

Nota técnica

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE rep-PCR DE AISLADOS NATIVOS DE *Bacillus thuringiensis*, OBTENIDOS DE MUESTRAS DE SUELO

Fabián Galvis^{1/}*, Laura Yolima Moreno^{**}

Palabras clave: *B. Thuringiensis*, bioinsecticida, rep-PCR, análisis filogenético.

Keywords: *B. thuringiensis*, bioinsecticide, rep-PCR, phylogenetic analysis.

Recibido: 02/05/13

Aceptado: 10/09/13

RESUMEN

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram-positiva formadora de esporas, que produce cristales parasporales de naturaleza proteica, tóxicos contra diferentes órdenes de insectos y biodegradables e inoocuos para otras especies. Esta investigación empleó el modelo experimental, que mediante técnicas de observación permitió, la identificación microbiológica y bioquímica de *B. thuringiensis* a partir de muestras de suelo de los municipios de Cúcuta, El Zulia, Los Patios, San Cayetano y Villa del Rosario, Norte de Santander, Colombia, y su posterior caracterización con los marcadores moleculares Bc-Rep y MB1. Se identificaron microbiológica y bioquímicamente 10 aislados como *B. thuringiensis*; los resultados del análisis filogenético mostraron diferencias significativas en los agrupamientos obtenidos con los marcadores Bc-Rep y MB1. Con Bc-Rep se registró un índice de similaridad bajo (18%), mientras que con el marcador MB1 se obtuvo un índice mayor de similitud, 58%. En este trabajo se evidenció una gran variabilidad genética entre los aislados, que mostraron a los marcadores Bc-Rep y MB1 como altamente efectivos para diferenciar cepas estrechamente

ABSTRACT

Molecular characterization using rep-PCR of native isolates of *Bacillus thuringiensis*, obtained from soil samples. *Bacillus thuringiensis* is a Gram-positive bacteria forming spores, which produces parasporal crystals of a proteic nature, toxic against various orders of insects and biodegradable and harmless to other species. This research use the experimental model, allowing, through observation techniques, microbiological and biochemical identification of *B. thuringiensis* from soil samples from municipalities of Cúcuta, El Zulia, Los Patios, San Cayetano and Villa del Rosario, Norte de Santander, Colombia, and its subsequent characterization with molecular markers Bc-Rep and MB1. Microbiological and biochemical tests identified 10 isolates as *B. thuringiensis*; the results of phylogenetic analysis showed significant differences in the clusters obtained with Bc-Rep and MB1 markers. With Bc-Rep a low index of similarity (18%) was recorded, while with the marker MB1 a higher similarity index, 58%, was obtained. This work indicated a great genetic variability among isolates, showing that markers Bc-Rep and MB1

1 Autor para correspondencia. Correo electrónico: he.galvis@mail.udes.edu.co

* Grupo de Investigación Biogen, Universidad de Santander, Cúcuta, Norte de Santander, Colombia.

** Grupo de Investigación Majumba, Universidad Francisco de Paula Santander, Cúcuta, Norte de Santander, Colombia.

relacionadas, convirtiéndose en una herramienta genética de gran valor para estudios de identificación y diversidad en *B. thuringiensis*.

INTRODUCCIÓN

El empleo de insecticidas químicos ha permitido disminuir de forma rápida y eficiente los problemas causados por insectos que actúan como vectores de enfermedades o como plagas en cultivos agrícolas. Sin embargo el uso irracional y excesivo de químicos genera problemas como la contaminación del ambiente, la pérdida de efectividad de los insecticidas y la reducción de la biodiversidad, entre otros (Bernal 2011).

Bacillus thuringiensis es el insecticida más utilizado para el control de insectos, ya que ha representado aproximadamente el 90% del mercado de biopesticidas, el cual asciende a 600 millones de dólares. *B. thuringiensis* tiene diversas ventajas que se derivan principalmente de su alta especificidad contra los insectos susceptibles, su inocuidad hacia el medio ambiente, la entomofauna benéfica y demás organismos vivos, incluyendo el hombre, además de una incidencia escasa de fenómenos de resistencia (López y Cerón 2010).

B. thuringiensis es una bacteria Gram-positiva formadora de esporas que produce una proteína cristal insecticida, compuesta por delta-endotoxinas que son tóxicas para un alto número de insectos plaga y son biodegradables e inocuas para otras especies (Ramírez et ál. 2010). La resistencia presentada por los insectos y la poca persistencia de los biopreparados en el suelo por su escasa adaptabilidad al medio, sugieren la realización de investigaciones que permitan la identificación de nuevos aislados nativos con mayor toxicidad y mayor permanencia en el campo.

Para la producción de biopreparados se recomienda seguir un control de calidad aplicando

are highly effective to differentiate closely related strains, thus becoming a genetic tool of great value for studies of identification and diversity in *B. thuringiensis*.

los parámetros de identidad, concentración y pureza; la identificación específica del microorganismo permitirá la reproducción de los resultados y evitará la diseminación en el ambiente de patógenos estrictos u oportunistas del hombre y otros organismos. Para la identificación de *B. thuringiensis* se siguen procedimientos simples como la descripción de su morfología celular, coloración Gram, análisis de su capacidad para crecer en condiciones aerobias o anaerobias y requerimientos de sustratos especiales para su cultivo. La serotipificación es la técnica más aceptada para la clasificación de subespecies de *B. thuringiensis*. Estas técnicas permiten una identificación hasta la especie, pero la clasificación de subespecies, serovariedades o cepas, requiere de métodos más específicos, como el uso de marcadores moleculares.

Las técnicas de tipificación basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se fundamentan en la amplificación de secuencias de ADN polimórficas y la separación por electroforesis de los productos de amplificación. Estas técnicas poseen un elevado poder de discriminación, son menos laboriosas, más rápidas y más flexibles que las pruebas tradicionales de identificación. La técnica rep-PCR nos permite caracterizar subespecies, serovariedades y cepas de una forma más simple, rápida y reproducible en una gran variedad de microorganismos, incluido *B. thuringiensis* (Lupski y Weinstock 1992).

Esta investigación consistió en la caracterización molecular mediante rep-PCR de 10 aislados nativos identificados inicialmente con pruebas microbiológicas y bioquímicas, a partir de muestras de suelo de los municipios de Cúcuta, El Zulia, Los Patios, San Cayetano y Villa del Rosario, Norte de Santander, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación. Se tomaron muestras de 200 g de suelo de pastizales y rizosferas de árboles, a una profundidad de 5 a 10 cm, provenientes de los municipios de Cúcuta, El Zulia, Los Patios, San Cayetano y Villa del Rosario, Norte de Santander. De cada muestra se registró in situ, la localización y las características físicas del sitio de muestreo; y ex situ, se determinó el pH y la textura del suelo. Las muestras fueron secadas a temperatura ambiente (24°C) durante un día. Para el aislamiento de *B. thuringiensis* se utilizó el método descrito por Galvis (2013); la determinación macroscópica y microscópica se hizo con la descripción propuesta por Realpe et ál. (2002); y la identificación bioquímica se realizó con el kit BBL CRYSTAL Gram Positivo/GP (Becton Dickinson) y los parámetros presentados por Dworkin et ál. (2006). Como controles positivos para las pruebas bioquímicas y moleculares se utilizaron variedades de *B. thuringiensis* donadas por Corpoica Tibaitata y la Corporación para la Investigaciones Biológicas (CIB): aizawai, darmstadiensis, kenya, tenebrionis, sandiego, israelensis.

Caracterización molecular mediante rep-PCR. El ADN de los aislados y las cepas control se obtuvo por medio del kit Wizard Genomic DNA Purification de Promega. Los marcadores y cebadores utilizados fueron Bc-Rep-1 (5'-ATTAAAGTTTCACTTTAT-3'), Bc-Rep-2 (5'-TTTAATCAGTGGGG-3') (Bartoszewicz et ál. 2013) y M-B1 (5'-TGTACATAAGACGAA-GCCC-3') (Brumlik et ál. 2001). Las muestras de ADN fueron amplificadas en un volumen final de 50 µl con 200 µM de dNTPs, 2U de Taq Polimerasa, 5 mM de MgCl₂, 1 µM de cada oligonucleótido y 2 µl del ADN aislado. Los ciclos de amplificación usados para la rep-PCR fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguidos de 32 ciclos de 94°C por 1 min, 42°C por 1 min, y 72°C por 1 min y 30 s; y una extensión final de 72°C por 7 min. Los perfiles de bandas se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,4% por 3 h a 50 V, y teñidos con bromuro de

etidio. Los perfiles de ADN fueron analizados con el software estadístico NTSYS 2.0.

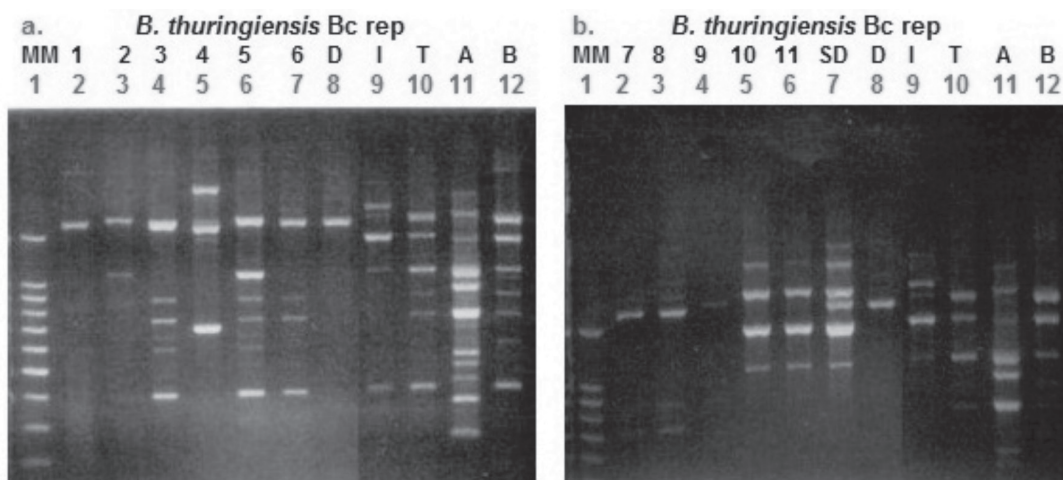
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación. Se recolectaron 45 muestras de suelo de los municipios de Cúcuta, El Zulia, Los Patios, San Cayetano y Villa del Rosario, Norte de Santander. Los suelos muestreados fueron de textura predominante arcillosos-arenosos y con un rango de pH entre 4,5 y 9,7. Se seleccionaron 10 aislados por presentar las siguientes características: 1. Morfología predominante para *B. thuringiensis* (colonia mediana a grande, plana de borde irregular lobulado y/o arborescente, consistencia blanda, aspecto opaco/mate, pigmentación blanco cremoso) 2. Bacilos Gram positivos. 3. Esporas cilíndricas u ovoides no deformante del cuerpo del bacilo en posición terminal o subterminal. 4. Y por presentar cristal.

Los 10 aislados se identificaron como *B. cereus* con BBL CRYSTAL, y debido a que *B. cereus* y *B. thuringiensis* son bioquímicamente idénticos, diferenciándose únicamente por la producción del cristal parasporal, se confirma que estos aislados pertenecen a esta especie. En la caracterización bioquímica a nivel de variedad de *B. thuringiensis*, los aislados BtNS2, BtNS4, BtNS6, BtNS7, BtNS9 y BtNS10 poseen un 100% de similitud bioquímica con *B. thuringiensis* var. Kurstaki; el aislado BtNS8 mostró relación con *B. Thuringiensis*, var. Israelensis; y los aislados BtNS1 y BtNS3 no presentan relación con las variedades comparadas.

Caracterización molecular. Las ampliificaciones con el marcador Bc-Rep mostraron patrones con pocas bandas que variaron en número de 1 a 5, con un tamaño aproximado entre 4000 y 400 pb. (Figura 1). Las bandas ubicadas a 1700 y 1100 pb presentan mayor similitud entre los aislados, pero están ausentes en algunos de ellos, por esta razón también se consideran polimórficas.

Los patrones observados en la amplificación con el marcador MB1 presentaron mayor cantidad de bandas que los obtenidos con los

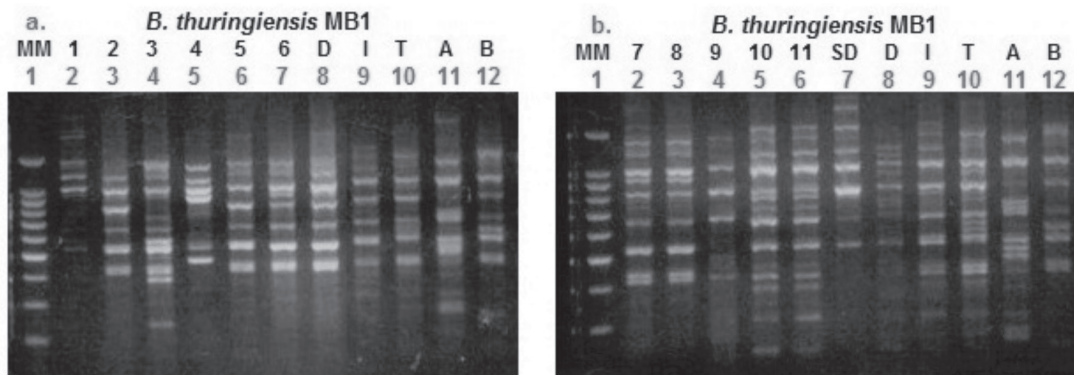


a. Línea 1. Marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder; líneas 2 a 7 aislados nativos BtNS1 a BtNS6 respectivamente; líneas 8 a 12: controles *B. thuringiensis* var. Darmstadiensis, *B. thuringiensis* var. Israelensis, *B. thuringiensis* var. Tenebrionies, *B. thuringiensis* var. Azawai y *B. thuringiensis* var. Berliner, respectivamente. **b.** Línea 1. Marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder; líneas 2 a 6, aislados nativos BtNS7 a BtNS11 respectivamente; líneas 7 a 12: controles *B. thuringiensis* var. San diego *B. thuringiensis* var. Darmstadiensis, *B. thuringiensis* var. Israelensis, *B. thuringiensis* var. Tenebrionies, *B. thuringiensis* var. Aizawai y *B. thuringiensis* var. Berliner, respectivamente.

Fig. 1. rep-PCR de *B. thuringiensis* con el marcador Bc-Rep.

cebadores Bc-Rep. El número de bandas amplificadas en los diferentes aislados y controles varió entre 4 y 12 y con un tamaño aproximado

de 2500 a 150 pb. (Figura 2). Todos los aislados, menos BtNS1 y BtNS2, comparten una banda de 1400 pb, que también está presente en los



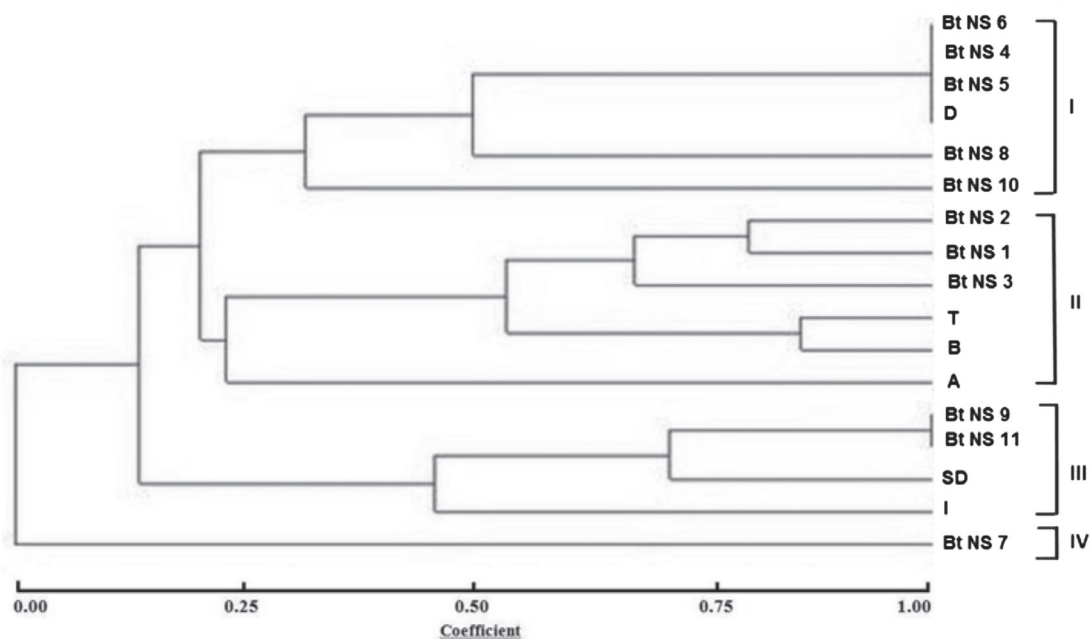
a. Línea 1. Marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder; líneas 2 a 7 aislados nativos BtNS1 a BtNS6 respectivamente; líneas 8 a 12: controles *B. thuringiensis* var. Darmstadiensis, *B. thuringiensis* var. Israelensis, *B. thuringiensis* var. Tenebrionies, *B. thuringiensis* var. Aizawai y *B. thuringiensis* var. Berliner, respectivamente. **b.** Línea 1. Marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder; líneas 2 a 6, aislados nativos BtNS7 a BtNS11 respectivamente; líneas 7 a 12: controles *B. thuringiensis* var. San diego *B. thuringiensis* var. Darmstadiensis, *B. thuringiensis* var. Israelensis, *B. thuringiensis* var. Tenebrionies, *B. thuringiensis* var. Aizawai y *B. thuringiensis* var. Berliner, respectivamente.

Fig. 2. rep-PCR de *B. thuringiensis* con el marcador MB1.

controles *B. thuringiensis* var. Tenebrionis, *B. Thuringiensis* var. Berliner, *B. Thuringiensis* var. San diego y *B. Thuringiensis* var. Israelensis. Las bandas de 1000 y 500 pb están presentes en todos los aislados menos en el BtNS1.

Análisis filogenético. El análisis con el marcador Bc-Rep generó 4 *clusters*, donde los *clusters* I, II y III se agrupan con una similitud de 18%. El aislado BtNS7 no tiene ninguna similitud con todos los demás aislados y controles. En el *cluster* I los aislados BtNS4, BtNS5, BtNS6 y el

control *B. thuringiensis* var. Darmstadiensis comparten un 100% de similitud. En el *cluster* II los aislados BtNS1 y BtNS2 tienen una similitud de 80%. Los controles *B. thuringiensis* var. Tenebrionis y *B. thuringiensis* var. Berliner presentan un 86% de similitud; y un 54% de similitud con los aislados BtNS1, BtNS2 y BtNS3. El *cluster* III agrupa los aislados BtNS9 y BtNS11 con una similitud del 100%, y estos 2 comparten un 73% de similitud con el control *B. thuringiensis* var. San diego (Figura 3).



Se generan 4 *clusters*, agrupando todos los controles y aislados menos el BtNS7, observándose un coeficiente de similitud de 18%. SD: *B. thuringiensis* var. San diego, D: *B. thuringiensis* var. Darmstadiensis, I: *B. thuringiensis* var. Israelensis, T: *B. thuringiensis* var. Tenebrionis, A: *B. thuringiensis* var. Aizawai, B: *B. thuringiensis* var. Berliner.

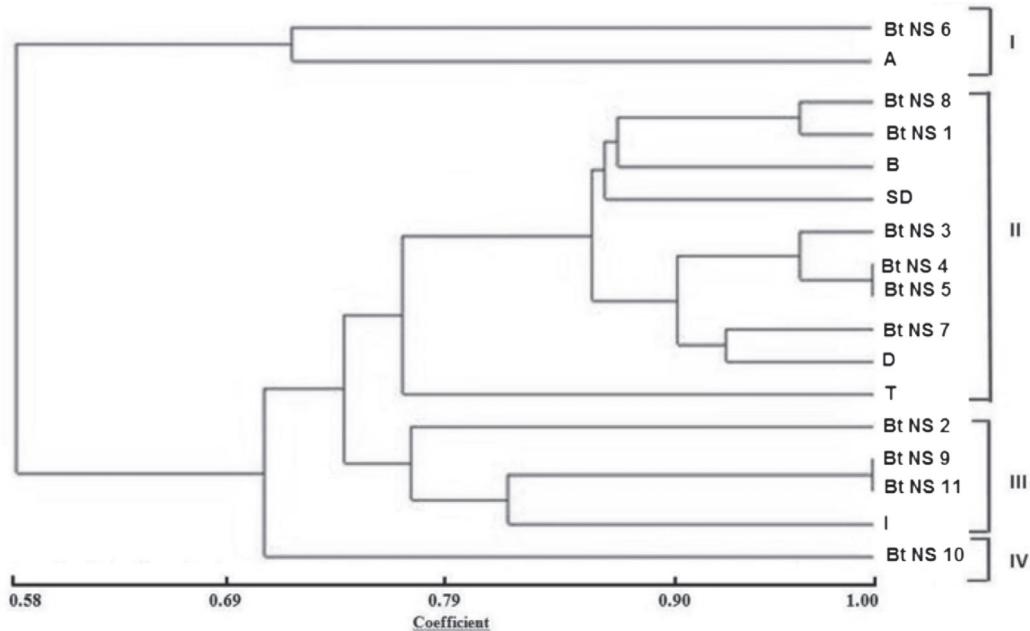
Fig. 3. Árbol filogenético con el uso de los cebadores Bc-Rep.

El análisis filogenético para los aislados nativos y controles con el marcador MBI generó 4 *clusters*. Todos los aislados presentan una similitud de 58%. En el *cluster* I el aislado BtNS6 y el control *B. thuringiensis* var. Aizawai comparten un 72% de similitud. En el *cluster*

II se agrupan 10 muestras con un coeficiente de similitud del 77%. Los aislados BtNS1 y BtNS8 comparten una similitud de 97% entre sí, y un 89 y 87% con los controles *B. thuringiensis* var. Berliner y *B. thuringiensis* var. San diego, respectivamente. Los aislados BtNS4 y BtNS5

tienen un 100% de similitud, y los 2 comparten un 94% con el aislado BtNS3. En el *cluster* III los aislados BtNS9 y BtNS11 comparten 100% de similitud; y estos 2 con *B. thuringiensis* var.

Israelensis tienen un 82% de similaridad. En el *cluster* IV solo se encuentra el aislado BtNS10 que comparte un 71% de similitud con los *clusters* II y III. (Figura 4).



Se generan 4 *clusters*, agrupando todos los controles y aislados, observándose un coeficiente de similitud de 58%. SD: *B. thuringiensis* var. San diego, D: *B. thuringiensis* var. Darmstadiensis, I: *B. thuringiensis* var. Israelensis, T: *B. thuringiensis* var. Tenebrionies, A: *B. thuringiensis* var. Aizawai, B: *B. thuringiensis* var. Berliner.

Fig. 4. Árbol filogenético con el uso de el cebador MBI.

La rep-PCR es una técnica útil para estudios de variabilidad genética en aislados de *B. thuringiensis* provenientes de diversas fuentes, que ofrecen múltiples ventajas como la universalidad de los cebadores, reproducibilidad relativa de los resultados, y sencillez en su procedimiento y equipos requeridos (Katara et ál. 2012).

En este trabajo la rep-PCR mostró claramente distintos patrones de amplificación para todas las cepas, con pocas bandas comunes entre algunos aislados y controles. El análisis filogenético con Bc-Rep mostró un índice de similaridad

bajo (18%), debido posiblemente a la alta variabilidad genética dentro de este grupo, detectada por este marcador, de allí su posibilidad de adaptarse a diferentes ambientes y presentar efectos tóxicos hacia varios ordenes de insectos. Lo anterior también ha sido reportado por diversos autores, al observar un alto grado de polimorfismos entre diferentes aislados de *B. thuringiensis* inclusive, provenientes de un mismo sitio (Katara et ál. 2012). En un estudio realizado por Reyes e Ibarra (2005), donde caracterizaron diferentes variedades de *B. thuringiensis* mediante rep-PCR con

el marcador Bc-Rep, obtuvieron una similitud de 12% entre las variedades *israelensis* y *aizawai* de *B. thuringiensis*. Este porcentaje de similitud es semejante al obtenido en este trabajo, 18%, a partir de los mismos cebadores y entre las mismas variedades de *B. thuringiensis*.

El marcador MB1 permitió mayor confiabilidad en el agrupamiento de los aislados, y generó una similitud del 58%. Brumlik et ál. (2004) también utilizaron MB1 para caracterizar diferentes especies del grupo de *B. cereus* (*B. cereus*, *B. anthracis* y *B. thuringiensis*) y obtuvieron un coeficiente de similitud entre todos los aislados del 30%. En este trabajo el porcentaje de similitud con MB1 fue mayor, 58%, debido a que solo fueron caracterizados aislados de *B. thuringiensis*, identificados bioquímicamente.

Finalmente este trabajo mostró que la mayoría de los aislados presentaron diferentes patrones de bandas a pesar de haber sido aislados en la misma región, lo que demuestra la gran variabilidad genética de *B. thuringiensis* y el alto poder de discriminación que poseen los marcadores Bc-Rep y MB1, que permiten establecer diferencias a nivel interespecífico. A pesar de esta variabilidad genética, presentada entre los aislados de *B. thuringiensis*, se observó que tanto el marcador Bc-Rep como MB1, permitieron el agrupamiento de los aislados BtNS4 y BtNS5 con el control *B. thuringiensis* var. Darmstadiensis. Estos aislados podrían ser analizados mediante bioensayos o caracterización de genes *cry* y *cyt*, para probar su potencial como bioinsecticidas contra dípteros.

LITERATURA CITADA

- BARTOSZEWICZ M., KROTEN M., SWIECICKA I. 2013. Germination and proliferation of emetic *Bacillus cereus* sensu lato strains in milk. *Folia Microbiológica*. Springer Netherlands 58(6):529-535.
- BERNAL E. 2011. Comparación socioeconómica de las empresas agrarias de producción ecológica y convencional en Aragón, España: Problemas y oportunidades. *Mundo Agr.* 11(2):1-28.
- BRUMLIK M.J., BIELAWSKA A., ZAKOWSKA D., LIANG X., SPALLETTA R.A., PATRA G., DELVECCHIO V.G. 2004. Genetic diversity among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains using repetitive element polymorphism-PCR. *Polish Journal of Microbiology* 53(4):215-225.
- BRUMLIK M.J., SZYMAJDA U., ZAKOWSKA D., LIANG X., REDKAR R.J., PATRA G., DEL VECCHIO V.G. 2001. Use of long-range repetitive element polymorphism-PCR to differentiate *Bacillus anthracis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3021-3028.
- DWORKIN M., FALKOW S., ROSENBERG E., SCHLEIFER K.H., STACKEBRANDT E. 2006. The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria (Third Edition). Springer. Chapt. 16. 4:530-563.
- GALVIS F. 2013. Caracterización molecular de genes *cry1*, *cry2*, *cry3* y *cry4* en aislados de *Bacillus thuringiensis* y determinación de su actividad bioinsecticida en larvas de *Aedes aegypti*. *Interciencia* 38(02):128-131.
- KATARA J., DESHMUKH R., SINGH N., KAUR S. 2012. Molecular typing of native *Bacillus thuringiensis* isolates from diverse habitats in India using REP-PCR and ERIC-PCR analysis. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 58:83-94.
- LÓPEZ S., CERÓN J. 2010. Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* y su interacción con coleópteros. *NOVA* 8(14):183-194.
- RAMÍREZ L., RAMÍREZ N., FUENTES L.S., JIMÉNEZ J., HERNÁNDEZ J. 2010. Estandarización de un bioensayo y evaluación preliminar de tres formulaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis* sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 12(1):12-21.
- REALPE M., HERNÁNDEZ C., AGUDELO C. 2002. Especies del género *Bacillus*. Morfología macroscópica y microscópica. *Biomédica* 22:106-109.
- REYES A., IBARRA J.E. 2005. Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* type strains and isolates by using *Bacillus cereus* Group-Specific Repetitive Extragenic Palindromic Sequence-Based PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1346-1355.



Todos los derechos reservados. Universidad de Costa Rica. Este artículo se encuentra licenciado con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr