

Caracterización fisiológica y genética de cepas nativas de *Bacillus sphaericus*

Physiologic and genetic characterization of *Bacillus sphaericus* native strains

Jenny Dussán Garzón, Diana Rocío Andrade Linares,
Lucía Cristina Lozano Ardila, Sandra del Pilar Vanegas Moyano*.

RESUMEN

Se aislaron 18 cepas nativas de *Bacillus sphaericus* patógenas a larvas de mosquitos de diferentes regiones de Colombia. El objetivo de este estudio fue evaluar a nivel fisiológico y molecular cepas patógenas y compararlas con la de referencia 2362. Se evaluó el crecimiento celular, el porcentaje de esporulación, la patogenicidad en larvas de tercer instar de *Culex quinquefasciatus*, la presencia de las proteínas toxigénicas, el tamaño de plásmidos nativos y el polimorfismo genético entre aislamientos patógenos y no patógenos. Las cepas de Bs evaluadas presentaron una etapa de latencia de 2-3 h y una fase logarítmica de 7 h; la esporulación en BHI fue menor del 1% a las 40 h de incubación; en el medio NYSM se obtuvo diez veces más producción de biomasa y de esporas; el 26% de la población mostró porcentajes de esporulación superiores al 90%; los aislamientos clasificaron en tres grupos de patogenicidad con LD₅₀ de $\geq 10^5$ UFC/ml, 10^3 - 10^4 UFC/ml y $\leq 10^3$ UFC/ml. Se detectaron mutaciones puntuales en los genes que codifican para las toxinas nativas, y se halló una proteína de 30 kDa exclusiva de las cepas nativas patógenas. Los aislamientos de Bs presentaron un plásmido de 118 Kb, no relacionado con la toxicidad; las cepas patógenas son un grupo homogéneo con una similitud entre el 90-100%, mientras que las no patógenas son genéticamente heterogéneas y conforman un cluster aparte. Las cepas nativas tienen un gran potencial en control biológico de larvas de mosquitos transmisores de enfermedades, tales como dengue, malaria, encefalitis y filariasis, entre otras.

Palabras clave: ADN, control biológico, actividad larvicida, *Culex quinquefasciatus*, toxinas binarias.

ABSTRACT

Eighteen pathogenic native strains of *Bacillus sphaericus* that were pathogens to mosquito larvae were isolated from different Colombia regions. The objective of this study was to evaluate at physiological and molecular level pathogenic strains and to compare them with the reference 2362 one. Cellular growth, sporulation percentage, pathogenic activity against third instar larvae of *Culex quinquefasciatus*, the presence of toxigenic proteins, the size of native plasmids and the genetic polymorphism among pathogenic and non pathogenic isolations was evaluated. The evaluated strains of Bs presented a latency stage ranging from 2 to 3 h and one logarithmic phase of 7 h; the sporulation in BHI was lower than 1% to 40 h of incubation, in NYSM medium was obtained ten times more production of biomass and spores, 26% of the population showed sporulation percentage higher than 90%; the isolations were classified in three groups of pathogenicity with LD₅₀ of $\geq 10^5$ UFC/ml, 10^3 - 10^4 UFC/ml and $\leq 10^3$ UFC/ml. Punctual mutations on the genes which encoding for native toxins were detected and was found a exclusive protein of 30 kDa in pathogenic native strains. The isolations of Bs presented a plasmid of 118 Kb that was not related to the toxicity; pathogenic strains are a homogenous group with a similarity between 90 to 100%, whereas non-pathogenic ones are genetically heterogeneous group and conform a cluster aside. The native strains have a great potential in biological control of mosquito larvae that transmitting diseases such as dengue, malaria, encephalitis and filariasis among others.

Key words: DNA, biological control, larvicidal activity, *Culex quinquefasciatus*, binary toxins.

* Centro de Investigaciones Microbiológicas - CIMIC, Edificio J 303, Universidad de los Andes, Cra. 1E No. 18A-10, Bogotá, D.C. Tel/Fax: 57-1-3324368. jdussan@uniandes.edu.co

INTRODUCCIÓN

B. sphaericus (Bs) es una bacteria saprofita Gram (+), aerobia, con espora circular, terminal, la cual está ampliamente distribuida en el suelo y en medios ambientes acuáticos. Puede ser toxigénica a larvas de algunas especies de mosquitos transmisores de enfermedades tales como *Culex sp.*, *Anopheles sp.*, *Aedes sp.*, y *Psorophora sp.*; las cepas patogénicas de alta toxicidad presentan una dosis letal cincuenta (LD₅₀) de 10-100 UFC/ml y producen inclusiones o cristales paraesporales, las cuales constan de dos proteínas, una de 51,4 (51 kDa) y otra de 41,9 kDa (42 kDa), que forman un heterodímero (Davison *et al.*, 1981). El procesamiento de estas proteínas, por el pH alcalino del intestino de las larvas, origina dos productos activos, uno de 43 kDa, y otro de 39 kDa, respectivamente, los cuales actúan conjuntamente en la toxicidad hacia el mosquito. Bioensayos en laboratorio y a nivel piloto muestran efectividad al producir alta mortalidad a las 24 horas post-inoculación en *Culex sp.* y *Anopheles sp.* En campo se ha observado un reciclaje natural en la superficie del agua donde los cadáveres de larvas contribuyen al mantenimiento de los niveles de toxicidad hasta por 26 días. A partir de un proyecto inicial realizado en el Cimic y financiado por Colciencias (Dussán *et al.*, 1995), se aislaron 269 bacilos esporoformadores de diferentes regiones de Colombia (Llanos Orientales, costa Atlántica, costa Pacífica, zona cafetera y sabana de Bogotá); se evaluó la toxicidad de las cepas en larvas de tercer instar de *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles albimanus* y *Aedes aegypti*, y se identificaron a nivel bioquímico (Sneath *et al.*, 1994). De estas cepas nativas, 18 presentaron patogenicidad del 80-100% en larvas de tercer instar de *C. Quinquefasciatus*. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar a nivel fisiológico y molecular estas cepas nativas con el fin de determinar su potencial en la aplicación para el control biológico de vectores de enfermedades tropicales e iniciar la fase de caracterización de toxinas nativas.

METODOLOGÍA

Cepas. En la tabla 1 se muestran los aislamientos trabajados en este estudio.

Tabla 1. Cepas nativas y de referencia utilizadas en este estudio.

Cepa	Proyecto Cimic-Colciencias	Sitio de aislamiento	Identificación (1)
SB 2.15	X	Sabana de Bogotá	<i>B sphaericus</i>
CH2.17	X	Chocó	<i>B sphaericus</i>
SB2.94	X	Sabana de Bogotá	<i>B sphaericus</i>
OT4b.2	X	Otros lugares	<i>B sphaericus</i>
OT4b.20	X	Otros lugares	<i>B sphaericus</i>
OT4b.25	X	Otros lugares	<i>B sphaericus</i>
OT4b.26	X	Otros lugares	<i>B sphaericus</i>
OT4b.28	X	Otros lugares	<i>B sphaericus</i>
OT4b.30	X	Otros lugares	<i>B sphaericus</i>
OT4b.31*	X	Otros lugares	<i>B sphaericus</i>
OT4b.32	X	Otros lugares	<i>B sphaericus</i>
OT4b.34	X	Otros lugares	<i>B sphaericus</i>
OT4b.35	X	Otros lugares	<i>B sphaericus</i>
OT4b.39	X	Otros lugares	<i>B sphaericus</i>
OT4b.48*	X	Otros lugares	<i>B sphaericus</i>
OT4b.49	X	Otros lugares	<i>B sphaericus</i>
OT4b.51	X	Otros lugares	<i>B sphaericus</i>
OT4b.56	X	Otros lugares	<i>B sphaericus</i>
OT4b.58	X	Otros lugares	<i>B sphaericus</i>
SB 2.124		Sabana de Bogotá	<i>B sphaericus</i>
CU 2.1		Cumaral	<i>B. apiarius</i>
CU 2.2		Cumaral	<i>B. pulvifaciens</i>
<i>B. sphaericus</i> (Bs)2362	Cepa de referencia	Nigeria para actividad larvicida	
HD2	Cepa de referencia	<i>Bacillus thuringiensis</i> . Instituto Pasteur, Francia; para determinación del peso molecular de plásmidos	
<i>P. putida</i> PWWO	Cepa de referencia	Colección del Centro de Investigaciones Microbiológicas-Cimic, para determinación del peso molecular de plásmido	
<i>P. putida</i> OUS82	Cepa de referencia	Colección del Centro de Investigaciones Microbiológicas-Cimic, para determinación del peso molecular de plásmido	
<i>E. coli</i> DH5 α	Cepa hospedera	Colección del Centro de Investigaciones Microbiológicas-Cimic.	
<i>E. coli</i> TOP10F ⁺	Cepa hospedera	Colección del Centro de Investigaciones Microbiológicas-Cimic.	

* Cepas de *B. sphaericus* no patógenas a larvas de *C. quinquefasciatus*. (1): Identificación con base en las pruebas bioquímicas realizadas en un estudio previo.

Curvas de crecimiento. Las cepas fueron cultivadas en medio líquido Broth Heart infusión (BHI) a 37°C con agitación constante, y cada hora se realizaron lecturas de turbidez (A_{550}) y siembra por dilución en agar Standard Plate Count (SPC) para el recuento de bacilos viables.

Esporulación. El porcentaje de esporulación se evaluó en los medios BHI y NYSM (caldo nutritivo 8 g, extracto de levadura 0,05%, $MnCl_2$ $5 \times 10^{-5}M$, $MgCl_2$ $10^{-3}M$, $CaCl_2$ $7 \times 10^{-4}M$) a 37°C seleccionando las esporas maduras con choque térmico a 90°C durante 20 minutos; posteriormente se realizaron siembras por dilución en placa en agar SPC y se incubó a 37°C por 48 h.

Bioensayos. Se evaluó el LD_{50} de cada aislamiento en larvas de tercer instar de *C. quinquefasciatus* utilizando diferentes concentraciones de suspensión (10^1 - 10^6 UFC/ml). Se trabajó por triplicado con 10 larvas para cada concentración, y después de las 24-48 h de incubación a 25°C se realizó la lectura de mortalidad. Con el análisis Probit del programa POLO-PC se calcularon los LD_{50} para cada cepa. Paralelamente, se realizaron los controles positivos con Bs 2362 y controles negativos con agua destilada estéril.

Análisis de las proteínas del cristal paraesporal. Para la extracción de las proteínas toxigénicas, de 42kDa y 51 kDa, se modificó el protocolo llevado a cabo por Cockmus *et al.* (1997) con el cual se obtuvieron proteínas totales a partir de 30 ml de medio NSYM cultivado a 30°C en agitación constante durante cuatro días. La cuantificación de las proteínas totales se realizó con el kit comercial BCA Protein Assay Kit, Pierce, Polylab N.V., según las instrucciones del proveedor. Se realizó la electroforesis en geles de SDS-Poliacrilamida al 10%, se sembraron en el gel 20 μ l de muestra y se corrieron a 200V durante una hora. Los geles se colorearon con azul de Coomassie.

Aislamiento y análisis de la región codificante del cristal paraesporal. Con el fin de evidenciar la presencia de los genes que codifican para las proteínas del cristal paraesporal se aisló ADN total del bacilo y se amplificó utilizando las siguientes condiciones de PCR: 4 μ l de primer (10 pmol/ μ l), 1 μ l de desoxinucleótidos (20 μ M) de cada uno, 10 μ l de Buffer Taq 10X, Taq polimerasa 2,5 U y 10 ng de ADN. El programa utilizado fue: 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos y 30 ciclos de

amplificación. Una vez detectada la región de interés, se realizaron ensayos de amplificación específica del fragmento de 3,5 Kb de la región codificante con los oligonucleótidos Prot UP, Prot DW, Tox UP, Tox RP, Cry UP, Cry DW, Spo UP y Spo DW de Pharmacia Biotech; el termociclador utilizado fue un TRIO-Thermoblock, Biometra, Göttingen. El producto de amplificación fue clonado en el vector script pCR 2.1 utilizando el kit comercial TA Cloning Kit® (Invitrogen) y secuenciado. Por otra parte, se utilizaron células competentes de *Escherichia coli* (DH5a y TOP10F') y Bs no patógeno (OT4b.48) para transformarlas con el producto clonado de 3,5 Kb; los ensayos de transformación se realizaron por choque térmico y electroporación.

Extracción de ADN plasmídico. Para la determinación del peso molecular de los plásmidos encontrados, se realizó una extracción por lisis alcalina a partir de 10 ml de cultivo del bacilo en caldo BHI y se sembraron 15 μ l de la extracción en gel de agarosa al 0,7% con 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio; la electroforesis se corrió en buffer TAE 1X (Maniatis *et al.*, 1982).

Curaje de plásmidos. Los plásmidos detectados fueron relacionados con la toxicidad realizando ensayos de curaje con temperatura (pases sucesivos a 41°C cada 48 horas), con naranja de acridina y bromuro de etidio (utilizando concentraciones entre 20-100 μ g/ml y 0,3-0,7 μ g/ml, respectivamente, en caldo nutritivo a 37°C en agitación constante durante 24 horas en oscuridad) y con ultravioleta (irradiando suspensiones celulares durante 2 a 6 minutos). Se estandarizó el método de lisis *in situ* en gel de agarosa al 0,4% para la extracción de plásmidos de alto peso molecular (González *et al.*, 1980; González *et al.*, 1981), a partir de los bacilos tratados con el fin de evaluar la pérdida del material plasmídico y posteriormente realizar los ensayos de patogenicidad con las cepas curadas.

RAPD a partir de extractos crudos del ADN total. Se modificó el protocolo reportado por Stephan *et al.* (1994). Se tomó una colonia a partir de agar SPC después de 16 h de incubación a 37°C y se resuspendió en 100 μ l de agua destilada estéril; se llevó a ebullición por 10 minutos y se centrifugó para tomar 5 μ l del sobrenadante para la reacción de amplificación. Se evaluaron 26 cebadores de diez nucleótidos de longitud, de los cuales se seleccionaron cinco: OPA08, OPA17, OPA19, OPF04 y OPO09. Para la amplificación se utilizaron las siguientes condiciones: primer 0,39 mM, desoxinucleótidos 200 mM

de cada uno, cloruro de magnesio 2,5 mM, Taq polimerasa 2,5 U, Buffer (Cloruro de potasio 50 mM, Tris HCl pH 9,0 10 mM, Tritón X-100 1%, BSA 1%). El programa utilizado fue : 92°C por 5 minutos, 45 ciclos de 92°C por 1 minuto, 34°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 2 minutos y una extensión final a 72°C por 15 minutos.

El perfil genético se analizó por el coeficiente de similitud de Jaccard y el método UPGMA, utilizando el programa SYNTAX-pc (Podan, 1993).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Curvas de crecimiento. Los datos obtenidos son promedios de tres curvas de crecimiento realizadas, con las mismas condiciones de incubación. Por espectrofotometría leyendo absorbancias a 550_{nm} (en la figura 1 se presenta la curva de crecimiento de

algunas de las cepas evaluadas), la mayoría de cepas presentaron un período de latencia de aproximadamente dos a tres horas, a excepción de las cepas SB 2.94, OT4b.31, OT4b.48 y OT4b.51, que comienzan el crecimiento celular a las dos horas de incubación. La fase logarítmica permanece hasta las siete horas de incubación.

Por recuento en placa se corroboró que no existe un aumento de la población celular hasta el tiempo tres (figura 2). El tiempo de generación más corto en BHI a 37°C fue de 28 a 37 min, y las cepas que presentaron mayor cantidad de células (>6X10⁸UFC/ml) fueron CH2.17, OT4b.2, OT4b.28, OT4b.31, OT4b.34, OT4b.35 y OT4b.48. Las cepas CU 2.1 y CU 2.2 presentaron un patrón de crecimiento diferente, con un período de latencia de 7-8 h, lo cual era lo esperado ya que corresponden a otras especies de bacilos (tabla 1).

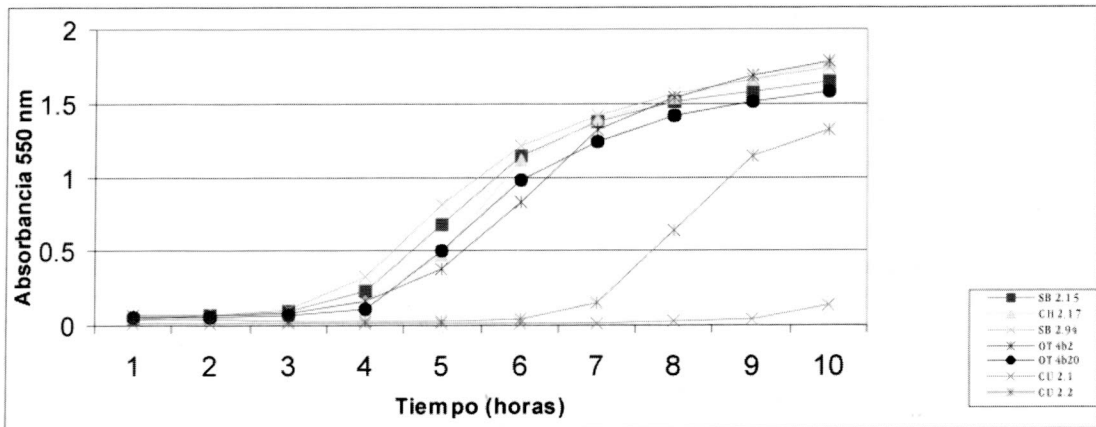


Figura 1. Curva de crecimiento por lectura de absorbancia de algunas cepas nativas de Bs evaluadas en caldo BHI.

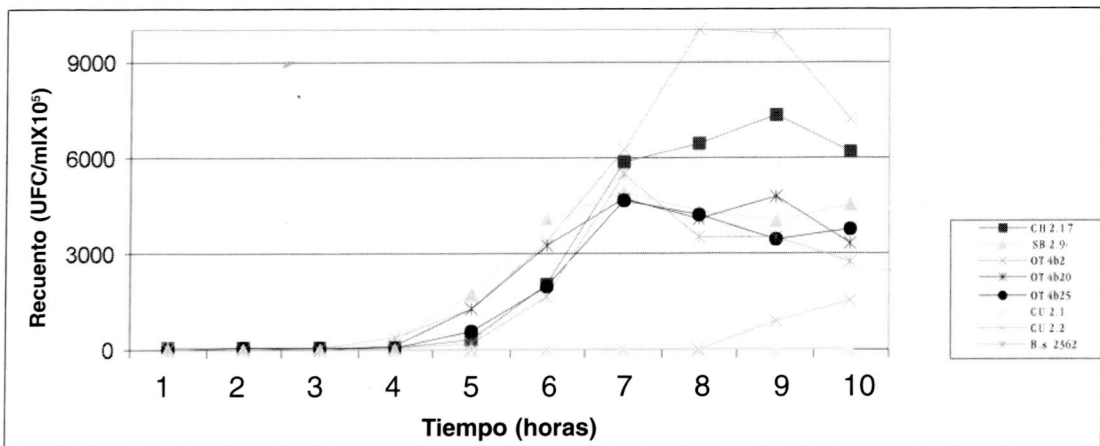


Figura 2. Curva de crecimiento por recuento en placa de algunas cepas nativas de Bs evaluadas en caldo BHI.

Esporulación. El ensayo de esporulación de las cepas nativas se realizó en las mismas condiciones utilizadas para curva de crecimiento, con el fin de determinar cuales cepas esporulan primero sin necesidad de un inductor como sales de manganeso o magnesio. Teniendo como base la curva de crecimiento de cada cepa, se inició la determinación de la formación de esporas por microscopía a partir de las siete horas de incubación. La selección de esporas maduras se realizó por choque térmico cada cuatro horas desde las 32 horas, tiempo en el cual se empezaron a observar esporas maduras, hasta las 40 horas de incubación. En la tabla 2 se indican los tiempos de inicio de la esporulación para cada una de las cepas.

El menor tiempo fue de nueve horas de incubación. Los porcentajes de esporulación alcanzados para todas las cepas estuvieron por debajo del 1%, lo que indica que el proceso de esporulación es muy demorado bajo las condiciones de cultivo utilizadas, y que el oxígeno disuelto es un factor importante para el crecimiento del bacilo y es probable que evite la esporulación. Se comienzan a obtener esporas maduras a las 32 horas de incubación; este resultado muestra la necesidad de utilizar un inductor en el medio de cultivo; sin embargo se observaron diferencias entre las cepas con respecto al tiempo en que empiezan a esporular. Al utilizar el medio NYSM, el proceso de esporulación fue más eficiente, observándose esporas maduras a las 24 horas, y se obtuvo diez veces más producción de biomasa y de esporas cuando fue incubado sin agitación por cinco días a 37°C con respecto al cultivo agitado en este mismo medio; se presentaron títulos finales de 10^8 - 10^9 UFC/ml, y el 26% de la población presentó porcentajes de esporulación mayores o iguales al 90%.

Bioensayos. La cepa Bs 2362 fue utilizada como control positivo de patogenicidad, puesto que es una cepa de referencia con la cual se ha evaluado la acti-

Tabla 2. Porcentajes promedio de dos ensayos de esporulación de los bacilos incubados durante 40 horas en caldo BHI y agitación constante.

Cepa	9 Horas	15Horas	32 Horas*	36 Horas*	40 Horas*
SB 2.15	-	I	0,001	0,0009	0,0004
CH 2.17	-	-	0,00017	0,001	0,000062
SB 2.94	-	I	0,005	0,005	0,001
OT4b.2	I	ESPO	0,014	0,024	0,003
OT4b.20	I	ESPO	0,001	0,002	0,0007
OT4b.25	I	ESPO	0,0005	0,0002	0,0003
OT4b.26	I	ESPO	0,0027	0,0004	0,002
OT4b.28	-	-	0,002	0,0005	0,0009
OT4b.30	I	ESPO	0,032	0,074	0,04
OT4b.32	-	I	0,00055	0,007	0,0015
OT4b.34	-	ESPO	0,0016	0,003	0,009
OT4b.35	-	I	0,00015	0,001	0,006
OT4b.39	-	I	0,0003	0,001	0,004
OT4b.49	-	ESPO	0,0004	0,0022	0,007
OT4b.51	-	-	0,00000	0,00000	0,00000
OT4b.56	-	I	0,0005	0,0005	0,00015
OT4b.58	-	-	0,00015	0,0002	0,00000
SB 2.124	-	-	0,0002	0,0002	0,0004
CU 2.1	-	-	0,0065	0,017	0,02
CU 2.2	-	-	0,00000	0,00000	0,00000
OT4b.31(-)	-	-	0,00000	0,00000	0,00000
OT4b.48(-)	-	-	0,000005	0,00004	0,00003
B s 2362(+)	-	ESPO	0,00043	0,01	0,005
B. t HD2	-	I	0,000015	0,0001	0,0001

- = Por microscopía se observan células vegetativas.

I = Por microscopía se observan células iniciando esporulación.

ESPO= Por microscopía se observan células en diferentes estados de esporulación.

* = Porcentajes de esporulación determinados por recuentos en placa de la población total antes, y de la población de esporas después del choque térmico.

(-)= control negativo de toxicidad.

(+)= control positivo de toxicidad.

vidad toxigénica y se ha reportado un LD₅₀ aproximado de 10^2 - 10^4 células por mililitro (Burges, 1982; Lord *et al.*, 1990; Sun *et al.*, 1996; W.H.O., 1985). En este ensayo, el LD₅₀ de Bs 2362 fue de 7×10^2 UFC/ml. De acuerdo con las curvas de patogenicidad (figura 3), el comportamiento general de dosis respuesta en los bioensayos realizados fue exponencial y se presentaron diferencias entre las cepas evaluadas, las cuales se pueden agrupar como cepas de baja patogenicidad (figura 3C), de patogenicidad media (figura 3B) y de alta patogenicidad (figura 3A). Las cepas OT4b.20, OT4b.25, OT4b.26, OT4b.28, OT4b.32, OT4b.35, OT4b.39, OT4b.49 y OT4b.56 fueron altamente toxigénicas.

Estas cepas presentan porcentajes de mortalidad iguales o mayores al 50% con dosis iguales o menores a 10^3 UFC/ml, de acuerdo con el análisis Probit.

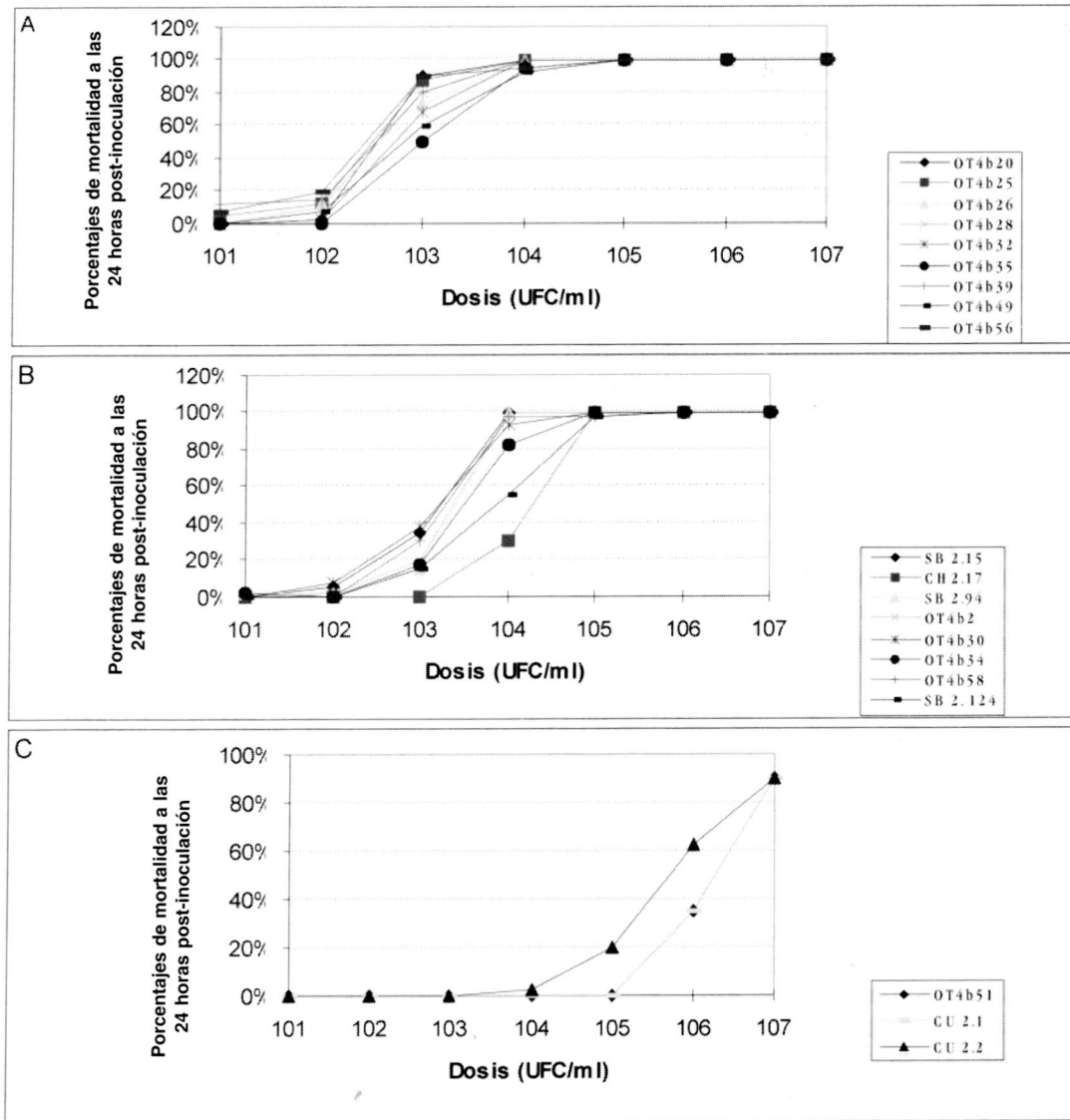


Figura 3. Curvas de patogenicidad de las cepas nativas de Bs en larvas de *C. quinquefasciatus*. A: Altamente patógenas. B: Patogenicidad media. C: Baja patogenicidad.

Para ensayos en campo sería interesante realizar ensayos de producción en medios de cultivo económicos, en los cuales se obtenga una alta producción de esporas de estas cepas en corto tiempo y pruebas de actividad larvicida con diferentes dosis de esporas maduras.

En las cepas altamente patógenas, el número máximo de células/ml alcanzado es variable, pero mayor que el de las cepas de baja toxicidad y algunas de toxicidad mediana; además, presentaron un mayor porcentaje de esporulación. A nivel fisiológico, las

cepas nativas de Bs con potencial de ser utilizadas en control biológico, de acuerdo con su alta patogenicidad, mayor número de células viables o producción de esporas son la OT4b.2, OT4b.28, OT4b.30, OT4b.32, OT4b.34, OT4b.35 y OT4b.49. Sin embargo, para pruebas piloto no se deben dejar de lado las cepas OT4b.20, OT4b.25, OT4b.26, OT4b.35, OT4b.39 y OT4b.56, las cuales son altamente patógenas para larvas de *C. quinquefasciatus*.

Análisis de las proteínas del cristal paraesporal. Para esta fase se seleccionaron, de

acuerdo con sus características fisiológicas y toxigénicas, las cepas de Bs CH2.17, OT4b.20, OT4b.25, OT4b.31, OT4b.39, OT4b.48, OT4b.56 y 2362.

Los primeros ensayos de extracción se realizaron con 30 ml de cultivo. Sin embargo, se obtuvieron mejores resultados con 100 ml de cultivo. El análisis de proteínas se realizó teniendo en cuenta el número de esporas viables para obtener una mayor concentración de proteínas, la cantidad de proteínas totales, la presencia de las proteínas que componen la toxina y la actividad larvívica (véase tabla 3). En el medio NSYM se obtuvieron 10^7 esporas/ml a excepción de *B. apiarius* (CU2.1) con 10^6 esporas/ml, el cual se utilizó en este estudio como un control negativo de especie para la presencia de las toxinas; a pesar de esta cantidad homogénea de esporas se obtuvieron diferencias en la concentración de proteínas entre las cepas evaluadas. Las cepas nativas que presentaron valores iguales o mayores a 0,5 mg/ml de proteínas fueron OT4b.25, OT4b.56 y OT4b.20; las cepas no patogénicas OT4b.48 y CU 2.1 registraron las menores concentraciones, a excepción de la cepa OT4b.31, la cual había sido clasificada como no patogénica. El bandeo obtenido en el gel (datos no mostrados) evidenció la presencia de las proteínas de 42 y 51 kDa en los aislamientos patógenos, como se ha reportado en estudios anteriores con Bs 2362 y 1593 (Baumann *et al.*, 1987; Berry *et al.*, 1991). La falta de estas bandas en las cepas OT4b.48 y CU 2.1 corroboró que las bandas de 42 y 51 kDa obtenidas correspondían a proteínas exclusivas de Bs patógenos a larvas de mosquitos; de otra parte, la cepa OT4b.31 presentó dos bandas a la misma altura de las detectadas en las cepas toxigénicas; sin embargo, en bioensayos anteriores este aislamiento no había sido patógeno a larvas de *Culex quinquefasciatus*. Se halló una proteína de 30 kDa exclusiva en las cepas patógenas nativas, lo cual podría sugerir la presencia de una nueva toxina insecticida. Es importante analizar esta proteína para establecer su función y su expresión durante la esporulación, así como evaluar las proteínas que sean detectadas en los demás aislamientos (Thanabalu *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996).

Aislamiento y análisis de la región codificante del cristal paraesporal. Los resultados de los ensayos de PCR revelaron como producto de amplificación una banda específica de 3 - 4 Kb en las cepas de Bs CH2.17, OT4b.20, OT4b.25, OT4b.31, OT4b.39, OT4b.56 y 2362, lo cual indicó la presencia en la región

Tabla 3. Parámetros evaluados para el análisis de la toxina binaria en las cepas de B.s patógenas y no patógenas para larvas de mosquitos.

Cepa	Concentración de proteínas mg/ml	Presencia de toxina		Actividad larvívica
		42 kDa	51 kDa	
CU 2.1	0,103	-	-	-
CH 2.17	0,405	+	+	+
OT4b.20	0,500	+	+	+
OT4b.25	0,715	+	+	+
OT4b.31	0,329	+	+	-
OT4b.39	0,263	+	+	+
OT4b.48	0,246	-	-	-
OT4b.56	0,609	+	+	+
2362	0,281	+	+	+

de 3.5 Kb, correspondiente a la secuencia codificante de las toxinas en Bs. Igualmente, se observó la ausencia de estas bandas en las cepas no patógenas OT4b.48 y CU 2.1; estos resultados apoyaron los encontrados en la electroforesis de proteínas.

Los amplificadores obtenidos fueron clonados en el vector script pCR 2.1 y posteriormente se transformaron en *E. coli* DH5 α . Por otra parte, se clonó el inserto de 3.5 Kb en el vector de expresión pDML995 con el fin de transformar la cepa no patogénica OT4b.48. Sin embargo, estos ensayos no mostraron los resultados esperados ya que en ninguno de los ensayos de electroporación se obtuvieron clones recombinantes, lo que se podría explicar por el sistema de restricción-modificación presente en este bacilo. Los clones positivos para el fragmento de 3,5 Kb, detectados por α -complementación de *lac Z* en *E. coli* DH5 α por amplificación del vector script pCR 2.1, fueron secuenciados utilizando los cebadores universales UP, RP, marcados con una partícula fluorescente CY5 en el extremo 5'. Las secuencias obtenidas fueron alineadas con el programa BLAST y comparadas con las registradas en la base de datos. Los resultados de los alineamientos indicaron un porcentaje de homología mayor del 97% con respecto a las secuencias de la toxina binaria de cepas entomopatógenas de referencia de Bs, lo cual indica que estas cepas nativas son altamente toxigénicas. Con los cebadores Tox UP, Tox RP, Cry UP, Cry DW, Spo UP y Spo DW se obtuvo la secuencia completa de la región codificante para la toxina binaria de las cepas OT4b.25 por ser altamente toxigénica, y OT4b.31 para aclarar la pérdida de su patogenicidad; además, se compararon las secuencias

peptídicas consenso con respecto a la cepa de referencia 2362 (Baumann *et al.*, 1988).

Las secuencias peptídicas obtenidas fueron introducidas en el sistema OWL PROTEIN SEQUENCE DATABASE (<http://77bmsgi11.leeds.ac.uk>) para predecir la estructura secundaria de cada proteína y determinar si el cambio de un aminoácido conlleva a cambios conformacionales importantes; para la cepa OT4b.25 se determinaron tres mutaciones puntuales en la región nucleotídica de la proteína de 51 kDa: (T \rightarrow C, aa₂₂₂: Serina, T \rightarrow C, aa₂₃₅: Glicina y A \rightarrow T, aa₄₀₃: Prolina). Estas mutaciones fueron silenciosas, mientras que para la proteína de 42 kDa se detectaron dos mutaciones de las cuales una fue silenciosa (T \rightarrow C, aa₁₉₅: Cisteína y A \rightarrow G, aa₂₇₅: Isoleucina \rightarrow Valina). El cambio de aminoácidos en esta proteína provocó una alteración conformacional al comparar la estructura secundaria con la de la cepa de referencia; para la cepa OT4b.31 se encontraron ocho sustituciones y todas involucraron un cambio de aminoácido.

En la proteína de 51 kDa se registraron tres sustituciones: (A \rightarrow G, aa₁₂₃: Histidina \rightarrow Arginina; G \rightarrow A, aa₁₈₃: Alanina \rightarrow Treonina y A \rightarrow G, aa₃₃₈: Treonina \rightarrow Alanina), y en la de 42 kDa, cinco: (C \rightarrow A, aa₁₀₄: Alanina \rightarrow Ácido glutámico; A \rightarrow G, aa₁₁₇: Treonina \rightarrow Alanina; T \rightarrow A, aa₁₇₇: Ácido aspártico \rightarrow Ácido Glutámico; C \rightarrow A, aa₁₈₂: Glutamina \rightarrow Lisina y G \rightarrow A, aa₂₆₅: Glicina \rightarrow Ácido glutámico). En la proteína de 51 kDa estos cambios no afectaron la estructura secundaria de la proteína mientras que en la de 42 kDa sí influyeron notablemente en su conformación, lo que explicaría la falta de patogenicidad de esta cepa por estar alterada la funcionalidad de la proteína, ya sea a nivel de unión con la proteína de 51 kDa para formar el complejo binario o a nivel de su actividad toxigénica para la internalización en las células epiteliales.

Extracción y curaje de ADN plasmídico. El peso molecular se calculó utilizando como patrones ADN de: fago Lambda, LambdaD39, ADN lambda digerido con HindIII y los plásmidos de alto peso molecular de *Pseudomonas putida* OUS82, WWO y *B. thuringiensis* HD2. Fue necesario utilizar menor porcentaje de agarosa (0,4%) y realizar la corrida electroforética a 10 mAmp durante 24 horas aproximadamente para lograr una mejor separación.

Todas las cepas nativas evaluadas y cepa control Bs 2362 presentaron un plásmido de 117,76 Kb. Este plásmido en la cepa de referencia Bs 2362 corresponde al reportado previamente por Baumann *et al.* (1991) y Singer (1987), el cual presenta un tamaño

Tabla 4. Resumen de las cepas curadas con cada uno de los tratamientos utilizados y relación con la toxicidad.

Cepa	Temperatura (41°C-42°C)	Naranja de acridina	Radiación Ultravioleta	Bromuro de Etidio	*Toxicidad después del curaje
SB 2.15	+	+	-	-	+
CH2.17	+	+	+	+	+
SB 2.94	-	+	-	+	+
OT4b.2	-	-	-	-	ND
OT4b.20	+	-	+	-	+
OT4b.25	-	+	-	-	+
OT4b.26	+	+	-	+	+
OT4b.28	-	+	-	-	+
OT4b.30	-	+	-	-	+
OT4b.32	-	+	+	-	+
OT4b.34	-	+	-	-	+
OT4b.35	+	-	-	+	+
OT 4b.39	+	-	+	+	+
OT4b.49	+	+	-	-	+
OT4b.51	-	+	+	-	+
OT4b.56	+	-	+	-	+
OT4b.58	+	+	+	-	+
SB 2.124	+	-	-	-	+
CU 2.1	-	+	-	+	+
CU 2.2	+	+	+	+	+
OT 4b.31(-)	+	+	-	-	-
OT 4b.48(-)	+	+	-	+	-
B. s 2362(+)	+	+	+	-	+

+ = Cepa curada (No presenta banda de ADN plasmídico).

- = Cepa no curada (continúa con plásmido después del tratamiento).

* = Mortalidad en larvas de tercer instar de *C. quinquefasciatus* positiva a las 24 h post-inoculación, o negativa a las 72 h post-inoculación.

(-) = Cepa control negativo de toxicidad.

(+) = Cepa control positivo de toxicidad.

ND = dato no disponible.

de 75 Mda, lo que equivaldría aproximadamente a 114 Kb. La cepa CU 2.2 (*B. pulvifaciens*) presentó otros dos plásmidos de 11,72 y 5,35 Kb.

La extracción por lisis *in situ* fue una modificación del método descrito previamente para la detección de plásmidos de gran tamaño en *B. Thuringiensis*. Este tipo de extracción fue eficiente para realizar un *screening* más rápido de la presencia o ausencia de plásmidos posterior a los tratamientos de curaje.

En la tabla 4 se resumen los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos. El mejor tratamiento de curaje fue con naranja de acridina, que en este caso presentó un 74% de cepas curadas en comparación a los tratamientos con temperatura (61%), radiación ultravioleta (39%) y bromuro de etidio (35%); el plásmido de la cepa OT4b.2 no se logró eliminar con ninguno de los tratamientos utilizados. Las cepas curadas conservaron la patogenicidad en larvas de tercer instar de *C. quiquefasciatus*.

Este resultado refleja que pueden existir diferencias entre los plásmidos a pesar de presentar un tamaño similar, y que en las cepas no curadas, los plásmidos son mucho más estables y podrían ser necesarios para la sobrevivencia de las mismas (Norris *et al.*, 1988; Hara *et al.*, 1982).

RAPD a partir de extractos crudos del ADN total. Bs es genéticamente heterogéneo y ha sido clasificado en seis grupos de homología de ADN (I, IIA, IIB, III, IV y V). Las cepas que pertenecen al grupo IIA son patógenas para larvas de mosquito (Abadjieva, 1990; Priest *et al.*, 1994; Zahner *et al.*, 1994; Woodburn *et al.*, 1995).

Para la caracterización genética por RAPD se trabajó con cepas control correspondientes a los grupos de homología I, IIA, IIB, III, IV y V y con aislamientos de Bs previamente caracterizados como no patogénicos a larvas que habían sido aislados de suelo de bosque del parque natural Chicaque (Dussán *et al.*, 1998).

Cinco cebadores de los 26 probados fueron seleccionados para las amplificaciones azarosas: OPA 08, OPA 17, OPA 19 OPF 04 y OPO 09; se elaboraron los respectivos dendogramas para cada cebador (datos no mostrados) y un dendograma unificando los patrones de amplificación obtenido con todos los cebadores (figura 4). En los perfiles moleculares en-

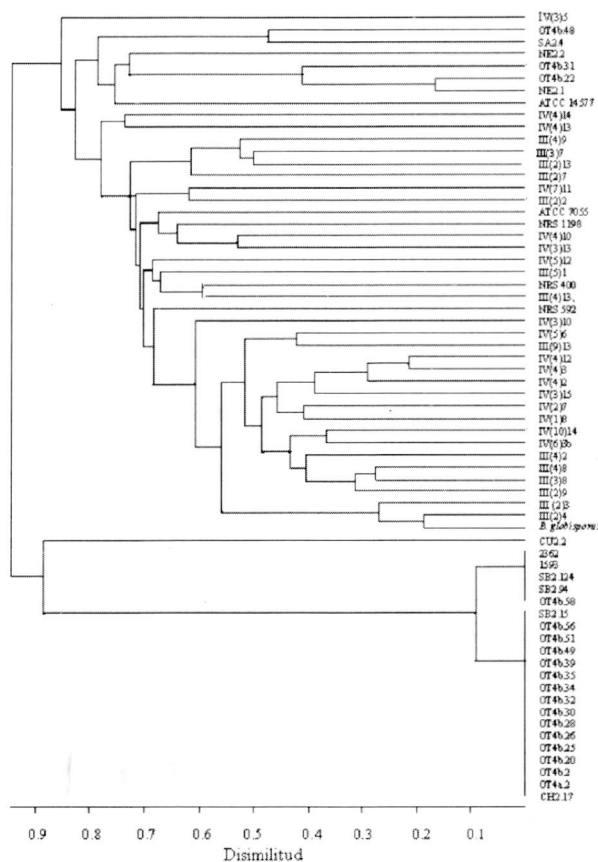


Figura 4. Dendrograma de los RAPD obtenidos de las cepas Bs patógenas y no patógenas con los cebadores OPA 08, OPA 17, OPA 19, OPF 04 y OPO 09.

contrados, las cepas patógenas y no patógenas de Bs conforman dos grupos independientes con una similitud del 5% entre ellos. Los aislamientos patogénicos conforman un grupo homogéneo con una similitud entre el 90 y 100%, y se encuentran relacionados con las cepas de referencia del grupo de homología IIA (Bs 1593 y 2362). Las cepas no patógenas presentaron un polimorfismo genético que las agrupó en pequeños *clusters* diferentes con similitudes que variaron entre el 12 y 80%; estos resultados concuerdan con la diversidad genética que se ha reportado para *B. sphaericus* con diferentes métodos, tales como fagotipificación, serotipificación, electroforesis de enzimas multilocus e hibridación del ADN (Abadjieva *et al.*, 1990; Priest *et al.*, 1994; Zahner *et al.*, 1994).

Las cepas patógenas de este estudio muestran ser un grupo diferente a los bacilos no entomopatógenos, lo cual concuerda con algunos autores de considerarlo como

una población clonal distinta (Bauman *et al.*, 1991; Priest *et al.*, 1994; Woodburn *et al.*, 1995).

CONCLUSIONES

Es importante anotar el hecho de haber aislado cepas nativas de Bs con plásmidos muy estables y con actividad larvicida contra tres especies de mosquitos. Estos bacilos conforman un grupo homogéneo que diverge de los aislamientos no patogénicos, por lo que se podría pensar en la caracterización de los marcadores genéticos conservados con el fin de realizar más aislamientos a partir de diferentes hábitat. Los resultados obtenidos a nivel de actividad larvicida indican que es promisorio la utilización de estas cepas en zonas endémicas, y para ello es preciso establecer las condiciones para la producción a gran escala y pruebas en campo, con el fin de ser implementadas dentro de un manejo integrado de plagas. Las cepas nativas de Bs con potencial para ser utilizadas en control biológico de larvas de *C. quinquefasciatus*, de acuerdo con su toxicidad, crecimiento, esporulación y resistencia a la luz ultravioleta, son: OT4b.2, CH2.17, OT4b.20, OT4b.25, OT4b.28, OT4b.30, OT4b.32, OT4b.34, OT4b.39, OT4b.49 y OT4b.56. Estas cepas nativas podrían ser utilizadas en control biológico de larvas de mosquitos transmisores de enfermedades humanas, tales como el dengue, la malaria, encefalitis y filariasis, entre otras.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Colciencias por la financiación de la primera fase de la investigación, al programa Alfa de la Unión Europea por el apoyo en el desarrollo de la segunda parte de este estudio y al doctor Olano, jefe de la Unidad de Entomología del Instituto Nacional de Salud (INS), por la asesoría en el manejo de la colonia de *Culex quinquefasciatus* y suministro de larvas para la realización de los bioensayos.

BIBLIOGRAFÍA

Abadjieva, A. N., Grigorova, R. T. & Miteva, V. I. 1990. DNA fingerprinting of the mosquito pathogen *Bacillus sphaericus* with M13 DNA as a probe. *Letters in Appl. Microbiol.* 10, 141-143 p.

Baumann, L., Baumann, P., Broadwell, A. H. & Bowditch, R. 1987. Cloning of the gene for the

larvicidal toxin of *B. sphaericus* 2362: Evidence for a family of related sequences. *J. Bacteriol.* 169(9): 4061-4067 p.

Baumann, L., Broadwell, A. H. & Baumann, P. 1988. Sequence analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding 51.4- and 41.9- kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. *J. Bacteriol.* 170: 2045-2050.

Baumann, P., Clark, A. M., Baumann, L. & Broadwell, A. H. 1991. *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: Properties of the organism and its Toxins. *Microbiol. Reviews.* 55 (3):425-436.

Berry, C., Thanabalu, T., Hindley, J. & Jackson, J. 1991. Cloning, sequencing, and expression of a gene encoding a 100 kDa mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus*SSII-1. *J. Bacteriol.* 173(9): 2776-2785 p.

Burges, H. D. 1982. Control of insects by bacteria. *Parasitology.* 84: 79-117.

Cockmus, C., Davidson, E. W. & Cooper, K. 1997. Electrophysical effects of *Bacillus sphaericus* binary toxin on cultured mosquito cells. *J. Invertebr. Pathol.* 69:197-204.

Dussán, J. Vives, M., Lozada, K., Lozano, L. & Andrade, D. 1998. Estudio preliminar para el diseño de una metodología para el monitoreo de ecosistemas usando microflora bacteriana como indicador. Informe final. Fondo para la protección del medio ambiente José Celestino Mutis-FEN Colombia.

Dussán, J., Andrade, D. & Lozano, L. 1993-1995. Microbiología aplicada II: Caracterización de ADN plasmídico de bacterias nativas útiles en control biológico. Informe final. Centro de investigaciones microbiológicas-Colciencias.

Gonzales, J. M. Jr. & Carlton, B. C. 1980. Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid.* 3, 92-98.

Gonzales, J. M. Jr., Dulmage, H. T. & Carlton, B. C. 1981. Correlation between specific plasmids and d-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid.* 5: 351-365.

- Hara, T., Aumayr, A., Fujio, Y. & Weda, S. 1982. Elimination of plasmid-linked Poliglutamate production by *Bacillus subtilis* (natto) with Acridine Orange. *Appl. Environ. Microbiol.* 44(6):1456-1458.
- Liu, J.-W., Porter, A. G., Wee, B. Y. & Thanabalu, T. 1996. New gene from nine *Bacillus sphaericus* strains encoding highly conserved 35.8-Kilodalton mosquitocidal toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(6):2174-21-76.
- Lord, J. C. & Fukuda, T. 1990. Relative potency of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* 2362 for *Mansonia titillans* and *Mansonia diary*. *Journ. Amer. Mosqui. Assoc.* 6(2): 325-328.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning, A laboratory manual*. Cold Spring Harbord Laboratory.
- Norris, J. 1988. *Methods in Microbiology. Plasmid technology*. Vol. 21. 2th ed. Grinsted, J. & Bennet, P. M. Academic Press. 1-20.
- Podani, J. 1993. SYNTAX-PC. *Computer programs for multivariate data analisys in ecology and sistematics, version 5.0. User's Guide*. Department of Plant Taxonomy and Ecology, L. Eötvös University. Scientia Publishing, Budapest.
- Priest, F. G., Kaji, D. A., Rosato, Y. B. & Canhos, V. P. 1994. Characterization of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria by ribosomal RNA gene restriction fragment length polymorphisms. *Microbiology*. 140: 1015-1022.
- Singer, S. 1987. Current status of the microbial larvicide *Bacillus sphaericus*. *Biotech. Invert. Pathol. Cell Cult.* 133-163.
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. & Holt, J. G. 1986. *Bergey's Manual of sistematic bacteriology*. 7th edition, and Vol. 2, 8th edition.
- Stephan, R., Scharft, H. & Untermann, F. 1994. Characterization of *Bacillus licheniformis* with the RAPD technique (Random Amplified Polymorphic DNA). *Letters Appl. Microbiol.* 18: 260-263.
- Sun, M., Luo, X., Dai, J., Ku, K., Liu, Z., Yu, L., Chen, Y. & Yu, Z. 1996. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* strains from Chinese soils toxic to mosquito larvae. *Jour. Invert. Pathol.* 68 (1): 74-77.
- Thanabalu, T. & Porter, A. G. 1996. A *Bacillus sphaericus* gene encoding a novel type of mosquitocidal toxin of 31.8 Kilodalton. *Gene (Amsterdam)*. 170 (1):85-89.
- Woodburn, M. A., Yousten, A. A. & Hilu, K. H. 1995. Random amplified polymorphic DNA fingerprinting of mosquito-pathogenic and nonpathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. *Internat. Journ. Systemat. Bacteriol.* 45 (2): 212-217.
- Word Health Organization (W.H.O.). 1985. Informal consultation of the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. W.H.O./TDR/BCV/SPHAERICUS/85.3.
- Zahner, V. & Momen, H. 1995. Multilocus enzyme electrophoresis study of *Bacillus sphaericus*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*. 90 (1): 65-68.