

Tesina de grado
Licenciatura en Bioquímica

**Aislamiento y caracterización de
cepas nativas de *Bacillus
thuringiensis* con miras al
desarrollo de un bioinsecticida**

Alfonso García Pintos Rovira

Tutora: Dra. Ángela Cabezas

Laboratorio de Biotecnología, Facultad de
Ingeniería, Universidad ORT.

Abril, 2014

Resumen

Bacillus thuringiensis (Bt) se ha convertido mundialmente en uno de los principales microorganismos controladores biológicos, especialmente debido a la capacidad de producción de cristales proteicos con alta actividad insecticida. En el Uruguay en la última década se ha producido un aumento exponencial en el sector agrícola, principalmente del cultivo de soja, el cual demanda una gran cantidad de insecticidas químicos para el control de plagas. Su uso irracional ha llevado a contaminaciones de ecosistemas y a la presencia de residuos tóxicos en los alimentos. Es por este motivo que resulta crucial la búsqueda de alternativas amigables con el medio ambiente que permitan el control de dichos insectos. Es por esta razón el interés existente de contar con un insecticida biológico a base de Bt. Para ello se propuso aislar a partir de muestras de diferentes ecosistemas (suelo, hojas) cepas autóctonas de *Bacillus thuringiensis*. Debido a que Bt forma parte de un grupo denominado *Bacillus cereus sensu lato*, la utilización de la secuencia del gen de ARNr 16S, comúnmente utilizada para la identificación de microorganismos no resulta útil en este caso ya que todos los miembros constituyentes de dicho grupo se encuentran muy relacionados genéticamente. Es por esto que para su identificación se pusieron a punto diferentes metodologías, tanto moleculares como fenotípicas tratando de lograr una identificación lo más precisa posible. Algunos de los métodos fenotípicos empleados fueron la detección de la enzima α -amilasa y la observación de cristales al microscopio óptico de contraste de fases. Finalmente, dentro de los métodos moleculares se hallan reacciones de PCR con tres *sets* de *primers* (los cuales detectarían diferentes grupos de genes *cry*) y estudio de perfiles REP, lo que permitió agrupar a los aislamientos según sus perfiles. En cuanto a los resultados conseguidos, de los 65 aislamientos obtenidos a partir de las diferentes muestras, solamente 2 se identificaron como *Bacillus thuringiensis* mientras que otros 2 serían presuntos Bt.

Palabras claves: Bioplaguicida / *Bacillus thuringiensis* / genes *cry* / Rep-PCR

Abreviaturas

μ l	Microlitro
μ M	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
Bc	<i>Bacillus cereus</i>
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis var. israelensis</i>
Btk	<i>Bacillus thuringiensis var. kurstaki</i>
cm	Centímetros
dNTPs	Desoxinucleótidostrifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Kb	kilobases
KDa	Kilodaltons
M	Molar
Mb	Megabases
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mM	Milimolar
MPM	Marcador de peso molecular
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
TAE	Buffer Tris-acetato-EDTA
TES	Buffer Tris-EDTA-SDS
T _m	Temperatura de fusión

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Control Biológico	6
1.2. Generalidades de <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
1.3. Inclusiones paraesporales	8
1.4. Identificación de <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
2. OBJETIVOS DE TRABAJO	16
2.1. Objetivo general	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Recolección de muestras	17
3.2. Aislamiento de cepas	19
3.3. Cepas de referencia	20
3.4. Identificación fenotípica de cepas	21
3.5. Puesta a punto de un método para la detección de genes <i>cry</i>	22
3.6. Caracterización Molecular	24
3.7. Observación de Cristales	27
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1. Aislamiento e identificación fenotípica de cepas	28
4.2. Desarrollo de un método para la detección de genes <i>cry</i> mediante PCR	29
4.3. Caracterización molecular	35
4.4. Observación de cristales	41
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	43
6. APÉNDICE	45
6.1. Medios de cultivo	45
6.2. Reactivos	46
7. BIBLIOGRAFÍA	47

1. INTRODUCCIÓN

En el Uruguay, el sector agrícola ha mostrado un crecimiento exponencial en los últimos 10 años. El cultivo mayormente responsable es la soja, que pasó de 15.000 hectáreas en 2002 a 1.050.000 en 2012 (MGAP-DIEA, 2013). Ésta, al igual que el maíz, el sorgo, el tomate y el morrón entre otros, son particularmente sensibles al ataque por insectos. El mismo es causante de pérdidas significativas de las cosechas llevando a una importante reducción de los rendimientos.

Los insecticidas químicos se han convertido en el principal método de control de estas plagas lo que permitió el gran incremento en la productividad mundial. Su uso irracional y masivo ha originado grandes problemas principalmente de orden ambiental y fitosanitario, entre los que se encuentran la resistencia de los insectos a plaguicidas, la eliminación de poblaciones de fauna benéfica, la contaminación de los ecosistemas y la presencia de residuos tóxicos en los alimentos (Hernández *et al.*, 1997). Por lo tanto, existe una necesidad crítica de contar con herramientas seguras y efectivas para el control de plagas que sean alternativas a los insecticidas químicos (Sauka *et al.*, 2008). Es por esta razón que se ha dirigido la atención a las propiedades insecticidas de ciertos microorganismos o productos microbianos secundarios (Niedmann Lolas *et al.*, 2006).

El mercado global de pesticidas (herbicidas, insecticidas, fungicidas y nematocidas) está valorado aproximadamente en 25.000 millones de dólares. Cerca del 2.5 % de ese mercado corresponde a biopesticidas (Ibrahim *et al.*, 2010). Éstos derivan de materiales naturales tales como plantas, animales, bacterias y ciertos minerales, controlando plagas mediante mecanismos no tóxicos. Presentan un importante rol en la protección de los cultivos, principalmente en combinación con otras herramientas de control tales como agroquímicos formando parte del manejo integrado de plagas (Canan, 2013).

1.1. Control Biológico

El control biológico puede definirse como el uso de organismos benéficos (enemigos naturales) para el control de aquellos que causan daño (plaga). Este tipo de control busca reducir la población de la plaga a un nivel en el cual no cause daño económico. Los microorganismos causantes de enfermedades en los insectos, normalmente bacterias, virus u hongos, se denominan entomopatógenos y representan una alternativa en el manejo integrado de plagas de importancia económica en la agricultura. Este tipo de control tiene un menor impacto ecológico que el uso de plaguicidas químicos (Hernández *et al.*, 1997).

El mayor número de especies con propiedades insecticidas pertenece al género *Bacillus*, particularmente a *Bacillus thuringiensis* (Niedmann Lolas *et al.*, 2006). *Bacillus thuringiensis* es considerado como el principal agente promisorio de control biológico de dípteros, lepidópteros y coleópteros, ocupando casi el 97% del mercado de biopesticidas a nivel mundial (Brar *et al.*, 2006). Las proteínas entomopatógenicas liberadas por estas bacterias durante su desarrollo son altamente específicas para algunas de las principales plagas agrícolas y no tienen efecto sobre otros insectos benéficos, plantas o animales domésticos (Abad Flores *et al.*, 2011). Hasta el momento se han registrado en el mercado mundial más de 400 formulaciones a base de *Bacillus thuringiensis*, siendo las marcas más utilizadas Dipel y Thuricide. Es importante tener en cuenta que en el Uruguay actualmente no se encuentran registrados productos a base de *Bacillus thuringiensis* y sería una gran innovación la producción de un bioinsecticida nacional.

1.2. Generalidades de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria Gram-positiva la cual se caracteriza por la habilidad de producir inclusiones paraesporales durante la fase estacionaria de crecimiento (Liu *et al.*, 2013; Gómez *et al.*, 2007). Estas inclusiones generalmente se acumulan en la célula madre, formando una inclusión proteica que puede alcanzar entre el 20 – 30 % del peso seco de la célula esporulada (Schnepf *et al.*, 1998) (figura 1).

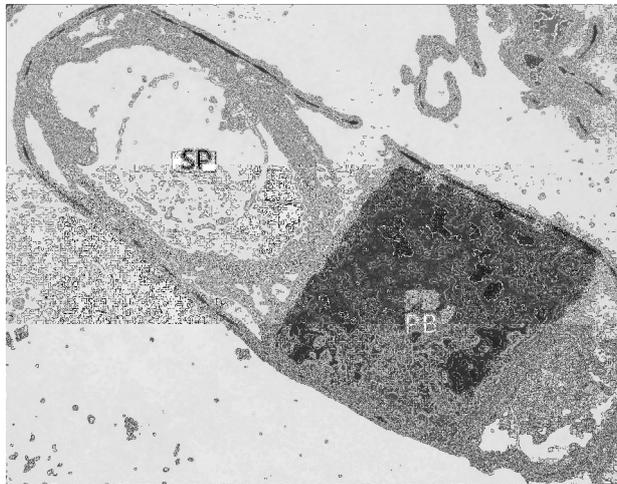


Figura 1. Micrografía de una célula de *Bacillus thuringiensis* esporulando, obtenida con microscopio electrónico de transmisión. Las inclusiones paraesporales (PB: *protein body*) son producidas al margen de la espora (SP). La célula mostrada presenta un tamaño de aproximadamente 2 μm de longitud (de Maagd *et al.*, 2001).

Es un microorganismo anaerobio facultativo, quimioorganótrofo y con actividad catalasa. Posee la capacidad de fermentar glucosa, fructosa, trealosa, maltosa, ribosa y de hidrolizar gelatina, almidón y glucógeno (Sauka *et al.*, 2008). Por otra parte, Bt es considerada una bacteria ubicua, ya que puede ser aislada de diversos ambientes tales como suelo, rizósfera, filoplano e insectos. (Raymond *et al.*, 2010; Schnepf *et al.*, 1998; Cinar *et al.*, 2008)

1.3. Inclusiones paraesporales

Las inclusiones paraesporales están formadas por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica denominadas Cry y Cyt (Cry, del inglés **C**ry**s**tal y Cyt del inglés **C**ytolitic), perteneciendo ambas al grupo de las δ -endotoxinas (Sauka *et al.*, 2008; Noguera *et al.*, 2010). Por un lado, las Cry presentan un efecto tóxico demostrado sobre el organismo blanco, mientras que las Cyt presentan actividad hemolítica (citolítica). Estas toxinas son altamente específicas para con el organismo blanco, pero al mismo tiempo inocuas para humanos, vertebrados y plantas (Velooralappil *et al.*, 2013). Adicionalmente, las proteínas Cyt presentan un efecto sinérgico con las Cry, lo que conduce a un aumento en la toxicidad hacia los insectos (Vachon *et al.*, 2012). Los cristales Cry están codificadas por los genes *cry* localizados mayoritariamente en megaplásmidos (Crickmore *et al.*, 1998).

1.3.1. Nomenclatura

En cuanto a su nomenclatura, las toxinas Cry pueden ser descritas en términos de su secuencia aminoacídica, estructura proteica o por su modo de acción (Crickmore *et al.*, 1998). Actualmente son clasificadas según la nomenclatura propuesta por Crickmore (1998) la cual se basa en la homología de la secuencia aminoacídica. Cada toxina adquiere un nombre que consiste del prefijo Cry, seguido por cuatro rangos jerárquicos, los cuales consisten en un número, una letra mayúscula, una letra minúscula y finalmente otro número (por ejemplo Cry25Aa1). Proteínas con menos de un 45% en la identidad de la secuencia aminoacídica difieren en el rango primario, con menos de un 78% en la identidad difieren en el rango secundario y finalmente con menos de un 95% de identidad difieren en el rango terciario (Roh *et al.*, 2007).

1.3.2. Especificidad

Las toxinas Cry presentan individualmente un espectro de acción acotado, usualmente restringido a pocas especies o hacia un orden en particular de insectos (Ben-Dov *et al.*, 1997). A modo de ejemplo, las proteínas dentro de los grupos Cry1, Cry2 y Cry9 son particularmente tóxicas para lepidópteros, Cry3, Cry7, y Cry8 para coleópteros y finalmente Cry2, Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19 son específicas para dípteros (Bravo *et al.*, 1998). Solamente unas pocas toxinas presentan un espectro que abarca 2 ó 3 órdenes de insectos, por ejemplo Cry2 siendo tóxica para lepidópteros y asimismo para dípteros (Roh *et al.*, 2007). Cada cepa de *Bacillus thuringiensis* puede sintetizar más de una toxina, por lo que la combinación de éstas define el espectro de acción de la cepa (Sanahuja *et al.*, 2011). Ese acotado espectro de acción le confiere gran especificidad y a su vez aporta seguridad en el momento de uso de las esporas de Bt.

Hasta la fecha se han caracterizado más de 500 proteínas Cry presentándose en diversas combinaciones en las diferentes cepas conocidas (Ruiz de Escudero *et al.*, 2004; Seifinejad *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2012).

1.3.3. Estructura de los cristales Cry

A pesar de la gran variabilidad entre las proteínas Cry existentes, todas comparten una estructura terciaria similar, lo que se corresponde con 5 regiones conservadas en la estructura primaria (De Maagd *et al.*, 2001; Sanahuja *et al.*, 2011). La región C-terminal está involucrada en el proceso de formación del cristal pero no forma parte de la toxina activa. Por otro lado, la porción N-terminal es la toxina en sí, comprendiendo 3 dominios (figura 2). El dominio I es un conjunto de siete α -hélices, en donde seis son anfipáticas y rodean a la séptima, la cual es hidrofóbica. El dominio II consiste de tres hojas β antiparalelas, y finalmente el dominio III es un sándwich de dos hojas β antiparalelas (Boonserm *et al.*, 2006).

INTRODUCCIÓN

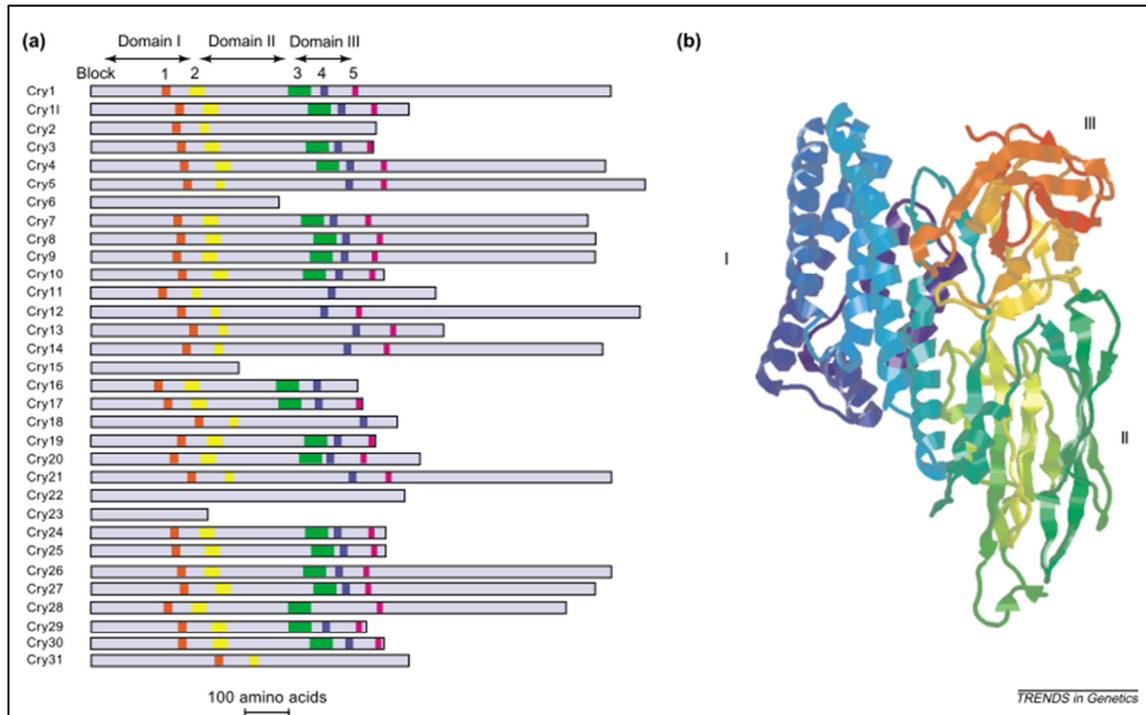


Figura 2. Estructura de los tres dominios conservados de los cristales proteicos. (a) Estructura primaria, mostrando la organización de los dominios. (b) Estructura terciaria conservada, mostrando la ubicación de los tres dominios (de Maagd *et al.*, 2001).

1.3.4. Modo de acción

Luego de varios años de investigación, en donde se analizaron intestinos de orugas alimentadas con comida contaminada con cristales, se arribó a un modelo que explicaría cómo actúan los cristales Cry. Una de las principales observaciones que se desprendieron de estos experimentos fue que existía una interrupción de las células epiteliales al poco tiempo de la ingestión de los cristales, evento seguido de un hinchamiento de las células y posterior lisis (Sanahuja *et al.*, 2011). Al mismo tiempo se descubrió que se debía contar con factores de activación de los cristales una vez ingresados al intestino. Luego de varios intentos, se llegó a la conclusión de que el pH alcalino y la presencia de proteasas específicas eran cruciales para la activación de las protoxinas (Sanahuja *et al.*, 2011). Por otro lado, se conocía que la actividad tóxica de los cristales estaba relacionada con los tres dominios conservados presentes en la estructura de éstos (Wu *et al.*, 2007).

En términos generales, el mecanismo de acción de los cristales involucra la ingestión de los mismos como protoxinas, la solubilización y proteólisis en el intestino

INTRODUCCIÓN

medio, la unión a receptores específicos presentes en las células epiteliales, inserción de la toxina en la membrana y finalmente la formación de poros (Hofmann *et al.*, 1988). Es por esta razón que las proteínas Cry, al igual que las Cyt, pertenecen a la clase de toxinas bacterianas conocidas como *pore-forming toxins* (PFT). Estos poros son permeables a moléculas pequeñas, tales como iones inorgánicos, aminoácidos y azúcares (Carroll & Ellar, 1993; Kirouac *et al.*, 2002; Vachon *et al.*, 2012). El ingreso de estas moléculas junto con todo el contenido intestinal, incluyendo las esporas, trae como consecuencia la muerte del insecto.

Las inclusiones cristalinas de aproximadamente 130 KDa ingeridas por las larvas son primeramente disueltas en el ambiente alcalino del intestino (etapa **a** de la figura 3). Distintos grados de solubilización están asociados con las diferencias de toxicidad entre los diferentes cristales hacia los insectos (Aronson *et al.*, 1991; Du *et al.*, 1994). La protoxina inactiva solubilizada es clivada por las proteasas intestinales (etapa **b** de figura 2) dando como resultado una proteína tóxica de aproximadamente 60-70 KDa (Bravo *et al.*, 2008). La activación de la toxina implica la eliminación del extremo C-terminal (región de color violeta en figura 3) así como también un pequeño péptido del extremo N-terminal (estructura de color amarillo en figura 3). La longitud de dicho péptido puede variar entre 25 a 60 aminoácidos dependiendo del Cry en cuestión. Posteriormente, la toxina activada resultante se une a los receptores en la membrana de las células epiteliales (figura 3, etapa **c**), proceso en el cual el dominio II y III están involucrados. En la etapa **d** se puede observar un cambio estructural del dominio I el cual permite que una horquilla de dos α -hélices se introduzca en la membrana. Dicha inserción de la toxina lleva a la formación de poros en la membrana de las células epiteliales (etapa **e** de la figura 3), finalmente produciendo la lisis celular y disrupción del epitelio intestinal provocando la liberación de los contenidos celulares. (Aronson *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2005).

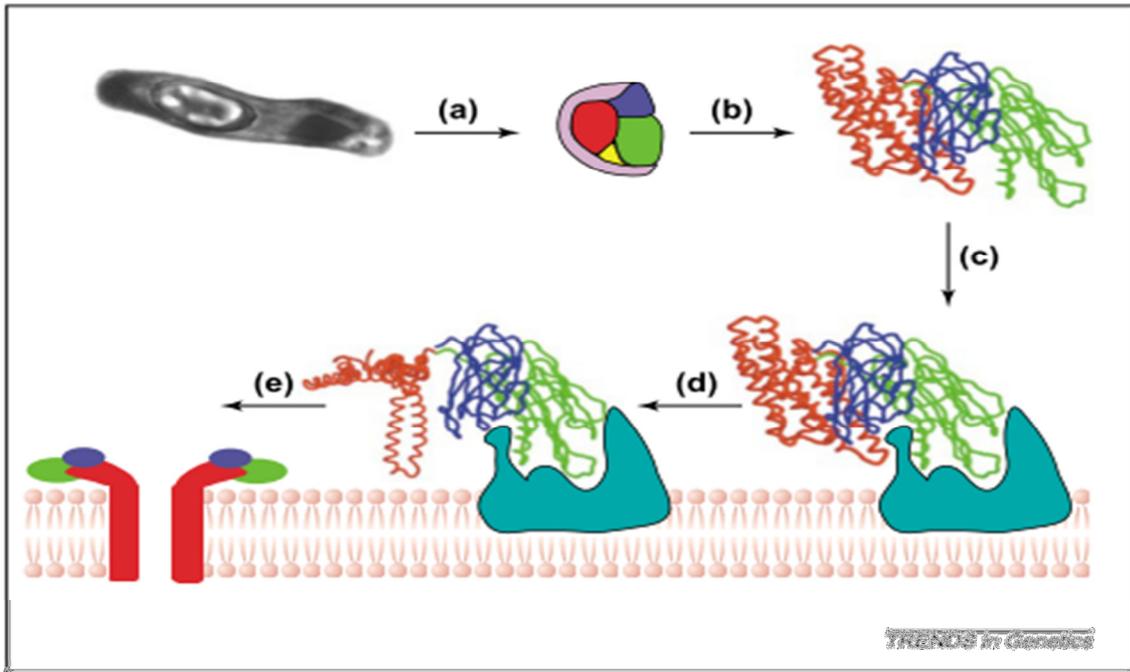


Figura 3. Esquema representativo del modo de acción de las toxinas Cry (de Maagd *et al.*, 2001).

Paralelamente al proceso descrito anteriormente, una vez en el intestino del insecto, las esporas son capaces de germinar generando la producción de otros factores de virulencia (Salamitou *et al.*, 2000; Du & Nickerson, 1996) que le permiten a Bt infectar a sus blancos con mayor eficiencia. Por ejemplo, ciertas cepas producen compuestos extracelulares como fosfolipasas, β -exotoxinas, proteasas, quitinasas y proteínas VIP (*vegetative insecticidal proteins*) (Zhang *et al.*, 1993; Estruch *et al.*, 1996). También se han reportado compuestos con actividad anti-fúngica (Stabb *et al.*, 1994). A pesar de todos estos compuestos extracelulares liberados, las toxinas Cry son las más efectivas en cuanto a toxicidad (Schnepf *et al.*, 1998).

1.4. Identificación de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis, con un genoma cuyo tamaño varía de 2.4 a 5.7 Mb (Carlson *et al.*, 1994), se encuentra clasificado dentro del grupo denominado *Bacillus cereus sensu lato*, el cual está compuesto por siete miembros: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis*,

INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis (Kuwana *et al.*, 2012) y el recientemente incorporado *Bacillus gaemokensis* (Jung *et al.*, 2010). Algunos autores (Ash *et al.*, 1991; Carlson *et al.*, 1994) sugieren que las especies constituyentes de dicho grupo deben considerarse una única especie debido al alto grado de similitud de sus genomas.

Adicionalmente, *Bacillus thuringiensis* se clasifica en 84 serovares mediante serología del antígeno flagelar H. Mediante diferentes experimentos se intentó establecer relaciones entre los serovares y su actividad insecticida o la presencia de algún tipo de cristal en particular, pero no se tuvo éxito por lo que su significado biológico aún no está claro (Sauka & Benintende, 2008; Nakamura, 1994).

A lo largo del tiempo se han implementado diversos métodos para diferenciar *Bacillus thuringiensis* de *Bacillus cereus*. En uno de los primeros métodos propuesto por Baumann y col (1984) se intentó discriminar entre estas dos especies basados en la capacidad de degradar diferentes compuestos orgánicos. Los resultados obtenidos en este ensayo fueron poco útiles para la diferenciación entre las dos especies ya que éstas presentaron un perfil prácticamente idéntico. Otros autores (Niskanen *et al.*, 1978; Black *et al.*, 1997) han estudiado el perfil de ácidos grasos entre ambas especies de manera de poder diferenciarlas. Al igual que Baumann y col. (1984) se obtuvieron perfiles prácticamente idénticos, por lo que dicha técnica no fue útil.

Debido a que las técnicas anteriormente mencionadas no fueron capaces de diferenciar las dos especies, se implementaron técnicas de biología molecular. La utilización de la secuencia del gen de ARNr 16S, comúnmente utilizada para la identificación de microorganismos, tampoco permitió discriminar entre ambas especies debido a que éstas presentan un alto grado de similitud en dicho gen; únicamente se diferencian en unos pocos nucleótidos (Ash *et al.*, 1991). Por lo tanto, dado que la utilización de la secuenciación del gen de ARNr 16S solamente permite la identificación de estos microorganismos a nivel de género (*Bacillus*) y no al nivel de especie, se han implementado métodos de *fingerprinting* (Freitas *et al.*, 2008). Dentro de estos métodos se encuentran aquellos en los cuales se secuencian varios genes, como por ejemplo *Multilocus Sequence Typing* (MLST), (Hoffmaster *et al.*, 2008). Por otro lado, otros métodos utilizados son *Ribosomal DNA Restriction Fragment Length*

INTRODUCCIÓN

polymorphism (RFLP) (Priest *et al.*, 1994), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) y Rep-PCR, *Repetitive Extragenic Palindromic Sequence* (Freitas *et al.*, 2008; Reyes-Ramirez *et al.*, 2005). En el presente trabajo se optó por utilizar este último método de *fingerprinting*, debido a que es una técnica sencilla y al mismo tiempo los autores que la emplearon obtuvieron excelentes resultados (Freitas *et al.*, 2008; Reyes-Ramirez *et al.*, 2005).

Rep-PCR es una técnica de *fingerprinting* originalmente basada en el diseño de *primers* para secuencias REP encontradas en los genomas de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (Versalovic *et al.*, 1994). Los amplicones obtenidos a partir de secuencias REP contiguas generan un patrón de bandas característico para cada cepa (figura 4). La presencia de secuencias REP en procariontas es común y han sido utilizadas para el diseño de *primers* especie-específicos o grupo-específicos. Se han encontrado secuencias REP de 26 pares de bases que son comunes a los siete miembros del grupo de *Bacillus cereus sensu lato* (Reyes-Ramirez *et al.*, 2005). Estas secuencias REP (Bc-REP) permitieron el diseño de 2 *primers* específicos para el grupo anteriormente mencionado. Su especificidad fue corroborada en una cepa de *Bacillus subtilis*, la cual mostró bandas muy tenues y un patrón indefinido, el cual puede ser causado por la homología parcial con las secuencias REP del grupo de *Bacillus cereus sensu lato* (Reyes-Ramirez *et al.*, 2005).

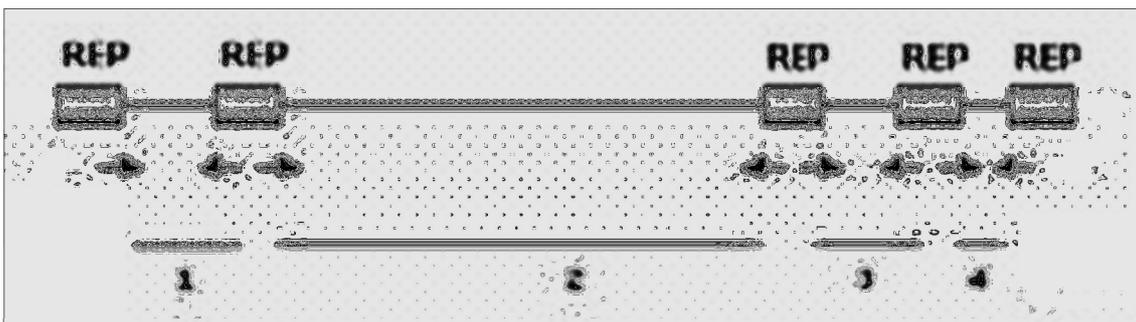


Figura 4. Esquema representativo de Rep-PCR, en donde se puede ver la posición de las secuencias REP en el genoma. Las flechas indican los *primers* que hibridan con dichas secuencias y las líneas con números los amplicones que se obtendrían a partir de secuencias REP contiguas.

Otra metodología desarrollada para la identificación de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis* se basa en la utilización de tres *sets* de *primers* dirigidos a los bloques conservados dentro de los genes Cry representados en la figura 2 (Noguera &

INTRODUCCIÓN

Ibarra, 2010). Dichos *primers* fueron diseñados para cuatro de esos cinco bloques conservados; el *set* de *primers* 1 amplificaría las regiones comprendidas entre el block 1 y 5, el *set* 2 la región entre el block 2 y 5 y finalmente el *set* 3 la región entre 1 y 4. Según el análisis *in silico*, el 100% de las secuencias de genes *cry* podrían ser amplificadas por estos *sets* de *primers* (Noguera & Ibarra, 2010).

En el presente trabajo nos enfocamos en el aislamiento de cepas nativas de Bt y su caracterización fenotípica y molecular con miras al desarrollo de un biopesticida. Para ello se aislaron 65 cepas de diferentes ecosistemas, las cuales se caracterizaron fenotípicamente y mediante técnicas de biología molecular utilizando el sistema de *primers* descrito por Noguera e Ibarra (2010), la secuencia del gen de ARNr 16S y Rep-PCR. Se lograron identificar 2 cepas de Bt y 2 como presuntas Bt las cuales se continuarán caracterizando.

2. OBJETIVOS DE TRABAJO

2.1. Objetivo general

Este trabajo tuvo como principal objetivo el aislamiento y caracterización fenotípica, bioquímica y molecular de cepas autóctonas de *Bacillus thuringiensis*, las cuales serían empleadas para el desarrollo de un bioinsecticida de uso agrícola.

2.2. Objetivos específicos

- Aislamiento e identificación fenotípica y bioquímica de cepas autóctonas potenciales *Bacillus thuringiensis*.
- Desarrollo de un sistema basado en amplificación de genes *cry* por PCR para la rápida detección de cepas de Bt.
- Caracterización molecular de cepas potenciales de Bt: secuenciación del gen de ARNr 16S y perfiles REP.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Recolección de muestras

La toma de muestras se realizó de diferentes ecosistemas tales como suelos con cultivo de soja, maíz, sorgo, avena, hojas de maíz y soja, entre otros. En la tabla 1 se pueden observar los detalles de cada una de estas muestras mientras que en la figura 5 se representan las diferentes áreas geográficas de las cuales se obtuvieron. Las muestras de suelo fueron extraídas con espátula a no más de 10 cm de profundidad (Cinar *et al.*, 2008). Una vez recibidas, fueron almacenadas a 4°C hasta su análisis. La numeración utilizada en la tabla 1 para cada muestra fue asignada de acuerdo al orden de llegada al laboratorio. De acuerdo a dicha tabla, de las 51 muestras recibidas pertenecientes a distintos cultivos, 28 fueron de suelo, mientras que 23 de hojas.

Tabla 1. Detalle de cada una de las muestras recolectadas.

Nº de muestra	Tipo	Cultivo	Ubicación geográfica
1	Suelo	Soja	-
2	Suelo	Soja	-
3	Hojas	Tomate orgánico	San Jacinto
4	Hojas	Tomate	Las Brujas
5	Hojas	Soja	-
6	Suelo	Soja	-
7	Hojas	Sorgo granífero	Sauce
8	Hojas	Sorgo	San José
9	Hojas	Maíz	Ruta 12 km 66
10	Suelo	-	Ruta 5 km 32
11	Suelo	-	Ruta 12 km 48
12	Suelo	Sorgo	San Carlos
13	Hojas	Avena	Ruta 1 km 22
14	Suelo	Invernáculo 1	Rio Negro

MATERIALES Y MÉTODOS

15	Suelo	-	Nueva Helvecia
16	Suelo	Rastrojo Soja	Ruta 96 km 50
17	Hojas	Lotus	Ruta 21
18	Suelo	Invernáculo 2	Rio Negro
19	Suelo	Alfalfa	-
20	Suelo	-	-
21	Suelo	Colza	-
22	Suelo	Soja	-
23	Hojas	Soja	Bañado de Medina
24	Suelo	Campo natural	Young
25	Suelo	Rastrojo Maíz	Ruta 5 km 305
26	Suelo	Pradera	Young
27	Hojas	Pasto	Young
28	Hojas	Lotus	Ruta 60 km 40
29	Hojas	MioMio	-
30	Hojas	Avena	-
31	Suelo	Trigo	La Torcaza
32	Suelo	Rastrojo Sorgo	La Torcaza
33	Suelo	-	El Aguará
34	Suelo	Rastrojo Soja	Ruta 96 km 40
35	Suelo	Rastrojo Maíz	Ruta 54 y 12
36	Hojas	Raigras	Ruta 3 km 290
37	Suelo	Campo natural 1	Minas
38	Suelo	Campo natural 2	Minas
39	Suelo	Campo natural 3	Minas
40	Hojas	Soja	-
41	Hojas	Soja	Ruta 3 km 170
42	Hojas	Soja	-
43	Hojas	Soja	-
44	Hojas	Soja	San Jacinto
45	Hojas	Soja	San Jacinto

MATERIALES Y MÉTODOS

46	Hojas	Soja	-
47	Hojas	Soja	San Jacinto
48	Hojas	Soja	-
49	Suelo	Soja	San Jacinto
50	Suelo	Soja	Carlos Palma
51	Suelo	Maíz	Polanco

(-) No fue posible determinar la ubicación geográfica de las muestras. Los invernáculos 1 y 2 (muestra 14 y 18, respectivamente) presentaban cultivos de *Eucaliptus*.



Figura 5. Ubicación geográfica de algunas de las muestras recolectadas.

3.2. Aislamiento de cepas

La metodología utilizada para el aislamiento fue la propuesta por Travers y col. (1987) la cual se basa en la inhibición de la germinación de esporas de Bt con acetato. Se suspendió un gramo de suelo en 10 ml de medio Luria Bertari (LB) suplementado con 0,25 M de acetato de sodio pH 6.8 (ver composición del medio en apéndice) y se

agitó durante 4 horas a 250 rpm a 30 °C. Mediante este procedimiento se logra inhibir la germinación de esporas de Bt mientras que otras bacterias esporuladas presentes en la muestra germinan pasando al estado vegetativo. Posteriormente se realizó un shock térmico, sometiendo la muestra a 80°C durante 10 minutos y enfriando posteriormente 10 minutos a 0°C. De este modo se eliminan la mayoría de los microorganismos que se encuentren en su estado vegetativo, quedando viables principalmente las esporas de Bt. Al tubo conteniendo la muestra de suelo se lo denominó dilución -1; a partir de éste se realizó una dilución al décimo de la mezcla, denominándose dilución -2. Finalmente 100 µl de la dilución -1 y de la dilución -2 fueron sembrados en superficie en placas con LB-agar e incubadas a 28 °C durante 24 horas. Posteriormente, las colonias morfológicamente similares a *Bacillus thuringiensis* fueron aisladas nuevamente en medio LB-agar.

Para la nomenclatura de los aislamientos se utilizó el siguiente formato: número, punto, número; en donde el primer número indica la muestra de la cual proviene, mientras que el segundo representa qué número de colonia (tipo *Bacillus thuringiensis*) era en la placa de la cual se aisló. A modo de ejemplo, el aislamiento 14.3 provino de la muestra 14 y fue el tercer tipo de colonia encontrado en la placa.

3.3. Cepas de referencia

Con el objetivo de poner a punto cada una de las técnicas utilizadas se obtuvieron cepas de referencia aportadas gentilmente por diferentes instituciones. Las cepas *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* y *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* HD-1 fueron enviadas por el Dr. Jorge. E. Ibarra del Cinvestav, México, absorbidas en tiras de papel. Las mismas fueron asépticamente colocadas sobre medio LB-agar y presionadas de manera que permanezcan en estrecho contacto con el medio. Dichas placas se incubaron a 28°C durante 24 – 30 horas. A partir de las colonias obtenidas se realizaron aislamientos en nuevas placas de medio LB-agar de manera de obtener un respaldo de las cepas. De igual manera, se las conservó a -20°C con glicerol estéril 50%. Por otra parte, la cepa perteneciente a la especie *Bacillus cereus* fue aportada por la

Cátedra de Microbiología de Facultad de Química. Esta última fue utilizada como control negativo en cada una de las metodologías utilizadas.

3.4. Identificación fenotípica de cepas

Para la identificación de los aislamientos se realizó tinción de Gram y detección de la enzima α -amilasa, la cual está presente en todos los miembros del grupo *Bacillus cereus sensu lato*

3.4.1. Tinción de Gram

A partir de una colonia aislada en medio LB-agar (cultivo de 24 horas) se tomó con un ansa estéril una pequeña cantidad de ésta y se la colocó sobre un portaobjetos. Luego, con una pequeña gota de agua estéril se la diluyó y se procedió a secarla colocando el portaobjetos sobre la llama del mechero. De manera de fijar la muestra, se pasó el portaobjetos tres veces a través de la llama. Posteriormente, se procedió a la tinción; para ello en una primera instancia la muestra se tiñó con cristal violeta durante 1 minuto y se enjuagó con agua para quitar el exceso de colorante. Luego, se tiñó con Lugol durante 1 minuto de manera de fijar el colorante y se enjuagó con agua para quitar el exceso de éste. Posteriormente, se hicieron lavados con etanol 95% para quitar el colorante que no hubiera ingresado a las células. Finalmente, la muestra se tiñó con Safranina durante 10 segundos y nuevamente se enjuagó con agua para quitar el exceso de colorante. Una vez finalizada la tinción se secó al calor de mechero y se observó al microscopio óptico con un aumento de 100x en aceite de inmersión.

3.4.2. Detección de enzima α -amilasa

Basados en el principio de que el yodo se intercala entre las hélices de la estructura del almidón formando un complejo de color oscuro, se realizó la prueba de hidrólisis del almidón. Con esta prueba se detecta la presencia de la enzima α -amilasa, encargada de degradar el almidón, la cual está presente en *Bacillus thuringiensis*. Si se está en presencia de dicha enzima, el almidón será hidrolizado perdiendo su estructura de hélice. Este hecho provoca que el yodo no pueda formar el complejo mencionado

anteriormente y por lo tanto se observará una zona clara alrededor del crecimiento del microorganismo.

Para realizar esta prueba se realizó un estriado del aislamiento en estudio sobre medio Müller-Hinton (preparado según instrucciones de fabricante). Luego de transcurridas 24 horas de incubación a 28 °C se procedió al revelado con Lugol.

3.5. Puesta a punto de un método para la detección de genes *cry*

Para el desarrollo de un método molecular simple y rápido de detección de *Bacillus thuringiensis* a partir de muestras ambientales se utilizaron 3 sets de *primers*, los cuales según Noguera e Ibarra (2010) en su totalidad estarían detectando el 100% de los genes *cry* (Tabla 2). El método descrito por dichos autores se adaptó para la detección de Bt ya que fue desarrollado para la detección de nuevos genes *cry* en cepas de *Bacillus thuringiensis*.

En primera instancia se pusieron a punto la condiciones de reacción de PCR para la detección de genes *cry* utilizando ADN plasmídico de las cepas de referencia, extraído por Natalia Scioscia mediante el protocolo descrito por Reyes-Ramirez e Ibarra (2008), de ahora en más denominada “Extracción de esferoplastos”. Basados en las condiciones de reacción (concentración de ADN, concentración de *primers* y temperatura de *annealing*) establecidas por Noguera e Ibarra (2010) se estudiaron variaciones en éstas de manera de lograr los mejores productos de amplificación. Para ello se evaluaron variaciones en la concentración de ADN (dilución 1/100 y 1/10), de *primers* (0,4, 0,6 y 0,8 µM) y en el caso del set 1 diferentes temperaturas de *annealing* (50 y 53 °C). Para el set 1, se utilizó la cepa de referencia *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti), mientras que para el set 2 se utilizó la cepa *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* (Btk).

Posteriormente, se puso a punto una metodología de extracción de ADN que permitiera procesar los aislamientos obtenidos de forma rápida, ya que la extracción

de esferoplastos mencionada anteriormente y los protocolos descritos en la bibliografía (Noguera & Ibarra, 2010) requerían gran cantidad de tiempo. Para ello se tomó, con la punta de un tip estéril y a partir de estriado fresco del cultivo en medio LB-agar, un conjunto de células (aproximadamente una sección de 0.5 x 0.5 cm²) y se las resuspendió en 100 µl de agua ultrapura. Dichas células fueron sometidas a 100°C durante 10 minutos en termoblock, provocando así la lisis celular. Se evaluó un paso posterior de centrifugación, con el objetivo de determinar si los restos celulares procedentes del lisado afectaban las reacciones de PCR a realizarse. De aquí en adelante, esta metodología de extracción de ADN se denominará “*colony*”.

Finalmente, para determinar si se obtenían los mismos productos de amplificación cuando se utilizaba ADN plasmídico proveniente de esferoplastos y ADN proveniente de *colony*, se realizaron reacciones de PCR utilizando el *set* de *primers* 1 y la cepa de referencia Bti.

Tabla 2. Secuencia de *primers* utilizados en cada uno de los *sets*.

<i>Set</i>	<i>Primer</i>	Secuencia (5´-3´)	<i>T_m</i> (°C)
1	1 5	TATGCWCAAGCWGCCAATYTWCATYT GGRATAAATTCAATTYKRTCWA	50
2	2 5	TTTAGATATTGTTGCAWTATKKYC GGRATAAATTCAATTYKRTCWA	56
3	1 4	TATGCWCAAGCWGCCAATYTWCATYT CATAACGTAGWYTTAYCTKAWT	48

Letras W indica que puede ser la base A o T, mientras que Y indica que puede ser C o G.

Se utilizó el siguiente programa de temperaturas: un primer paso de desnaturalización a 94 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización (94 °C por 1 minuto), hibridación (2 minutos) y extensión (72 °C por 1.5 minutos). Por último se realizó una etapa de extensión a 72 °C por 7 minutos. Las temperaturas de hibridación difieren según el *set* de *primers* utilizado: para el *set* 1 fue de 50 °C, para el *set* 2 56 °C y para el *set* 3 48 °C.

Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl conteniendo: 2.5 µl de *buffer* de PCR 10x (suministrado con la Taq), 2.5 µl de mix de dNTPs (2.0 mM), 1.5 µl de cada *primer* (10 µM), 4.0 µl de MgCl₂ (25 mM), 0.5 µl de Taq

polimerasa 5,0 U/ μ l (Fermentas) y 5 μ l de lisado obtenido mediante *colony* o 1 μ l de ADN obtenido mediante esferoplastos.

Luego de la puesta a punto de la metodología se realizó el procesamiento de todos los aislamientos, con los tres *sets* de *primers*.

3.6. Caracterización Molecular

3.6.1. Amplificación del gen ARNr 16S

Paralelamente a la detección de genes *cry* se realizó la amplificación del gen de ARNr 16S con el objetivo de determinar si los aislamientos pertenecían al grupo *Bacillus cereus sensu lato* y al mismo tiempo determinar si el lisado celular de cada uno de éstos, obtenido mediante la metodología de *colony*, estaba en condiciones de ser amplificado. De esta manera, podríamos decir que si un aislamiento presenta resultados negativos con los *sets* de *primers* es por no contener genes *cry* y no debido a que el lisado celular presenta inhibidores de la reacción de PCR. Para ello se utilizaron *primers* universales para el Dominio Bacteria (tabla 3) complementarios a secuencias conservadas ubicadas en los extremos 5' y 3' del gen (Eden *et al.*, 1991).

Tabla 3. Secuencia de *primers* utilizados para la amplificación del gen de ARNr 16S.

<i>Primer</i>	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Tamaño esperado de amplicón (pb)
Forward	Eub27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500
Reverse	U1492R	GGTACCTGTTACGACT	

Todas las reacciones de PCR para la amplificación del gen de ARNr 16S se realizaron en un volumen final de 25 μ l conteniendo: 2.5 μ l de *buffer* de PCR 10X (suministrado con la Taq), 2.5 μ l de mix de dNTPs (2.0 mM), 1.0 μ l de cada primer (10 μ M), 2.5 μ l de MgCl₂ (25 mM), 0.5 μ l de Taq polimerasa 5,0 U/ μ l (fermentas) y 5 μ l de lisado.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador *Little Genius, Bioer* y se utilizó el siguiente programa de temperaturas: un primer paso de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización (94°C por 30 seg), hibridación (55°C por 30 segundos) y extensión (72°C por 2 minutos). Por último se realizó una etapa de extensión a 72°C por 7 minutos.

Se verificó el tamaño del producto de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa 1,0 % en *buffer* TAE 1X y tinción con *GoodView Sbs* a razón de 0.036 µl/ml, utilizando como marcador de peso molecular *HyperLadder I* de *Bioline*.

3.6.2. Secuenciación y construcción de árbol filogenético

Con el objetivo de determinar la identidad de los amplicones obtenidos mediante las reacciones de PCR y conocer si los aislamientos pertenecían al grupo de *Bacillus cereus sensu lato*, se secuenciaron los productos de amplificación. Para ello se concentraron y purificaron las bandas obtenidas en la amplificación del gen de ARNr 16S y las bandas obtenidas con las cepas de referencia utilizando los sistemas *cry*, utilizando *Zymoclean Gel DNA Recovery kit* y *DNA Clean & Concentrator -5Kit* ZYMO RESEARCH, respectivamente. Posteriormente los productos purificados fueron enviados a secuenciar al Instituto Pasteur de Montevideo. Una vez recibidas las secuencias, se compararon mediante el algoritmo BLASTn con secuencias depositadas en la base de datos *GenBank* (NCBI) y para las secuencias del gen de ARNr 16S se construyó un árbol filogenético.

Para la construcción del árbol a partir de las secuencias del gen de ARNr 16S se utilizó el programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versión 5.2. Para ello se descargaron secuencias depositadas en la base de datos RPD (*Ribosomal Data Project*) y se alinearon empleando el multiprocesador *Muscle* junto con las secuencias obtenidas del gen de ARNr 16S, editadas previamente. Para la construcción del árbol se aplicó el test *Neighbor-Joining Tree* y el método de *Bootstrap*, con un número de

replicaciones de 1000. Como grupo externo se utilizó *Geobacillus stearotherophilus* (Jung *et al.*, 2010).

3.6.3. Perfil Rep

Se estudiaron los perfiles Rep de los aislamientos que pertenecían al grupo *Bacillus cereus sensu lato*. Esta técnica permite determinar la similitud genómica de los aislamientos, pudiendo así diferenciarlos. Para ello se utilizó un par de *primers* específicos para dicho grupo (Reyes-Ramirez *et al.*, 2005), en donde cada miembro de este grupo presenta un perfil Rep característico. La secuencia de los *primers* se detalla en la tabla 4.

La extracción de ADN en este caso se realizó mediante la utilización del kit *DNA Blood & Tissue kit QUIAGEN*, siguiendo las instrucciones de fabricante. Finalmente, una alícuota de 5 µl del ADN extraído fue utilizada para corroborar el producto de extracción mediante un gel de agarosa al 1% en TAE 1X.

Tabla 4. Secuencia de *primers* utilizados para la amplificación de secuencias REP.

<i>Primer</i>	Nombre	Secuencia (5' - 3')	T _m (°C)
Forward	Bc-REP-1	ATTAAAGTTTCACTTTAT	42
Reverse	Bc-REP-2	TTTAATCAGTGGGG	

Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl conteniendo: 2.5 µl de *buffer* de PCR 10X (suministrado con la Taq), 2.5 µl de mix de dNTPs (2.0 mM), 5.5 µl del *primer Forward* y 2.3 µl del *primer Reverse* (10 µM), 0.5 µl de *DreamTaq* polimerasa 5,0 U/µl (fermentas) y 2 µl de ADN.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador *Little Genius, Bioer* y se utilizó el siguiente programa de temperaturas: un primer paso de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguida de 34 ciclos de desnaturalización (94°C por 1 minuto), hibridación (42°C por 1 minuto) y extensión (72°C por 1.5 minutos). Por último se realizó una etapa de extensión a 72°C por 7 minutos.

3.7. Observación de Cristales

A partir de los aislamientos los cuales según el estudio filogenético se encontraban dentro del grupo *Bacillus cereus sensu lato* se realizó la observación de cristales. Para ello, a partir de un cultivo esporulado crecido en medio líquido T3 (ver composición en apéndice) a 200 rpm durante 7 días se tomó una muestra y se la observó en microscopio óptico (Nikon Eclipse 100) de contraste de fases con un aumento de 100x en aceite de inmersión.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento e identificación fenotípica de cepas

A partir de las 51 muestras se obtuvieron 65 aislamientos, de los cuales 50 provinieron de muestras de suelo, mientras que los 15 restantes de hojas.

4.1.1. Tinción de Gram

De esos 65, 13 resultaron bacilos Gram negativos, y los 52 restantes bacilos Gram positivos. A partir de este resultado ya se puede deducir que la metodología propuesta por Travers no es totalmente efectiva, ya que se encontraron microorganismos los cuales no conciben con las características típicas de Bt. En la figura 6 se observa un ejemplo de tinción de Gram correspondiente al aislamiento 33.3.

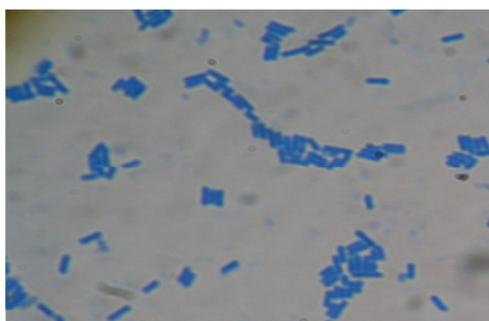


Figura 6. Fotografía correspondiente a la tinción de Gram del aislamiento 33.3 observado al microscopio óptico con un aumento de 100x en aceite de inmersión.

4.1.2. Hidrólisis de Almidón

Luego de obtenidos los aislamientos bacilos Gram positivos, se procedió a realizar la detección de la enzima α -amilasa sobre medio Müller-Hinton (ver composición en apéndice).

De los 52 aislamientos bacilos Gram positivos, 30 resultaron positivos en la hidrólisis de almidón, lo que indicaría la presencia de la enzima α -amilasa. A modo de ejemplo, en la figura 7 se observan los aislamientos 14.1, 17.2, 18.1 y el control positivo Bti crecidos sobre placa con medio Müller-Hinton revelada con Lugol. Se puede observar notoriamente en dicha figura la zona clara alrededor del crecimiento celular, producto de la no formación del complejo entre el yodo con las estructura del almidón.

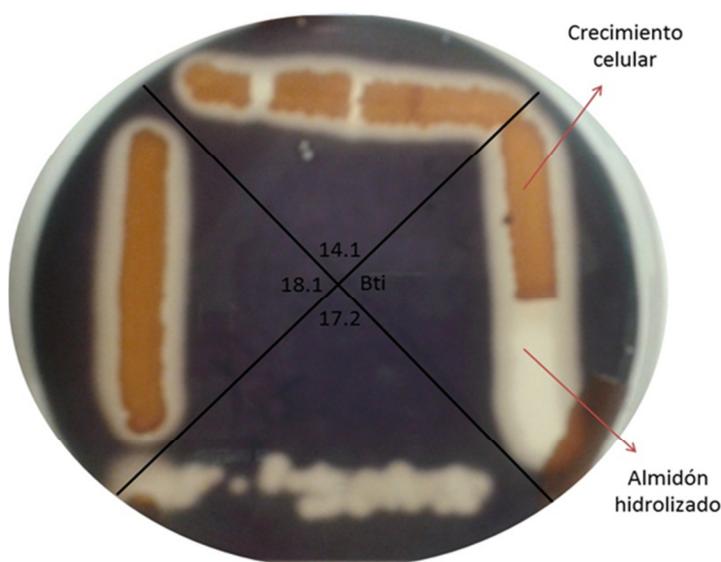


Figura 7. Placa de medio Müller-Hinton revelada con Lugol. Se representan 3 aislamientos (14.1, 17.2 y 18.1) y control positivo Bti.

4.2. Desarrollo de un método para la detección de genes *cry* mediante PCR

Para el desarrollo de un método molecular simple y rápido de detección de *Bacillus thuringiensis* a partir de muestras ambientales se utilizaron 3 sets de *primers*, los cuales según Noguera e Ibarra (2010) en su totalidad estarían detectando el 100% de los genes *cry*.

4.2.1. Puesta a punto de las condiciones de reacción

En primera instancia, utilizando las cepas de referencia, se pusieron a punto las condiciones de amplificación tomando como base las descritas por Noguera e Ibarra (2010). Para ello se evaluaron diferentes factores como la temperatura de *annealing*, diferentes concentraciones de ADN y de *primers*. En el caso de la temperatura de *annealing* para el *set 1* se evaluó aumentar la misma de 50 °C a 53 °C de manera de evitar la aparición de bandas inespecíficas. En el caso de los *primers* se evaluó disminuir a 0,4 µM y aumentar a 0,8 µM la concentración, tratando de determinar si se encontraban diferencias en la intensidad de las bandas observadas cuando se utilizaba 0,6 µM, concentración empleada por los autores (Noguera & Ibarra, 2010). Finalmente, se definió utilizar las temperaturas de *annealing* (50 °C) y las concentraciones de *primers* (0,6 µM) definidas por ellos. Esto es debido a que al evaluar modificaciones en dichos parámetros, no se observaron cambios ni en el número de bandas obtenidas ni en la intensidad de las mismas, si las comparábamos con las que obteníamos utilizando las condiciones definidas por Noguera e Ibarra (2010). En cuanto a las diferentes diluciones de ADN evaluadas (1/10 y 1/100) no se observaron diferencias en los amplicones obtenidos, por lo que en el caso de utilización de ADN proveniente de la extracción de esferoplastos se utilizaría 1 µl de la dilución 1/100.

Una vez definidos los factores anteriormente mencionados, se evaluó si la reacción de *colony* PCR lograba los mismos productos de amplificación que la PCR cuando se utilizaba ADN extraído mediante la metodología de los esferoplastos. Como se puede ver en la figura 8, mediante *colony* PCR se obtuvieron dos bandas, una de aproximadamente 1500 pb mientras que la otra de 500 pb. Es claro que en la reacción de PCR en donde se utilizó ADN extraído mediante la metodología de los esferoplastos se obtuvieron, además de las dos bandas obtenidas con *colony*, tres bandas más pero de menor intensidad.. Las dos bandas (1500 y 500 pb) se secuenciaron y se alinearon con secuencias depositadas en la bases de datos mediante el algoritmo BLASTn. Los resultados obtenidos indican que la banda de 1500 pb (figura 8) se corresponde en un 99% de identidad con el gen que codifica para la proteína CRY4A, mientras que la de 500 pb se corresponde con secuencias presentes en el genoma de Bti, lo que

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

significaría que es una banda inespecífica. Por lo tanto, considerando que la banda de importancia es la observada a 1500 pb, se consideró válida la metodología de *colony* PCR.

Luego de comprobar que a partir de *colony* se obtenía la banda de 1500 pb, se evaluó si una etapa de centrifugación previa a la reacción de PCR mejoraba los productos de amplificación. En la figura 9 se pueden observar los productos de las reacciones de PCR con y sin un paso previo de centrifugación, carril 2 y 1, respectivamente. De dicha figura se desprende que independientemente del centrifugado del lisado celular, la intensidad y la cantidad de bandas observadas no se modifica. Por lo tanto, teniendo en cuenta este resultado se optó por no incluir el centrifugado, de manera de simplificar el procedimiento.

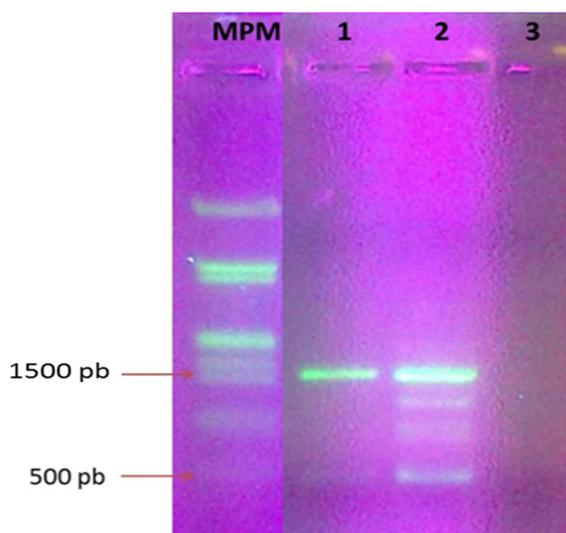


Figura 8. Gel agarosa 1% en TAE 1x. Productos de PCR obtenidos con el set de *primers* 1 comparando las dos metodologías. MPM λ EcoRI/Hind III. Carril 1: Bti con *colony* PCR. Carril 2: Bti con PCR a partir de la extracción de esferoplastos. Carril 3: control negativo.

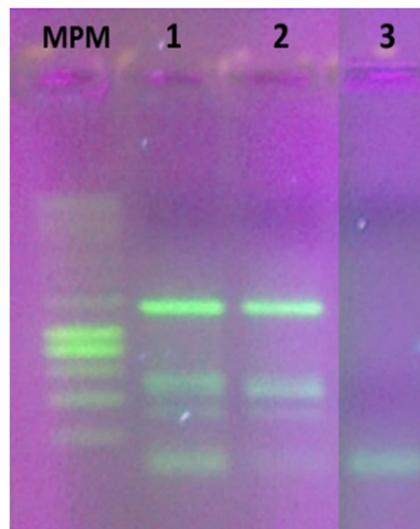


Figura 9. Gel agarosa 1% en TAE 1x. Productos de PCR obtenidos con el set de *primers* 1. MPM λ EcoRI/Hind III. Carril 1: *colony* PCR sin centrifugado previo. Carril 2: *colony* PCR con centrifugado previo. Carril 3: control negativo.

4.2.2. Análisis de los aislamientos con los *sets* de *primers*

Una vez que la *colony* PCR fue puesta a punto, se procedió al procesamiento de los 30 aislamientos que hubieran resultado positivos para la hidrólisis del almidón. Para ello, a cada uno se le extrajo el ADN mediante la metodología de *colony* y posteriormente se llevaron a cabo las reacciones de PCR con los 3 *sets* de *primers*. Los resultados se observan en la tabla 5. De los 30 aislamientos, 8 presentaron productos de amplificación con alguno de los 3 *sets* de *primers*, indicando la probable presencia de genes *cry* en los mismos. Con el *set* 1 solamente mostraron resultados positivos 14.1 y 18.1, mientras que con el *set* 2 además de los mencionados anteriormente también amplificó el aislamiento 33.4. Finalmente con el *set* 3 los aislamientos 17.2, 18.1, 33.3, 39.1 y 43.1 fueron los que mostraron resultados positivos.

Tabla 5. Resultados de las reacciones de *colony* PCR para cada uno de los aislamientos. El signo (+) significa que se obtuvieron productos de amplificación, mientras que el signo (-) representa la ausencia de productos de amplificación.

Aislamiento	Set 1	Set 2	Set 3	Aislamiento	Set 1	Set 2	Set 3
Btk	-	+	+	33.3	-	-	+
Bti	+	+	+	33.4	-	+	-
Bc	-	-	-	34.2	-	-	+
1.1	-	-	-	36.2	-	-	-
1.2	-	-	-	36.3	-	-	-
2.1	-	-	-	37.1	-	-	-
2.2	-	-	-	37.3	-	-	-
2.3	-	-	-	37.4	-	-	-
12.1	-	-	-	38.1	-	-	-
14.1	+	+	-	38.2	-	-	-
17.2	-	-	+	38.3	-	-	-
18.1	+	+	+	38.4	-	-	-
20.1	-	-	-	39.1	-	-	+
20.4	-	-	-	39.2	-	-	-
21.1	-	-	-	43.1	-	-	+
33.1	-	-	-	51.2	-	-	-
33.2	-	-	-				

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede ver en la figura 10, los aislamientos 14.1 y 18.1 mostraron dos bandas muy juntas de aproximadamente 1500 pb, de igual tamaño a la obtenida con Bti. Con el set 2 (figura 11) nuevamente 14.1 y 18.1 mostraron el mismo tamaño de banda que Bti de aproximadamente 1100 pb; sin embargo Btk mostró una banda de 500 pb aproximadamente. El aislamiento 33.4 mostró dos bandas tenues, una de aproximadamente 1600 pb mientras que la otra de 600 pb.

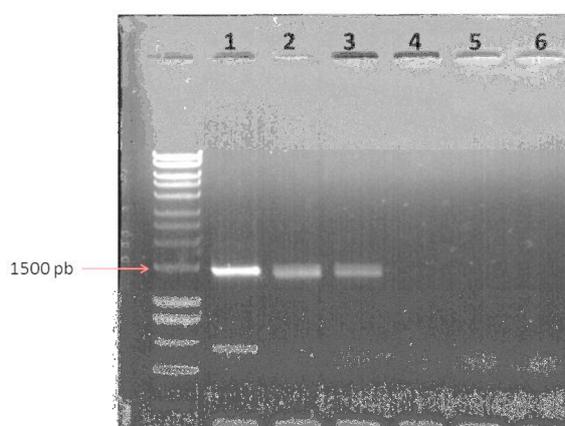


Figura 10. Gel agarosa 1% en TAE 1x. Productos de PCR obtenidos con el set de primers 1. Carril 1: Bti, carril 2: aislamiento 14.1, carril 3: aislamiento 18.1, carril 4: aislamiento 33.3, carril 5: aislamiento 34.2, carril 6: control negativo. MPM: marcador de peso molecular (HyperLadder I, BIOLINE).

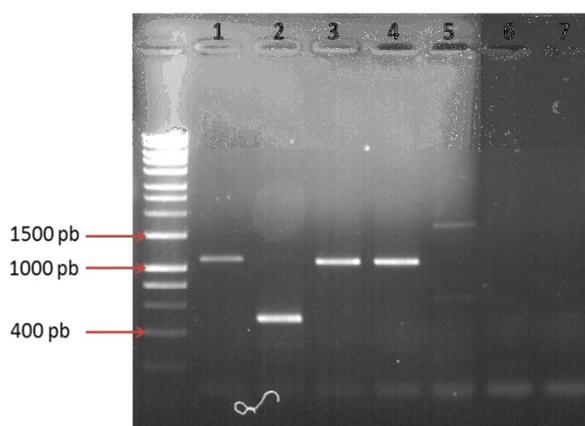


Figura 11. Gel agarosa 1% en TAE 1x. Productos de PCR obtenidos con el set de primers 2. Carril 1: Bti, carril 2: Btk, carril 3: aislamiento 14.1, carril 4: aislamiento 18.1, carril 5: aislamiento 33.4, carril 6: aislamiento 34.2, carril 7: control negativo. MPM: marcador de peso molecular (HyperLadder I, BIOLINE).

En el caso del set 3, representado en la figura 12, se observa que Btk mostró una única banda de 1700 pb, Bti dos bandas, una de 1800 pb y otra de 700 pb. Por otro lado, el aislamiento 17.2 presentó una banda de 1600 pb; 18.1 una banda de 1800 pb; 33.3 tres bandas, una de 2400, 1200 y de 600 pb, siendo la más grande la más intensa. En cuanto al aislamiento 39.1, se obtuvo una banda de 1500 pb; y finalmente el aislamiento 43.1 presentó una banda de 1600 y otra de 500 pb.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

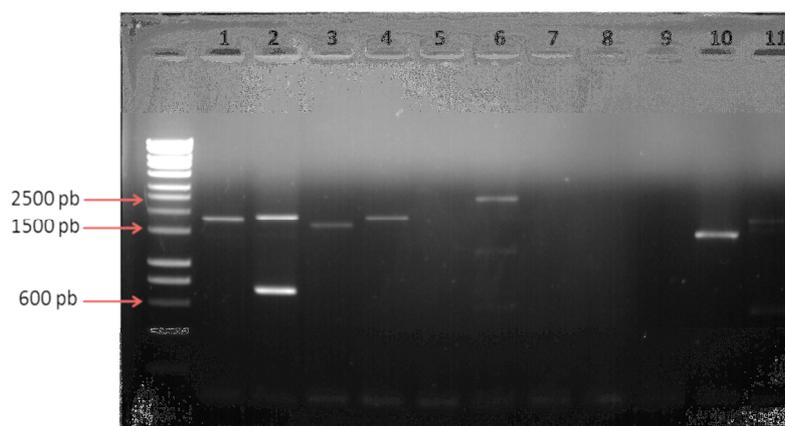


Figura 12. Gel agarosa 1% en TAE 1x. Productos de PCR obtenidos con el set de *primers* 3. Carril 1: Btk, carril 2: Bti, carril 3: aislamiento 17.2, carril 4: aislamiento 18.1, carril 5: aislamiento 20.4, carril 6: aislamiento 33.3, carril 7: aislamiento 33.4, carril 8: aislamiento 34.2, carril 9: 51.2, carril 10: aislamiento 39.1, carril 11: 43.1. MPM: marcador de peso molecular (HyperLadder I, BIOLINE).

Teniendo en cuenta que los *sets* de *primers* utilizados están diseñados para detectar varios genes *cry*, es esperable que una cepa que contenga varios de estos genes (por ejemplo, *cry1*, *cry4* y *cry10*) presente varios amplicones, debido a las diferencias de tamaño existentes entre dichos genes. Considerando esto, también es esperable que dos cepas que presenten diferentes genes *cry*, presenten diferentes amplicones. Por lo tanto, los diferentes patrones de amplificación observados en nuestros aislamientos podrían sugerir diferencias en el contenido de genes *cry*, lo cual podría reflejarse en diferentes espectros de acción.

4.2.2.1. Secuenciación de los amplicones

Con el objetivo de identificar los productos de amplificación obtenidos con los diferentes *sets* de *primers* se secuenciaron las siguientes bandas: Bti con *set* 2 (1100 pb) y 3 (1800 y 700 pb), Btk con *set* 2 (500 pb) y 3 (1700 pb), 14.1 con *set* 1 (1500 pb) y 2 (1100 pb), 17.2 con *set* 3 (1600 pb) y finalmente 18.1 con *set* 1 (1500 pb) y 2 (1100 pb). Una vez obtenidas las secuencias de dichas bandas se corrigieron manualmente mediante el programa *BioEdit*, y se procedió a realizar la alineación con secuencias depositadas en la bases de datos mediante el algoritmo BLASTn. La misma reveló que

tanto las bandas de Bti y Btk con el *set* 3, como las de Btk con el *set* 2, presentaban un alto grado de similitud con secuencias presentes en el genoma de esos microorganismos y no con genes *cry* específicos. Este resultado estaría indicando que esas bandas amplificadas corresponderían con productos inespecíficos de las reacciones de PCR. Una posible explicación a este resultado podría ser que mediante las metodologías utilizadas para la extracción de ADN no se estarían recuperando el 100% de los plásmidos contenidos dentro de las células de *Bacillus thuringiensis*. Tal vez dentro de esos plásmidos “faltantes” se encuentran los genes que serían amplificados con el *set* 2 y 3. Cabe recordar que independientemente de la metodología de extracción de ADN empleada (esferoplastos, *colony*, *Kit*), siempre se obtuvieron los mismos resultados con los *sets*. En el caso de la banda de 1500 pb de los aislamientos 14.1 y 18.1 con *set* 1, las secuencias no permitieron ser alinearlas con las depositadas en las bases de datos, debido a la mala calidad de las mismas, observándose en el cromatograma más de una secuencia. Esto concuerda con las dos bandas observadas en la figura 10 para dichos aislamientos (carriles 2 y 3). Debido a la gran similitud de tamaño de ambas bandas, no fue posible purificarlas por separado. Finalmente, para las bandas de 14.1 y 18.1 con el *set* 2 (1100 pb) y la del aislamiento 17.2 con *set* 3 (1600 pb) no se obtuvieron señales al momento de ser secuenciadas.

4.3. Caracterización molecular

4.3.1. Amplificación del gen de ARNr 16S y construcción de árbol filogenético

Con el objetivo de determinar si las cepas pertenecen al grupo *Bacillus cereus sensu lato* se realizó la amplificación del gen de ARNr 16S a partir de lisado celular de cada uno de los aislamientos con *primers* universales para el Dominio Bacteria, Eub27F y U1492r. A modo de ejemplo, en la figura 13 se muestran algunos de los amplicones obtenidos. En todos los casos se obtuvieron productos de amplificación del tamaño esperado (1500 pb). De esa manera se confirmó que el lisado celular obtenido era

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

amplificable y se encontraba en condiciones de ser utilizado en las reacciones de PCR a realizarse.

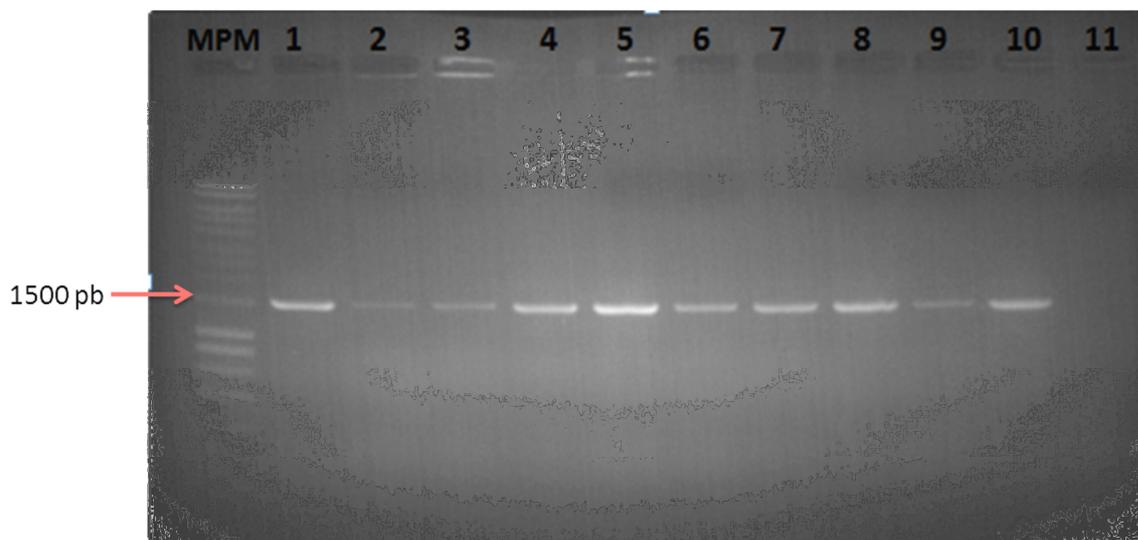


Figura 13. Gel agarosa 1% en TAE 1x. Amplificación del gen del ARNr 16S utilizando los *primers* universales Eub27F y U1492r. Carril 1: aislamiento 14.1, carril 2: aislamiento 17.2, carril 3: aislamiento 18.1, carril 4: aislamiento 20.4, carril 5: aislamiento 33.3, carril 6: aislamiento 33.4, carril 7: aislamiento 34.2, carril 8: aislamiento 37.3, carril 9: aislamiento 39.1, carril 10: aislamiento 43.1, carril 11: control negativo. MPM: marcador de peso molecular (HyperLadder I, BIOLINE).

Luego de verificar el tamaño de los amplicones en gel de agarosa, los productos de amplificación del gen de ARNr 16S de los aislamientos 1.1, 1.2, 2.1, 2.2, 2.3, 12.1, 14.1, 17.2, 18.1, 20.4, 33.3, 34.2, 39.1, 43.1 y 51.2, se enviaron a secuenciar. Una vez recibidas las secuencias se alinearon con las depositadas en la base de datos, y finalmente se realizó la construcción de árbol filogenético.

El resultado del *Blast* de las secuencias del gen de ARNr 16S con las depositadas en la bases de datos nos permitió determinar cuáles cepas pertenecían al grupo *Bacillus cereus sensu lato*. Sin embargo, como era de esperarse, no nos permitió discriminar entre las especies constituyentes de dicho grupo. A modo de ejemplo, para el aislamiento 14.1 se obtuvo una homología del 97% con secuencias depositadas en la base de datos correspondientes a *Bacillus thuringiensis* y al mismo tiempo a *Bacillus cereus*. Este hecho concuerda con lo descrito en la bibliografía, en la cual se establece que los microorganismos constituyentes del grupo *Bacillus cereus sensu lato* presentan

un alto grado de similitud en dicho gen, diferenciándose únicamente en unos pocos nucleótidos (Ash *et al.*, 1991).

Finalmente, con las secuencias del gen de ARNr 16S previamente editadas, se realizó la construcción del árbol filogenético (figura 14). Se puede observar que los aislamientos que pertenecen al grupo *Bacillus cereus sensu lato* (recuadro azul) son 12.1, 14.1, 17.2, 18.1, 43.1 y 51.2. Por otro lado, el aislamiento 1.1 presentó una alta relación filogenética con *Brevibacterium frigoritolerans*; 1.2, 2.2 y 2.3 con el grupo de *Bacillus subtilis*; 20.4 con *Bacillus flexus*; 33.3 y 39.1 con *Bacillus megaterium*; 34.2 con *Bacillus luciferensis* y finalmente 2.1 con *Bacillus licheniformis*. Estos resultados estarían demostrando nuevamente que la metodología propuesta por Travers y col. (1987) para el aislamiento de *Bacillus thuringiensis* a partir de muestras ambientales no es tan efectivo, ya que se aislaron microorganismos diferentes a Bt. Otro punto a destacar es que con los *sets* de *primers* utilizados para identificar *Bacillus thuringiensis* se estarían amplificando regiones inespecíficas dentro del genoma, lo que lleva a resultados falsos positivos. Esto queda demostrado por ejemplo con el aislamiento 33.3, con el cual se obtuvieron productos de amplificación con el *set* 3; sin embargo el análisis filogenético lo ubica por fuera del grupo *Bacillus cereus sensu lato*. Es importante destacar que los 3 falsos positivos se obtuvieron a partir de la utilización del *set* de *primers* 3. De acuerdo a lo descrito por Noguera e Ibarra (2010), dicho *set* de *primers* solamente amplificaría un 2% de los genes *cry*, correspondiente a genes muy poco frecuentes; por lo que no sería esperable que 6 de los 30 aislamientos amplificasen con dicho *set*. Al mismo tiempo, la temperatura de *annealing* de dichos *primers* es relativamente baja, lo que podría llevar a una hibridación inespecífica de éstos con regiones del genoma.

Otra puntualización a tener en cuenta es que la amplificación a partir el *set* 2 no fue relevante para la identificación de Bt ya que siempre se presentó junto con la amplificación del *set* 1. Si se observa en la tabla 5, se puede ver claramente que los aislamientos 14.1 y 18.1, que presentaron resultados positivos con el *set* 2, previamente ya habían amplificado con el 1. Este resultado en cierta medida concuerda con lo esperado, ya que como se describió en la figura 2, el block 2 (región donde hibrida uno de los *primers* del *set* 2) se encuentra dentro de la región

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

comprendida entre el block 1 y 5 (blocks donde hibridan los *primers* del *set 1*). Al mismo tiempo, también concuerda con lo obtenido por Noguera e Ibarra (2010) ya que según sus resultados, el *set 1* fue el más exitoso a la hora de la identificación, amplificando el 90% de los genes *cry*, mientras que el *set 2* solamente un 8%. Esto implicaría que con el *set 1* se obtendrían los resultados más claros.

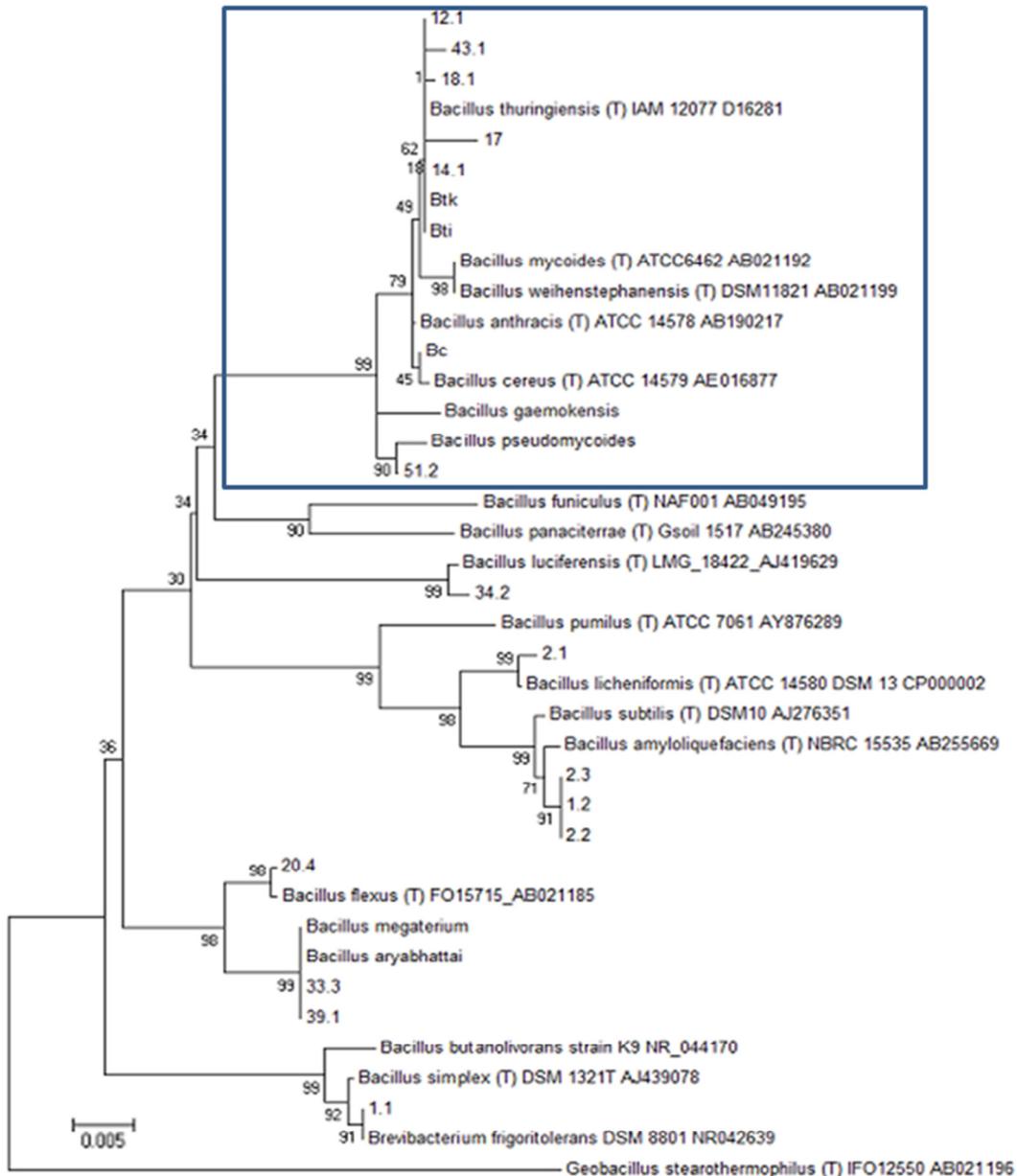


Figura 14. Árbol filogenético construido a partir de la secuencia del gen de ARNr 16S, utilizando el método *Neighbour Joining* (NJ) y el multiprocesador *Clustal X*. Los valores de *bootstraps* fueron calculados a partir de 1000 replicaciones. La barra de escala es el promedio de los nucleótidos diferentes por sitio.

En el caso del aislamiento 33.4, el cual mostró resultado positivo con el *set 2*, no pudo ser incluido en el árbol filogenético, debido a que el cromatograma de la secuencia del gen de ARNr 16S obtenido no mostraba claridad. De todas maneras se pudo obtener un indicio de la identidad de dicho aislamiento al realizar la alineación con secuencias depositadas en la bases de datos mediante el algoritmo BLASTn. Ésta indicaría que no pertenece al grupo de *Bacillus cereus sensu lato*, por lo tanto se podría catalogar como un “presunto” falso positivo.

4.3.2. Caracterización de cepas mediante análisis de su Perfil Rep

Una vez conocidos los aislamientos pertenecientes al grupo *Bacillus cereus sensu lato* se procedió al estudio de sus perfiles Rep utilizando *primers* específicos para dicho grupo (Reyes-Ramirez *et al.*, 2005). Esta técnica permite comparar las cepas a nivel genómico determinando si dos aislamientos son iguales o no y por lo tanto se podrá determinar la diversidad de cepas presentes en nuestra colección. De acuerdo a la figura 15, en la cual se observan los mencionados perfiles Rep, se puede apreciar claramente que las tres cepas de referencia Bti, Btk y Bc (carriles 1, 2 y 3, respectivamente) presentan diferentes perfiles. Este resultado concuerda con lo esperado, ya que distintas cepas presentarán diferentes contenidos de secuencias REP y por lo tanto diferentes perfiles.

Observando los perfiles en detalle, se puede apreciar que Bti y Btk presentan en común una banda de 400 pb, la cual no se encuentra presente en Bc. En cuanto al perfil de Bti, se observan claramente 5 bandas: 3900, 2100, 1900, 1400 y 400 pb; sin embargo Btk presenta 3 bandas: 3100, 1600 y 400 pb. En el caso de Bc se pueden ver claramente 2 bandas: una de 1600 pb mientras que la otra de 1400 pb. Si comparamos estos resultados con los obtenidos por otros autores, quienes emplearon cepas de referencia similares, se puede ver que algunos resultados se condicen. A modo de ejemplo, Reyes-Ramirez y col (2005) utilizaron como cepas de referencia para la amplificación de secuencias REP a *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* y *Bacillus cereus*. En el caso de Bti obtuvieron las mismas bandas que las observadas en la figura

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

16 para Bti y además 3 bandas tenues adicionales. En el caso de *Bacillus cereus* las dos bandas observadas en la figura 16 coinciden con 2 de las 6 obtenidas por dichos autores. Para el caso de *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki*, utilizado como referencia por Sauka y col (2010) solamente una de las bandas observadas en la figura 16 para Btk coincide con una de las 5 bandas obtenidas por dichos autores.

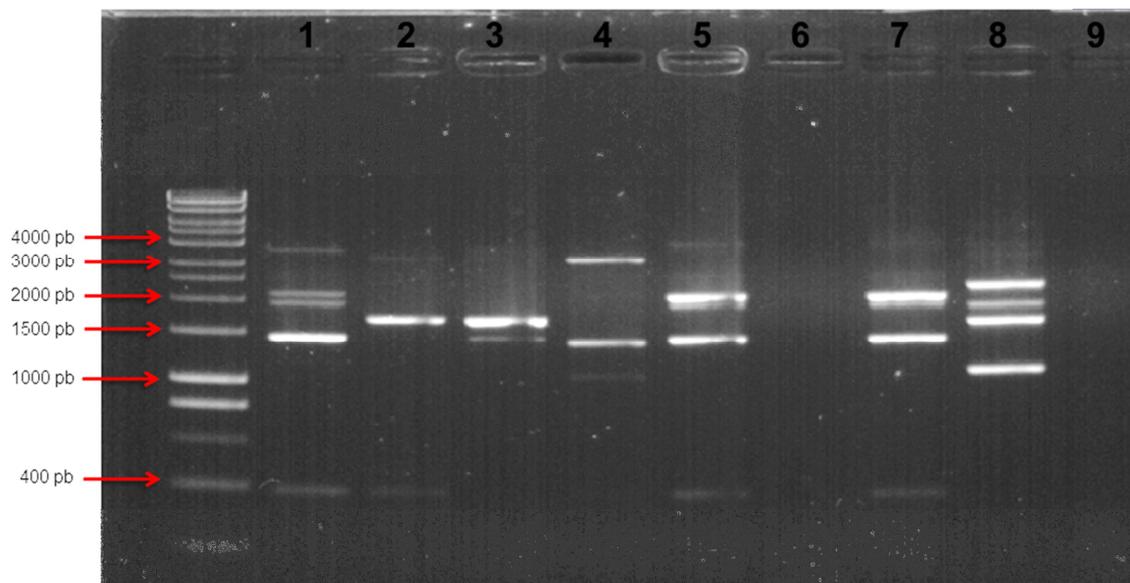


Figura 15. Gel agarosa 1.2% en TAE 1x. Amplificación de secuencias Rep utilizando los *primers* específicos Bc-REP-1 y Bc-REP-2. Carril 1: cepa referencia Bti, carril 2: cepa referencia Btk, carril 3: cepa referencia Bc, carril 4: aislamiento 12.1, carril 5: aislamiento 14.1, carril 6: aislamiento 17.2, carril 7: aislamiento 18.1, carril 8: aislamiento 43.1, carril 9: control negativo. MPM: marcador de peso molecular (HyperLadder I, BIOLINE).

En cuanto a los aislamientos, claramente 14.1 y 18.1 presentan exactamente el mismo perfil, bandas a 3900, 2100, 1900, 1400 y 400 pb, el cual es idéntico al perfil mostrado por Bti. Este resultado podría estar indicando la pertenencia de dichos aislamientos al serovar *israelensis*, de acuerdo a las conclusiones obtenidas durante el desarrollo de esta técnica (Reyes-Ramirez & Ibarra, 2005). La única diferencia que podemos destacar entre estos aislamientos y Bti es la intensidad de la banda de 2100 pb, la cual para los aislamientos es más intensa que en Bti. De todas maneras, lo importante es principalmente el perfil y no tanto la intensidad. A modo de ejemplo, en repeticiones posteriores que se realizaron, nuevamente el perfil entre estos aislamientos y Bti era el mismo, pero se encontraron bandas que eran más intensas en uno que en otro. Continuando con el análisis, el aislamiento 12.1 presentó bandas de 3100, 1400 y 1100 pb, mientras que 43.1 de 2200, 1800, 1600 y 1000 pb

aproximadamente. Llama la atención la no amplificación del aislamiento 17.2, ya que según la secuencia del gen de ARNr 16S dicho aislamiento se encuentra dentro del grupo *Bacillus cereus sensu lato*. Por lo tanto, dado que los *primers* empleados fueron diseñados para dicho grupo, debería observarse algún perfil. En el caso del aislamiento 51.2 no se realizó Rep-PCR junto con los que se mencionaron anteriormente debido a que fue uno de los últimos en ser secuenciados y por lo tanto no se conocía la secuencia del gen de ARNr 16S al momento de realizar la Rep-PCR. De todas maneras, para completar el análisis se estudiará su perfil en reacciones posteriores.

A partir de estos resultados se puede decir que se encontraron tres tipos de perfiles Rep entre las cepas candidatas a Bt: perfil 1 en el cual estarían los aislamientos 14.1, 18.1 y Bti; un perfil 2 asociado al aislamiento 12.1 y finalmente un tercer perfil asociado al aislamiento 43.1.

4.4. Observación de cristales

De manera de completar la caracterización de los aislamientos, aquellos que pertenecían al grupo *Bacillus cereus sensu lato* se observaron al microscopio óptico de contraste de fases para determinar la presencia de cristales. Sin embargo, solamente se pudieron detectar en los aislamientos 14.1, 18.1 y en los dos controles positivos, Bti y Btk, confirmando así la correcta identificación mediante los sistemas de *primers*. En el caso de los aislamientos 17.2 y 43.1 resultó dudosa la observación, detectándose únicamente esporas. Esto confirmaría la necesidad de contar con un método molecular rápido y sencillo que permita la identificación de cepas de Bt.

Como se puede ver, en la figura 16 se distinguen claramente dos tipos de cristales: los esféricos, observados en Bti, 14.1 y 18.1 y los romboides observados únicamente por Btk. Esta es una característica más que confirma la semejanza entre los aislamientos 14.1 y 18.1 con Bti.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

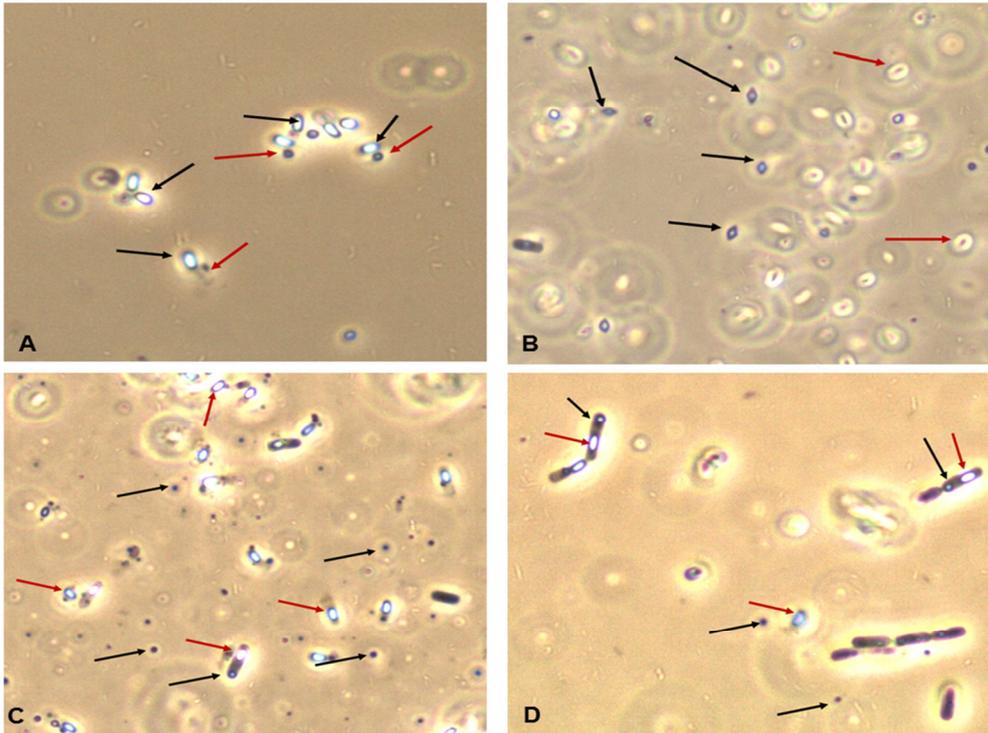


Figura 16. Fotografía de la observación de cristales en microscopio óptico de contraste de fases. A: Bti, B: Btk, C: aislamiento 14.1, D: aislamiento 18.1. Las flechas negras indican los cristales, mientras que las rojas las esporas.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se aislaron y caracterizaron cepas de diversos ecosistemas tales como suelo y hojas y se puso a punto una técnica molecular de detección rápida de *Bacillus thuringiensis* basada en la amplificación de genes *cry*, con posterior análisis del gen de ARNr 16S y análisis de perfiles Rep. La misma permite realizar un monitoreo rápido de aislamientos ambientales determinando si pertenecen a la especie *Bacillus thuringiensis*.

Esto simplifica la identificación de Bt evitando la observación de cristales CRY al microscopio, lo cual requiere tiempo y experiencia. Igualmente cabe destacar que esta metodología implementada tiene sus limitaciones, principalmente dando falsos positivos con el set 3, las cuales deben ser tenidas en cuenta al momento de analizar los resultados. Es por esta razón que se sugiere la utilización principalmente de los sets 1 y 2. Igualmente, con estos 2 sets se estaría abarcando el 98% de genes *cry*, set 1 90% y set 2 8% (Noguera & Ibarra, 2010).

De los 65 aislamientos iniciales obtenidos a partir de las 51 muestras pertenecientes a diferentes ecosistemas, se identificaron a dos de ellos (14.1 y 18.1) como *Bacillus thuringiensis* y otros dos (17.2 y 43.1) como potenciales Bt. Los dos primeros presentaron un perfil Rep idéntico, lo que indicaría que podría tratarse de la misma especie y serovar. Hay que recordar que dichos aislamientos provienen del mismo ecosistema (suelo de Invernáculos en Rio Negro) pero de muestras diferentes. Al mismo tiempo, estos aislamientos presentaron características muy similares a Bti: mismo perfil Rep, igual tipo de cristales, igual amplicón con los diferentes sets, lo cual podría sugerir una alta relación entre éstos. En cuanto a los dos aislamientos restantes (17.2 y 43.1) provinieron de muestras de hojas y son clasificados como “presuntos” ya que, si bien se encuentran dentro del grupo de *Bacillus cereus sensu lato* y amplificaron con el set de primers 3, dicho set requiere de ajustes debido a las amplificaciones de regiones no específicas, por lo que habría que confirmar por otro método la presencia de genes *cry*.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En cuanto a la técnica de Rep-PCR, a pesar de las diferencias observadas con lo obtenido por otros autores, se destaca que fue reproducible, es decir al repetir la metodología se observaron los mismos perfiles de bandas.

Como perspectivas, en el marco del proyecto se seguirá profundizando en la caracterización de las cepas hasta el momento identificadas como Bt, principalmente en el estudio del contenido de genes *cry*. Para ello se realizarán reacciones de PCR con *primers* específicos para los genes *cry* de interés. Al mismo tiempo se estudiarán los perfiles de proteínas para cada una de las cepas, y se pondrán a punto las condiciones de crecimiento que permitan una óptima producción de cristales CRY. Todo esto de cara a la formulación de un producto a base de *Bacillus thuringiensis* como alternativa al empleo de insecticidas de síntesis química.

6. APÉNDICE

6.1. Medios de cultivo

6.1.1. Luria Bertari – Agar (LB-Agar).

Tabla 6. Composición del medio de cultivo líquido Luria Bertari (LB)

Triptona	10 g
Extracto levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua Destilada	1000 ml

Se pesa cada uno de los componentes descritos en la tabla 6 y se agrega el correspondiente volumen de agua destilada. Se homogeniza y se ajusta el pH a 6.8. Posteriormente se agregan 20 g/L de agar y se calienta hasta romper el hervor. Se esteriliza en autoclave durante 20 minutos a 121 °C y se reparte en placas de Petri de a 15 ml aproximadamente. Luego de solidificado el agar, las placas se secan a 35°C y se conservan a 4°C hasta su uso.

6.1.2. Luria Bertari suplementado con Acetato de Sodio.

Se pesa cada uno de los componentes descritos en la tabla 6, se disuelven en la mínima cantidad de agua destilada y posteriormente se agregan 83,3 ml/L de la solución de acetato de sodio 3 M pH 6.8. Se agrega el correspondiente volumen de agua destilada, se homogeniza y se ajusta el pH a 6,8. Finalmente se reparte en tubos con tapa rosca de a 10 ml aproximadamente. Se esteriliza en autoclave durante 20 minutos a 121°C.

6.1.3. Medio de cultivo líquido T3.

Tabla 7. Composición del medio de cultivo líquido T3.

Triptona	3 g
Triptosa	2 g
Extracto Levadura	1.5 g
Cloruro de Manganeso	0.005 g
Fosfato de Sodio	8.9 g
Agua Destilada	1000

Se pesa cada componente de la tabla 7 y se agrega el correspondiente volumen de agua destilada. Se homogeniza y se ajusta el pH a 6.8. Se esteriliza en autoclave durante 20 minutos a 121°C.

6.2. Reactivos

(Sambrook and Russell, 2001)

Acetato de Sodio 3 M, pH 6,8. Disolver 408.3 g de acetato de sodio - 3H₂O en 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 6.8 con ácido acético diluido. Ajustar el volumen a 1 litro con agua destilada. Esterilizar en autoclave.

Buffer TES. 30 mM Tris base, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl; pH 8.0 ajustado con HCl 3N.

Buffer de lisis. Buffer TES suplementado con 20% sacarosa, 2 mg/ml lysozima, y 1 µl/ml de RNase de la solución *stock* de 10 mg/ml.

TAE 1x. Se realiza la dilución correspondiente de la solución *stock* de TAE 50x.

TAE 50x. En 500 ml de agua destilada disolver 242 g de Tris base, 57,1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0,5 M (pH 8). Ajustar el volumen a 1 litro con agua destilada.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abad Flores, R. M. E. (2011). Biodiversidad de *Bacillus thuringiensis* aislados de agroecosistemas peruanos y evaluación del potencial bioinsecticida. *Ciencias e Investigación*, 14(1), 29–34.
- Aronson, a I., Han, E. S., McGaughey, W., & Johnson, D. (1991). The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4), 981–6.
- Aronson, a I., & Shai, Y. (2001). Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*, 195(1), 1–8.
- Ash, C., Farrow, J. A. E., Dorsch, M., & Stackebrandt, E. (1991). Comparative Analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and Related Species on the Basis of Reverse Transcriptase Sequencing of 16s rRNA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 343–346.
- Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sinai, R., Manasherob, R., Margalith, Y. (1997). Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis* . *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4883–4890.
- Black, G. E., Snyder, A. P., & Heroux, K. S. (1997). Chemotaxonomic differentiation between the *Bacillus cereus* group and *Bacillus subtilis* by phospholipid extracts analyzed with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 28(3), 187–199.
- Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, C., & Lescar, J. (2006). Structure of the Functional Form of the Mosquito Larvicidal Cry4Aa Toxin from *Bacillus*

BIBLIOGRAFÍA

- thuringiensis* at a 2 . 8-Angstrom Resolution. *Journal of Bacteriology*, 188(9), 3391–3401.
- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., & Valéro, J. R. (2006). Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry*, 41(2), 323–342.
- Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Quintero, R. (1998). Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 4965–72.
- Bravo, A., Sarjeet, S. & Gill, M. S. (2008). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control, 49(4), 423–435.
- Canan, Usta (2013). Microorganisms in Biological Pest Control — A Review (Bacterial Toxin Application and Effect of Environmental Factors), Current Progress in Biological Research, Dr. Marina Silva-Opps (Ed.), ISBN: 978-953-51-1097-2, InTech.
- Carlson, C. R., & Caugant, D. A. (1994). Genotypic Diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), 1719–1725.
- Carroll, J., & Ellar, D. J. (1993). An analysis of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin action on insect-midgut-membrane permeability using a light-scattering assay. *European Journal of Biochemistry*, 214(3), 771–8.
- Cinar, C., Apaydin, O., Yenidunya, a F., Harsa, S., & Gunes, H. (2008). Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from olive-related habitats in Turkey. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 515–25.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D. & Dean, D. H. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 807–13.

BIBLIOGRAFÍA

- De Maagd, R. a, Bravo, A., & Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*, 17(4), 193–9.
- Du, C., Martin, P. a, & Nickerson, K. W. (1994). Comparison of Disulfide Contents and Solubility at Alkaline pH of Insecticidal and Noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* Protein Crystals. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10), 3847–53.
- Du, C. & Nickerson, K. . (1996). *Bacillus thuringiensis* HD-73 Spores Have Surface-Localized Cry1Ac Toxin: Physiological and Pathogenic Consequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3722–3726.
- Eden, P. A., Schmidt, T. M., Blakemore, R. P., & Pace, N. R. (1991). Phylogenetic Analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* Using Polymerase Chain Reaction-Amplified 16s rRNA-Specific DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(2), 324–325.
- Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A., & Koziel, M. G. (1996). Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Agricultural Sciences*, 93(May), 5389–5394.
- Freitas, D. B., Reis, M. P., Lima-Bittencourt, C. I., Costa, P. S., Assis, P. S., Chartone-Souza, E., & Nascimento, A. M. (2008). Genotypic and phenotypic diversity of *Bacillus* spp. isolated from steel plant waste. *BMC Research Notes*, 1, 92.
- Gómez, I., Pardo-López, L., Muñoz-Garay, C., Fernandez, L. E., Pérez, C., Sánchez, J. & Bravo, A. (2007). Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, 28(1), 169–73.
- Hernandez, J; Mariño, L. (1997). Uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para caracterizar aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis*. *Corpioca*, 2.

BIBLIOGRAFÍA

- Hoffmaster, A. R., Novak, R. T., Marston, C. K., Gee, J. E., Hesel, L., Pruckler, J. M., & Wilkins, P. P. (2008). Genetic diversity of clinical isolates of *Bacillus cereus* using multilocus sequence typing. *BMC Microbiology*, 8:191.
- Hofmann, C., Lüthy, P., Hütter, R., & Pliska, V. (1988). Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *European Journal of Biochemistry*, 173(1), 85–91.
- Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M., & Bulla, L. A. (2010). A genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*. 1:1, 31–50.
- Jung, M. Y., Jung, M.-Y., Paek, W. K., Park, I.-S., Han, J.-R., Sin, Y., ... Chang, Y.-H. (2010). *Bacillus gaemokensis* sp. nov., isolated from foreshore tidal flat sediment from the Yellow Sea. *Journal of Microbiology*, 48(6), 867–71.
- Kirouac, M., Vachon, V., Noël, J.-F., Girard, F., Schwartz, J.-L., & Laprade, R. (2002). Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1561(2), 171–9.
- Kuwana, R. D. I. (2012). discrimination of the bacillus cereus group members by pattern analysis of random amplified polymorphic DNA-PCR. *Biocontrol Science*, 17 (2), 83-86.
- Liu, Q., Roh, J. Y., Wang, Y., Choi, J. Y., Tao, X. Y., Jin, B. R., & Je, Y. H. (2013). Characterization of a novel mosquitocidal strain of *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* which harbors a rolling-circle replication plasmid, pBt1–3. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 16(3), 257–261.
- MGAP/DIEA-DIGEGRA. Anuario estadístico agropecuario 2013. <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,27,O,S,0,MNU;E;2;16;10 ;6;MNU>
- Nakamura, L. K. (1994). DNA relatedness among *Bacillus thuringiensis* serovars. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(1), 125–9.

BIBLIOGRAFÍA

- Niskane, T., Kiutamo, S., Raisanen, A. M. R. (1978). Determination of Fatty Acid Compositions of *Bacillus cereus* and Related Bacteria: a Rapid Gas Chromatographic Method Using a Glass Capillary Column. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(2), 453–455.
- Noguera, P. a, & Ibarra, J. E. (2010). Detection of new cry genes of *Bacillus thuringiensis* by use of a novel PCR primer system. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(18), 6150–6155.
- 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.
- Raymond, B., Johnston, P. R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., & Crickmore, N. (2010). *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends in Microbiology*, 18(5), 189–94.
- Reyes Ramirez, 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, 71(3), 1346–1355.
- Roh, J., Yul, J. Y. C. (2007). *Bacillus thuringiensis* as a Specific, Safe, and Effective Tool for Insect Pest Control. *Microbiol. Biotechnology*, 17(4), 547–559.
- Salamitou, S., Ramiise, F., Brehélin, M., Bourguet, D., Gilois, N., Gominet, M., ... Lereclus, D. (2000). The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. *Microbiology*, 146, 2825–2832.
- Sambrook J. and D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 3th ed. Cold Spring Harbor, NY. Vol. 3. Appendix 1.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., & Christou, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, 9(3), 283–300.

BIBLIOGRAFÍA

- Sauka, D. H., & Benintende, G. B. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología*, 40, 124–140.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, 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.
- Seifinejad, a., Jouzani, G. R. S., Hosseinzadeh, a., & Abdmishani, C. (2008). Characterization of Lepidoptera-active cry and vip genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Biological Control*, 44(2), 216–226.
- Stabb, E. V, Jacobson, L. M., & Handelsman, J. (1994). Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12), 4404–12.
- Tourasse, N. J., Helgason, E., Økstad, O. a, Hegna, I. K., & Kolstø, a-B. (2006). The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 579–93.
- Travers, R. S., Martin, P. a, & Reichelderfer, C. F. (1987). Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus spp.* *Applied and Environmental Microbiology*, 53(6), 1263–6.
- Vachon, V., Laprade, R., & Schwartz, J.-L. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 111(1), 1–12.
- Velooralappil N, Smitha, R. B., Benjamin, S., & Al, E. T. (2013). An Overview on the Crystal Toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Advances in Microbiology*, 3(September), 462–472.
- Versalovic, J., M. Schneider, F. J. & De Bruijn, J. R. L. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5, 25-40.

BIBLIOGRAFÍA

Ye, W., Zhu, L., Liu, Y., Crickmore, N., Peng, D., Ruan, L., & Sun, M. (2012). Mining new crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* on the basis of mixed plasmid-enriched genome sequencing and a computational pipeline. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(14), 4795–801.

Zhang, M. Y., Lövgren, a, Low, M. G., & Landén, R. (1993). Characterization of an avirulent pleiotropic mutant of the insect pathogen *Bacillus thuringiensis*: reduced expression of flagellin and phospholipases. *Infection and Immunity*, 61(12), 4947–54.

Agradecimientos

Primero que nada a mi familia, novia y amigos por el apoyo brindado en este tiempo.

Un agradecimiento de forma especial a Ángela Cabezas, mi orientadora y consejera en esta tesis.

A Lage y Cía por brindarme la posibilidad de realizar esta tesis y en especial a Pedro y Cecilia por el gran apoyo.

A la Universidad ORT, en especial a Carlos Sanguinetti por abrirme las puertas del laboratorio.

A Lorena Betancor por su total apoyo y ayuda en la realización de esta tesis.

A todos los integrantes del laboratorio de Biotecnología, que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme. A Natalia Scioscia por brindarme materiales.

A la Cátedra de Microbiología de Facultad de Química, al igual que al Dr. Jorge. E. Ibarra del Cinvestav, México por el aporte de las cepas de referencia.

A todos ellos, muchas gracias por hacer posible la realización de este trabajo.