donde se aplicaron 15 µg de proteína. II. Carril donde se aplicaron 20 µg de proteína. PM: Peso molecular de las proteínas patrones.

### Aislamiento y purificación de metabolitos

Se aplicaron 500 mL de la muestra ya equilibrada y centrifugada a la columna, con pH 6.5 y 0.62 mS/cm de conductividad, donde se realizaron los siguientes pasos de purificación:

- Equilibrar la columna con 50 mL de tampón de equilibrio (50 % metanol + 50 mM tampón Fosfato a pH 5.0, ajustado con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>).
- Aplicar los 500 mL de muestra.
- Lavar con 40 mL de tampón de equilibrio.
- Eluir con 20 mL de metanol 100 %.
- Lavar con 20 mL de metanol 100 %.
- Lavar con 60 mL de H<sub>2</sub>O.
- Lavar con 40 mL de etanol 20 %.
- Regenerar la columna con 50 mL de Isopropanol.

Durante ésta corrida cromatográfica se tomaron muestras del volumen no retenido, lavado inicial, elusión y lavados finales.

El volumen aproximado de elusión fue de 20 mL, del cuál se tomó 1 mL para inyectar en el equipo de RP-HPLC a una columna C18, utilizando un gradiente de 10-60 % de tampón B, durante 30 min. y un flujo de 0.22 mL / min.

Se obtuvo mediante el Software BioCROM, versión 2.3, 1994 (CIGB, Habana, Cuba), el cromatograma BSEME01 que se muestra en la Figura 2; en el cual aparecen 5 picos, de ellos el más representativo el número 4, con un tiempo de retención (tr) de 27 min. y un área de 212.80. Esta fracción se colectó y se le realizó el *test* de actividad biológica frente a *X. vesicatoria*, *A. porri* y *A. solani*.

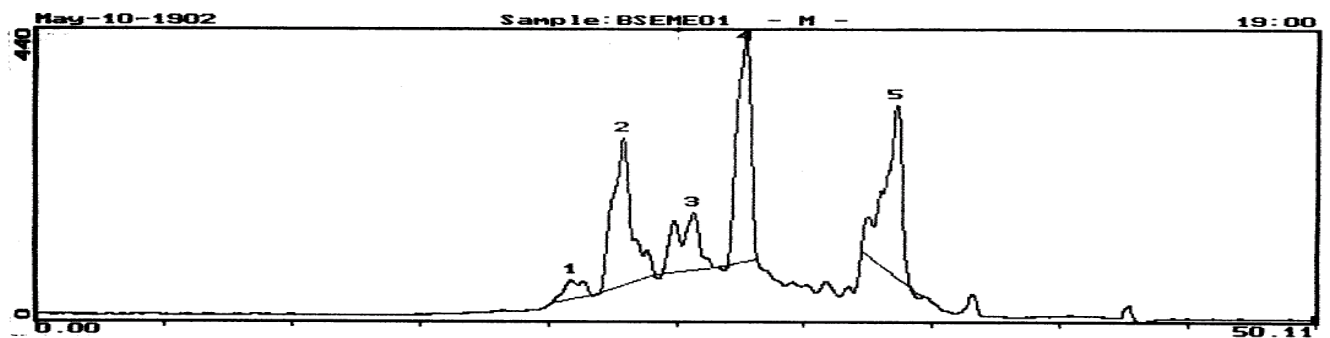


Figura 2. Cromatograma BSEME01, correspondiente a la muestra de la elusión.

## Actividad Biológica

Al evaluar la actividad bactericida del metabolito aislado, el crecimiento de *X. vesicatoria* fue inhibido, con un halo de 17.67 mm de inhibición y el porcentaje de control para *A. solani* y *A. porri* fue de 84.9 % y 76.3 % respectivamente.

## CONCLUSIONES

- El empleo de la Cromatografía de Interacciones Hidrofóbicas y la técnica de RP-HPLC, permite el aislamiento y purificación de metabolitos presentes en el sobrenadante de fermentación de la cepa INIFAT-101 de *B. subtilis*.
- El metanol al 100 %, resulta ser un tampón eficaz para la elusión, según el protocolo de purificación establecido durante el proceso.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Azevedo, E.C.; Ríos, E. M.; Fukushima, K. and Campos-Takaki, G.M. “Bacitracin production by a new strain of *Bacillus subtilis*. Extraction, purification and characterization”. Applied Biochemistry and Biotechnology. July 1993, vol. 42, No.1, p.1-7.

Badel, J. and Kelemu, S. 1996. “Inhibition in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz y otros hongos fitopatógenos por filtrados de cultivos de *Bacillus subtilis*”. Fitopatología colombiana. 1996, **18**(1): 30-35.

Bernal, G.; Illanes, A.; Ciampi, L. 2002. “Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus sp.* with antibiotic activity against plant pathogenic agents”. Electronic Journal of Biotechnology. 2002, **5**(1): 1-9.

Castellanos, J. J.; Oliva, P. H.; Izquierdo, G. E. y Morales, N. “Sustitución de un fungicida sistémico por *Bacillus subtilis* en el control de la *Alternaria porri* (Ell.) Cif en cebolla”. X Forum de Ciencia y Técnica. INIFAT. MINAGRI. 1995.

Eshita, S.M.; Roberto, N.H.; Beale, J.M.; Mamiya, B. M. and Workman, R.F. “Bacillomycin Lc, a new antibiotic of the iturin group: isolation, structures and antifungal activities of the congeners”. Journal of Antibiotics (Tokyo). Nov.1995, vol.48, No.11, p.1240-1247.

Herrera, A. “Manual de medios de cultivos”. Editorial Científico-Técnica. La Habana, Cuba. 1985, pp.154.

Kajimura, Y.; Sugiyama, M. and Kaneda, M. “Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* FR-2”. Journal of Antibiotics (Tokyo). Oct.1995, vol.48, No.10, p.1095-1103.

Kilian, M.; Steiner, U.; Krebs, B.; Junge, H.; Schmiedeknecht, G.; Hain, R. “FZB24 *Bacillus subtilis*- mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality”. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer. 2002,1/00,1, 72-93.

López, M.; Pérez, M. A.; Martínez, R y Morales, N. “Efecto antagonista de *Bacillus subtilis* sobre diferentes aislamientos de *Xhantomonas ssp*”. VIII Jornada Científica del INIFAT. 1995.

Martínez, R.; López, M.; Brossard, F.; Tejeda, G.; Pereira, H.; Parra, C.; Rodríguez, J.; Alba, A. “Procedimientos para el estudio y fabricación de biofertilizantes bacterianos”. Ediciones INIA Maracay, Venezuela. 2007, serie B, No. 11, 81 pp.

Ratnadass, A.; Michelon, R.; Randriamanantsoa and Seguy, L. “Effects of Soil and Plant Management on Crop Pests and Diseases”. En *Biological Approaches to Sustainable Soil Systems*, Taylor and Francis Ed., 2006, Boca Ratón, pp 589-602.

Razafindralambo, H.; Paquot, M.; Hbid, C.; Jacques, P.; Destan, J. and Thonart, P. “Purification of antifungal lipopeptides by reverse-phases high-performance liquid chromatography”. *Journal of Chromatography*. June 1993, vol.639, No.1, p.81-85.

Tejeda, G. “Obtención de un biopreparado a partir de *Bacillus subtilis* para el control biológico de hongos y bacterias fitopatógenas”. Tesis para optar por el Grado Científico de Master en Ciencias. 1997.