

Artículo original

Aislamiento y caracterización molecular, ribotipificación, de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas en suelos y larvas muertas de *Hylesia metabus* en la región nororiental de Venezuela

Juana Vitelli-Flores^a, Roxana Gajardo^b, Liset Lage^a, Ysalexia Fajardo^a, Blas Dorta^b,
Vidal Rodríguez Lemoine^{a,c,*}

^aCentro Venezolano de Colecciones de Microorganismos, ^bLaboratorio de Procesos Fermentativos.
Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela.

^cAcademia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales. Caracas-Venezuela

Recibido 30 de junio de 2010; aceptado 20 de octubre de 2010

Resumen: *Bacillus thuringiensis* es una bacteria esporogénica grampositiva del grupo *B. cereus*, caracterizada por la producción de δ -endotoxinas codificadas por una familia de genes *cry*, mayoritariamente plasmídicos con actividad patógena específica contra larvas de insectos. Esta propiedad ha sido usada en la formulación de productos comerciales para control de insectos plaga como *Hylesia metabus* “palometa peluda” que afecta a los pobladores de la región nororiental de Venezuela. En el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos se ha iniciado la construcción de una colección de cepas nativas de *B. thuringiensis*, a partir de muestras de suelos y larvas muertas de *H. metabus* colectadas en zonas afectadas, que pudiera ser utilizada en la elaboración local de bioinsecticidas para control de ésta y otras plagas. El empleo de condiciones selectivas de crecimiento, pruebas bioquímicas complementarias y presencia de inclusiones parasporales, seguido de la caracterización molecular empleando la técnica de ribotipificación automatizada, permitió la identificación de 11 cepas nativas de *B. thuringiensis*. La variedad de ribotipos encontrados refleja la heterogeneidad genética de *B. thuringiensis* en la muestra examinada.

Palabras clave: *B. thuringiensis*, *H. metabus*, ribotipificación, control biológico

Isolation and molecular characterization, ribotyping, of *Bacillus thuringiensis* native strains isolated from soils and *Hylesia metabus* death larvae at northeast region of Venezuela

Abstract: *Bacillus thuringiensis* is a Gram positive spore-forming bacteria of the *B. cereus* group, that produces δ -endotoxins, encoded mainly by *cry* genes, with pathogenic specific activity against some insect larvae. This property has been used in products applied to the control of *Hylesia metabus*, a pest known as “palometa peluda” that affects living population in the northeast region of Venezuela. In the Venezuelan Center for Culture Collections we have initiated the construction of a collection of *B. thuringiensis* native strains isolated from soils and *H. metabus* death larvae that could be applied in pest control. The use of selective growth conditions, biochemical tests and detection of parasporal inclusions, followed by ribotyping methods, allowed the identification of 11 *B. thuringiensis* native strains. Variety of ribotypes shows the genetic heterogeneity of *B. thuringiensis* identified

Keywords: *B. thuringiensis*, *H. metabus*, ribotyping, biocontrol

* Correspondencia:

E-mail: vrodriguezlemoine@gmail.com

Introducción

Bacillus thuringiensis es una bacteria grampositiva, esporogénica, perteneciente al grupo *Bacillus cereus*, formado por 7 especies estrechamente relacionadas:

B. anthracis, *B. cereus*, *B. medusa*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis* y *B. wiehenstephanensis*. *B. thuringiensis* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Ha sido aislado a partir de muestras de suelos, ambientes acuáticos, plantas, insectos muertos, granos

almacenados y otros ecosistemas [3-8].

En ambientes naturales, *B. thuringiensis* se encuentra frecuentemente enmascarado por la presencia de otras especies relacionadas que muestran mayor capacidad para competir por los nutrientes del suelo [9]. Para lograr mayor eficiencia en el aislamiento es necesario recurrir a estrategias selectivas que permitan reducir en número aquellas especies no deseadas que comparten un hábitat común. La identificación, basada únicamente en pruebas bioquímicas convencionales, no permite diferenciar entre *B. thuringiensis*, y otras especies del grupo de *B. cereus*. La demostración de la presencia de inclusiones cristalinas parasporales es una prueba fundamental en la identificación de *B. thuringiensis* [10]. Estas estructuras, de naturaleza proteica, están codificadas en genes *cry* localizados fundamentalmente en plásmidos transferibles entre cepas de *B. thuringiensis* y otras especies estrechamente relacionadas [11,12]. Las cepas que pierden estos elementos genéticos, o que bajo ciertas condiciones de cultivo no expresan los genes *cry*, no pueden diferenciarse de otras especies del grupo *B. cereus* [13,14].

Las proteínas Cry de *B. thuringiensis*, forman una familia compleja de δ -endotoxinas que ejercen actividad patógena específica contra larvas de especies de insectos de órdenes diversos como Lepidoptera, Diptera y Coleoptera [15]. El efecto letal se pone de manifiesto mediante la solubilización a pH básico de la prototoxina por la acción de proteasas altamente específicas presentes en el intestino de las larvas de aquellas especies que son susceptibles. Las moléculas de δ -endotoxina liberadas, actúan mediante la unión a receptores específicos localizados en las microvellosidades de las células del epitelio del intestino medio del insecto, forman canales o poros que producen un desequilibrio osmótico que conduce a la muerte del insecto [16]. Las larvas muertas pueden convertirse en un sustrato adecuado para la germinación y eventual proliferación de las esporas de *B. thuringiensis* ingeridas por el insecto, debido a que el pH alcalino ayuda a la germinación de las esporas [17].

La actividad patógena específica de las δ -endotoxinas producidas por *B. thuringiensis* es una propiedad que ha sido empleada eficientemente para el control de *Hylestia metabus*, en sustitución de productos químicos menos específicos, que pueden dejar residuos contaminantes del ambiente que contribuyen a la selección de mutantes de *H. metabus* resistentes a estos compuestos [15].

En Venezuela, la presencia estacional de la polilla *H. metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae), conocida en la región nororiental costera como “palometa peluda”, ha sido identificada como un problema de salud pública que afecta significativamente las actividades productivas, educativas, recreativas y turísticas de la región [18]. La hembra adulta posee setas urticantes que recubren su cuerpo y le sirven para proteger las posturas de los depredadores naturales. Durante el vuelo (4 a 7 días), las setas son liberadas al medio ambiente pudiendo causar dermatitis severa entre los habitantes de las regiones donde el insecto es endémico. En la región, el control de esta plaga se viene haciendo

mediante la aplicación de programas en los que se incluye el monitoreo permanente y la aplicación localizada de preparaciones comerciales (Dipel 8L®)¹ elaboradas a partir de cultivos de *B. thuringiensis* var *kurstaki*. Este producto, elaborado por Abbott CA, de elevado costo en divisas, limita su aplicación con la periodicidad requerida para el control efectivo de *H. metabus*.

Este trabajo tiene como objetivo el aislamiento, identificación y caracterización molecular de cepas de *B. thuringiensis*, a partir de muestras de suelos y de larvas muertas de *H. metabus*, colectadas en localidades tradicionalmente afectadas por la presencia masiva de esta plaga, a los fines de iniciar una colección de cepas nativas que pudiera servir para la formulación local de bioinsecticidas específicos para su control. Las cepas de *B. thuringiensis*, identificadas y caracterizadas en este trabajo, forman parte de las colecciones del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCN). Este trabajo es parte de un proyecto multidisciplinario, denominado RETO, dirigido al estudio y control de *H. metabus* en el Golfo de Paria (10° 21' 39" N/62° 4' 49" O, Venezuela). Resultados parciales fueron presentados en el XIX Congreso Latinoamericano de Microbiología [19].

Materiales y métodos

Recolección y siembra de muestras: Se colectaron muestras de suelos y de larvas muertas de *H. metabus* en diferentes zonas de la región nororiental del estado Sucre (Venezuela) antes de los ciclos de vuelo ocurridos entre los años 2002 y 2006. Las muestras de suelos fueron colectadas en la población de Río Grande (10°38'13,0"/62°02'47,7") y en la vecindad de los caños Guanaco (10°07'02,4"/62°57'28,7") y Guaraunos (10°32'36,3"/62°50'43,4"). Las larvas muertas de *H. metabus* fueron colectadas en las poblaciones de Irapa (10°33'29,6"/62°44'52,2"), El Paujil (10°37'40,5"/62°42'27,7"), Morichal (10°22'32,2"/62°53'18,6"), Pedernales (09°48'12,0"/62°10'33,4") y los caños Guanoco (10°07'02,4"/62°57'28,7") y Ajíes (10°27'44,5"/63°03'29,4"). Previo a la recolección de las muestras se tuvo confirmación de que en los dos últimos años las poblaciones o localidades seleccionadas para el muestreo no habían sido tratadas con productos comerciales (Dipel 8L® y otros) o artesanales elaborados en base a *B. thuringiensis* [20].

Las muestras de suelo fueron colectadas en frascos estériles (dos muestras por región). En la recolección se descarta la capa superficial del suelo, y se toma la muestra, bajo condiciones estériles, sin superar los 5 cm de profundidad. Se mantienen a -20°C hasta su procesamiento en el laboratorio. Las muestras fueron desecadas en estufa a 60°C por 2 h, y luego se homogeneizaron en un mortero estéril. En cada caso, 1 g de suelo fue añadido a 10 mL de agua estéril e

¹ En esta publicación, la referencia a marcas o productos comerciales se realiza con el único fin de proporcionar información específica sobre el tema y no implica recomendación o aprobación por entes del estado venezolano, a quién corresponde su aprobación o negación para los fines indicados.

inmediatamente homogeneizado por agitación durante 1 minuto. Volúmenes de 1 mL fueron sometidos a tratamiento térmico (10 minutos a 80° C, seguido de 5 minutos en baño de hielo) a los fines de seleccionar microorganismos formadores de esporas. Todo, según recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud [21].

Las larvas muertas de *H. metabus* fueron colectadas en frascos estériles (tres larvas por frasco), se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 3%, seguido de repetidos lavados con agua destilada estéril. Se prepararon homogeneizados en 1 mL de agua estéril y se sometieron a tratamiento térmico bajo las condiciones antes descritas.

Diluciones seriadas de los homogeneizados fueron sembradas directamente en placas de agar LB (Luria Bertani) e incubadas a 30° C hasta la aparición de colonias bien definidas.

Selección y caracterización fenotípica: En los ensayos de identificación se empleó como control positivo la cepa de *B. thuringiensis* (CVCVM 1819) variedad *kurstaki*, aislada directamente de un producto comercial, Dipel 8L®, empleado en los programas para el control de *H. metabus* en el golfo de Paria, Venezuela. Se verificó la identidad corroborando el morfotipo de *B. thuringiensis*: colonias color crema, grumosas, bordes irregulares y textura parecida a la cera, así como la capacidad de producir β -hemolisina, resistencia a penicilina y sensibilidad a estreptomycin [22-24]. En conjunto estas propiedades (Pen^RStrep^S Hem⁺), sumadas a las pruebas de motilidad (mot⁺), fueron utilizadas como fenotipo presuntivo en el protocolo para la identificación de *B. thuringiensis* [19]. De la siembra de los homogeneizados y de diluciones seriadas en agar LB se obtuvieron colonias bien definidas que fueron purificadas en el mismo medio. A partir de éstas se hicieron replicas simultáneas en: agar sangre de carnero al 5%, agar LB conteniendo 100 µg/mL de penicilina, y agar LB suplementado con 25 µg/mL de estreptomycin, a los fines de seleccionar sólo aquellas colonias que expresaran el fenotipo presuntivo (Pen^R Strep^S Hem⁺). La identificación del género se estableció empleando el sistema semi-automatizado Api ATB/Plus, galerías 50CHB (BioMérieux).

Presencia de cristales o cuerpos parasporales: Las colonias, identificadas fenotípicamente dentro del grupo *B. cereus* con posibilidad de ser *B. thuringiensis*, fueron seleccionadas para determinar la presencia o ausencia de cuerpos parasporales (cristales de δ -endotoxina) característicos de *B. thuringiensis*. Los cultivos fueron crecidos en agar LB a 30° C durante 48 horas hasta completar la fase de esporulación. Luego fueron resuspendidos en una solución de glicerol al 50% para observación directa con microscopio de contraste de fases a 1000X [22].

Caracterización molecular: La caracterización molecular se realizó, partiendo directamente de colonias purificadas que mostraban el fenotipo de *B. thuringiensis*, empleando el sistema automatizado de ribotipificación: *RiboPrinter*

Microbial Characterization System® (RMCS) DuPont Qualicon. Todas las cepas (Pen^RStrep^S Hem⁺) con identificación presuntiva como *B. thuringiensis* fueron sembradas en placas de agar LB. Después de crecimiento durante toda la noche, se resuspendieron en una solución tampón (Dupont) mezclando con un agitador eléctrico. Volúmenes de 30 µL fueron transferidos a un porta muestras e incubadas a 80° C durante 10 minutos con el propósito de inhibir la acción de enzimas endógenas capaces de degradar el ADN. Los pasos siguientes fueron realizados directamente por el equipo en forma automatizada, previo ajuste de las condiciones de trabajo empleando cepas controles apropiadas. El ADN de cada cultivo fue digerido con la enzima *EcoRI*. Los fragmentos de restricción, obtenidos por digestión completa, fueron separados por electroforesis en mini-geles de agarosa y transferidos en forma continua a membranas de nylon que sirvieron como soporte para la hibridación con una sonda quimioluminiscente (operón *rrnB* de *E. coli*). La información sobre los patrones de bandas obtenidos para cada una de las muestras fue almacenada en formato digital. Los patrones de las bandas identificadas fueron comparados entre sí, y con los patrones registrados en base de datos del *RiboPrinter*. El coeficiente de similitud entre los patrones generados por cada una de las cepas bajo estudio se calcula en base a la posición relativa, tamaño e intensidad del registro de cada una de las bandas. Se asume que dos cepas que muestran el mismo patrón de bandas son consideradas como similares si el coeficiente de similitud es ≥ 0.93 , y en consecuencia son asignadas a un mismo ribogrup. Si el patrón de bandas es muy cercano (≥ 0.85) al de un patrón de referencia incorporado en la base de datos del *RiboPrinter* (DuPont ID), el sistema asigna una identificación dentro de una especie a nivel de cepa o ribotipo [25- 27]. Como control positivo se incorporó en cada corrida la cepa CVCVM 1819, *B. thuringiensis*, variedad *kurstaki* (identificada como ribogrup 6034), aislada a partir de una muestra de Dipel 8L®.

Resultados y discusión

El aislamiento de *B. thuringiensis* a partir de muestras ambientales es una tarea dificultosa debido, fundamentalmente, a la baja proporción en que se encuentra ésta especie en relación a otras especies del grupo *B. cereus* que comparten el mismo hábitat [28, 29]. La aplicación de tratamiento térmico controlado aplicado en la primera fase del procesamiento de las muestras favoreció el enriquecimiento selectivo de bacilos esporulados. En este trabajo se aplicó tratamiento con calor, seguido de enfriamiento en baño de hielo, directamente a los homogeneizados de las muestras de tierra y de larvas muertas de *H. metabus*, colectadas en las zonas previamente indicadas. Este tratamiento contribuyó a la eliminación de los microorganismos en la fase de crecimiento vegetativo, favoreciendo la selección de bacilos esporulados. La siembra por diluciones seriadas en agar LB, permitió el aislamiento de colonias bien diferenciadas y la selección de aquellas que mostraban morfología circular,

irregular de color crema, aspecto harinoso y textura parecida a la cera. La siembra simultánea de cada colonia tanto en medios selectivos como diferenciales: agar LB conteniendo 100 µg/mL de penicilina, agar LB suplementado con 25 µg/mL de estreptomycin y agar sangre de carnero al 5%, permitió la selección de colonias con el fenotipo presuntivo para el grupo *B. cereus* (Pen^R Strep^S Hem⁺).

La identificación fenotípica realizada empleando el sistema Api ATB/Plus, galerías 50CHB (BioMérieux.), seguido de la observación de cristales refringentes en la fase de esporulación, permitió separar las cepas que fueron identificadas como *B. thuringiensis* (Figura 1) de otras especies del grupo de *B. cereus*. En todos los casos positivos se observaron esporas refringentes, ovales, en posición subterminal sin deformación del esporangio, similares a las descritas por Schnepf y col [30].

A partir de 8 muestras de suelos se aislaron en agar

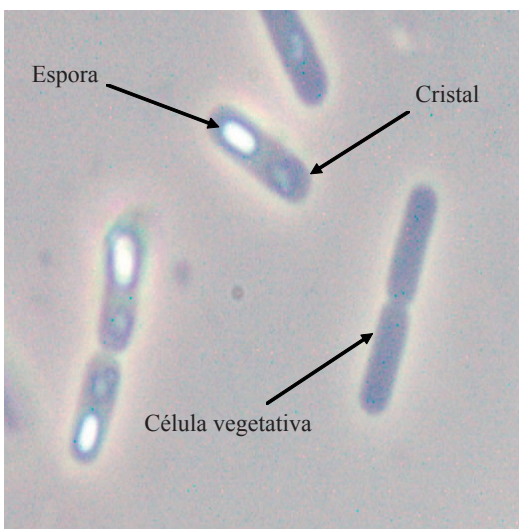


Figura 1. Cultivo de *B. thuringiensis* (CVCVM 1813), en fase estacionaria de crecimiento, visto en microscopio de contraste de fases a 1.000X.

LB 1454 colonias. De éstas se seleccionaron al azar 382 colonias (26%), corroborándose la presencia del fenotipo presuntivo (Pen^RStrep^SHem⁺) en 14 (3,7%) de los aislados. El Sistema Api ATB/Plus, empleando galerías 50CHB, no permitió establecer diferencias entre *B. thuringiensis* y otras especies del grupo *B. cereus*. Tres de las cepas mostraron un perfil considerado como dudoso y fueron catalogadas como *Bacillus* spp. En 5 cepas (35,7%) no se observó ni motilidad ni la formación de cristales parasporales, siendo consideradas como *B. mycoides*. Seis, con motilidad positiva, fueron consideradas como *B. cereus* con posibilidad de ser *B. thuringiensis*. Finalmente, la presencia de cristales parasporales fue demostrada en sólo 1 de los 14 aislados examinados, considerándose como *B. thuringiensis* (cepa CVCVM 1733). Bajo las condiciones empleadas fue posible identificar la presencia de *B. thuringiensis* en 7,1% de las colonias seleccionadas como Pen^RStrep^SHem⁺. Este resultado es consistente con reportados por otros laboratorios. Se ha estimado que la presencia de *B. thuringiensis* en suelos es

considerablemente baja en relación a la de otros bacilos esporulados [28, 29].

En el caso de los aislados de larvas muertas de *H. metabus*, se examinaron entre 3 y 5 larvas por cada una de las localidades seleccionadas para el muestreo. Del conjunto de los homogeneizados sembrados en agar LB se logró aislar un total de 56 colonias con la morfología y las características descritas previamente. En 29 (51,8%) de los casos se pudo observar el fenotipo Pen^RStrep^SHem⁺ presuntivo para el grupo *B. cereus*. De éstas, 18 fueron estudiadas mediante el empleo del sistema Api ATB/Plus, galerías 50CHB. Cuatro fueron consideradas como *B. mycoides*. En las 14 restantes, identificadas por el sistema Api como *B. cereus* con posibilidad de ser *B. thuringiensis*, se demostró la presencia de cuerpos parasporales en 9 (50%), y se consideraron como *B. thuringiensis* asignándoseles un código de registro en el CVCVM (Tabla 1). La elevada proporción de *B. thuringiensis* encontrada en muestras de larvas muertas, en relación a la encontrada en suelos, pudiera ser el resultado de la acción letal del complejo espora-cristales (δ -endotoxinas) en la fase larval de *H. metabus*. De hecho las esporas de *B. thuringiensis* cumplen un ciclo de germinación y crecimiento vegetativo en el intestino de insectos susceptibles, multiplicándose eficientemente en las larvas muertas que son utilizadas como sustrato. Sin embargo, en ausencia de condiciones óptimas para la multiplicación, estos bacilos entran en la fase esporogénica. Pareciera que, de acuerdo a los resultados presentados, la distribución de *B. thuringiensis* en el ambiente pudiera estar relacionada con la presencia y distribución de *H. metabus* en las áreas de muestreo [31].

Para confirmar la identificación de *B. thuringiensis* y establecer una diferencia clara entre los aislados considerados como nativos de aquellos que pudieran derivar de la aplicación de productos empleados en el control de *H. metabus*, se realizaron estudios de caracterización molecular empleando técnicas de ribotipificación. Esta técnica, basada en el análisis de la variabilidad de los fragmentos polimórficos identificados por hibridación con sondas de ADN del operón *rrnB* permite reconocer variedades o ribotipos entre cepas de una misma especie. [25-27].

La caracterización molecular se aplicó a un total de 23 cepas: 14 provenientes de larvas muertas y 9 de aislados de suelos colectados en zonas afectadas por *H. metabus*. En la Figura 2 se muestran los resultados más representativos de estas pruebas.

En cada una de las cepas analizadas se identificaron entre 7 y 8 fragmentos con tamaños moleculares que oscilaron entre 2,5 y 15 Kbp. Las bandas comunes registradas entre los 2,5 y 4 Kbp representan la región de homología de los genes rARN que es compartida por todos los miembros del grupo de *B. cereus*. [25-27]. La técnica permitió establecer diferencias entre especies del grupo *B. cereus* y entre cepas de la misma especie [32].

Entre los aislados provenientes de larvas muertas, incluidas en este estudio, las cepas CVCVM 1812, CVCVM 1813 y CVCVM 1814 mostraron coincidencia (coeficiente de

Tabla 1. Identificación y caracterización molecular (ribotipificación) de cepas de *B. thuringiensis* aisladas en suelos y larvas muertas de *H. metabus*.

			Identificación API 50CHB		Motilidad	Cristales	Ribotipificación		
	Proveniencia		<i>B. cereus</i> / posibilidad <i>B. thuringiensis</i>	<i>B. mycoides</i>			Librería DuPont	Índice de similitud	Identif. Riboprinter
CVCM 1819	Dipel 8L®		79.9%	20.1%	+	+	6034	0,99	<i>B.thuringiensis</i>
CVCM 1812	Pedernales		97.9%	2%	+	+	6034	0,92	<i>B.thuringiensis</i>
CVCM 1813	Guanoco		70.5%	29.4%	+/-	+	6034	0,93	<i>B.thuringiensis</i>
CVCM 1814	Morichal		61.6%	38.3%	-	+	6034	0,96	<i>B.thuringiensis</i>
CVCM 1831	Irapa		13.7%	82.4%	+	+	6028	0,89	<i>B.thuringiensis</i>
CVCM 1833	Irapa		80.3%	17.9%	+	+	6028	0,86	<i>B.thuringiensis</i>
CVCM 1834	Irapa		25.1%	67.8%	+	+	6028	0,98	<i>B.thuringiensis</i>
CVCM 1860	Irapa		22.2%	75.7%	-	-	6028	0,85	<i>B.thuringiensis</i>
CVCM 1863	El Paujil		23.6%	50.8%	+	+	6028	0,85	<i>B.thuringiensis</i>
CVCM 1815	Ajjes		99.9%	0.1%	+	+	6040	0,95	<i>B.thuringiensis</i>
CVCM 1862	Irapa		86.7%	7.7%	+	+	13212 6044	0,93 0,90	<i>B.cereus</i> <i>B.thuringiensis</i>
CVCM 1733	Guanoco	Perfil dudoso			+	+	6043	0,95	<i>B.thuringiensis</i>
CVCM 1861	El Paujil		76.4%	23.1%	+	-	13212	0,92	<i>B.cereus</i>
CVCM 1832	El Paujil		59.6%	40.4%	+	-	6082	0,94	<i>B.cereus</i>
CVCM 1835	Irapa		62.8%	36.9%	+	-	6082	0,89	<i>B.cereus</i>

Columnas de izquierda a derecha: 1. Número de registro del cultivo: CVCM (Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos); 2. Identificación de la localidad de procedencia de la muestra; 3. Identificación Api ATB/Plus % de similitud: *B. thuringiensis*/*B. cereus*; 4. Motilidad; 5. Presencia de cuerpos parasporales; 6. Dup: ribotipo asignado en el banco de datos del Ribo-Printer® y coeficiente de similitud; 7. Identificación Ribo-Printer®.

similitud entre 0,92 y 0,96) con el ribogrupa 6034 mostrado por la cepa control CVCM 1819 representativa de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD1. En los 6 aislados restantes se identificaron al menos dos ribogrupos bien diferenciados: ribogrupa 6028 (cepas CVCM 1831, CVCM 1833, CVCM 1834, CVCM 1860 y CVCM 1863) y ribogrupa 6040 (cepa CVCM 1815), distintos al ribogrupa 6034, con similitudes entre 0,85 y 0,98. Estos resultados permiten afirmar que, entre las cepas de *B. thuringiensis* aisladas de larvas, al menos 5 pertenecen al ribogrupa 6028, y se diferencian a nivel molecular de la cepa CVCM 1819, utilizada en preparados comerciales empleados en el control de *H. metabus* en la región nororiental de Venezuela (Figura 2).

En el caso de las cepas aisladas de suelos de la misma región, se encontró una amplia variabilidad entre los ribogrupos identificados. En sólo uno de los casos, la cepa CVCM 1733, identificada como ribogrupa 6043 (0,95 de similitud con *B. thuringiensis*), se ubicó en una categoría distinta a la representada por la cepa CVCM 1819 (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*). En esta cepa se demostró la formación de cuerpos parasporales, y puede ser considerada sin ambigüedades como una cepa de *B. thuringiensis* nativa aislada en suelos (Tabla 1).

El empleo de la técnica de ribotipificación, permitió identificar 11 cepas como pertenecientes a ribogrupos de *B. thuringiensis* con altos coeficientes de similitud. Tres cepas,

cada una aislada en una localidad diferente: Pedernales, Guanaco y Morichal, mostraron el mismo ribogrupa (6034) que identifica a la cepa control. Cinco fueron reconocidas como pertenecientes al ribogrupa 6028 (4 aisladas en la población de Irapa y 1 en El Paujil), 1 al ribogrupa 6040 (Caño Ajjes) y 1 ribogrupa 6044 (Irapa) (Tabla 1). La cepa CVCM 1733 (ribogrupa 6043) aislada de suelo en la región de Guanaco es distinta a la cepa CVCM 1814 (ribogrupa 6034) aislada de larvas recolectadas en la misma región. En el caso particular de la cepa CVCM 1860 (Tabla 1), aislada en Irapa, no fue posible demostrar la presencia de cuerpos parasporales. Sin embargo, el análisis por ribotipificación permite identificarla como *B. thuringiensis*, ribogrupa 6028. Este resultado, aparentemente contradictorio, podría ser interpretado como un caso en el cual la cepa pudo haber perdido el plásmido que codifica la proteína Cry o está afectada la expresión de los genes *cry* [13].

En conjunto, los resultados presentados permiten afirmar que, bajo las condiciones empleadas, fue posible aislar cepas de *B. thuringiensis* a partir de muestras de microambientes conteniendo otros bacilos del grupo *B. cereus*. Adicionalmente, permitieron establecer diferencias claras entre variantes genéticas de la misma especie. En el caso del estudio de muestras provenientes de larvas muertas de *H. metabus*, la proporción de cepas de *B. thuringiensis* aisladas fue considerablemente mayor a la encontrada a partir

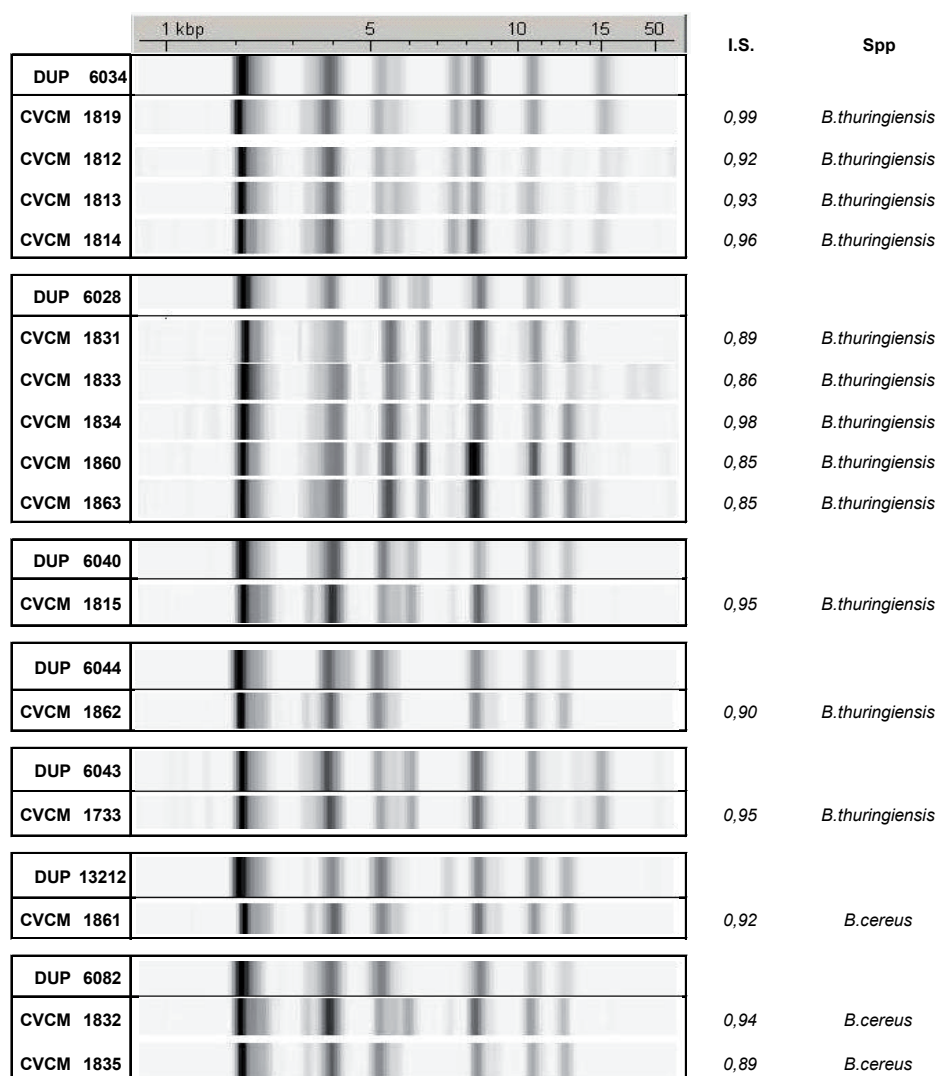


Figura 2. Representación gráfica dual de patrones de restricción *EcoRI* de la región rRNA (ribotipos) identificados en cepas de *B. thuringiensis* aisladas en suelos y larvas muertas de *H. metabus*.

Columnas de izquierda a derecha: 1. DUP número de registro de ribotipos según RiboPrinter®; 2. DUP 6034. Control *B. thuringiensis* var. *kurstaki*; 3. CVCM 1819. *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, aislado de Dipel 8L®; 4. Número de registro del cultivo: Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos; 5. Registro de bandas identificadas; 6. Índice de similitud; 7. Identificación de género/especie según el sistema RiboPrinter®.

de muestras de suelos. De allí que en los programas para el aislamiento de cepas autóctonas de *B. thuringiensis*, con potencial actividad patógena para este insecto, es altamente recomendable el examen de larvas muertas de *H. metabus* colectadas en áreas no tratadas previamente con productos elaborados en base a cultivos de *B. thuringiensis*.

El empleo de la técnica de ribotipificación permitió la caracterización molecular de las cepas aisladas y su categorización en ribogrupos, facilitando la diferenciación de los aislados de *B. thuringiensis* a nivel de cepas o de subespecies. A partir de este muestreo preliminar, se inició la construcción de una colección de *B. thuringiensis* que pudiera servir de base para el estudio de las funciones relacionadas con la actividad patógena específica para la polilla *H. metabus* a los fines de seleccionar aquellas que pudieran ser empleadas en la formulación de productos para el control de este insecto plaga. Las cepas identificadas y caracterizadas forman parte de la colección de *B. thuringiensis* del Centro

Venezolano de Colecciones de Microorganismos y están a disposición de los investigadores interesados.

Agradecimientos

A Frances Rowland Osborn y demás integrantes del grupo de investigación interdisciplinario Reto, creado para el estudio y control biológico del insecto plaga *Hylesia metabus* (palometa peluda) en la región nororiental de Venezuela. Se agradece a los árbitros y editores las observaciones y sugerencias. Trabajo financiado parcialmente por: Proyecto Reto: Sub-proyecto Bacteria. Fundacite Sucre. Ministerio del Poder Popular para Ciencia y Tecnología. Proyectos: CDCH-UCV UISI 03-09-6162-2005; CDCH-UCV-PG 03-00-5674-2004, CDCH-UCV PI. 03 00 6822 2007; CDCH-UCV PSU 03.7713.2009.y Fonacit Lab 96000677 Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos.

Referencias

1. Bavykin S, Lysov Y, Zakhariev V, Kelly J, Jackman J, Stahl D, Cherni A. Use of 16S rRNA, 23S rRNA and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. J Clin Microbiol. 2004; 42:3711-30.
2. Reyes-Ramírez A, Ibarra JE. Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* type strains isolates by using *Bacillus cereus* group-specific repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR analysis. Appl Environ Microbiol. 2005;1346-59.
3. Kaelin P, Gadani F. Occurrence of *Bacillus thuringiensis* on cured tobacco leaves. Curr Microbiol. 2000; 40: 205-9.
4. Porcar M, Caballero P. Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic event. J Appl Microbiol. 2000; 89:309-16.
5. Martin P, Travers R. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl Environ Microbiol. 1989;55:2437-42.
6. Arango J, Romero M, Orduz S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J Appl Microbiol. 2002;92: 466-74.
7. Hansen B, Damgaard P, Eilenberg J. Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. J Invertebr Pathol. 1998; 71:106-14.
8. Maduell P, Armengol G, Llagostera M, Orduz S, Lindow S. *B. thuringiensis* is a poor colonist of leaf surfaces. FEMS Microbiol Letters. 2008;55:212-9.
9. West A, Burges H, Dixon T, Wyborn C. Survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spores inoculate in soils: effects of the pH, moisture, nutrient availability and indigenous microorganisms. Soil Biol Biochem. 1985;17:657-65.
10. Henderson A, Dongzheng Y, Turnbull P. Differentiation of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus cereus* group bacteria using IS231-derived sequences. FEMS Microbiol Lett. 1995;128:113-8.
11. González J, Carlton B. Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*. Plasmid. 1980;3:92-8.
12. González J, Dulmage H, Carlton B. Correlating between specific plasmids and delta endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. Plasmid. 1981;5:351-65.
13. Slamti L, Lereclus D. Specificity and polymorphism of the PlcR-PapK quorum-sensing system in the *Bacillus cereus* group. J Biol. 2005;187:1182-7.
14. Chen ML, Tsen HY. Discrimination of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. J Appl Microbiol. 2002;92:912-9.
15. Burges HD. Control of insects by bacteria. Parasitol. 1982;79:117.
16. Ananda P, Sharma R, Malik V. The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Adv Appl Microbiol. 1996;42:1-46.
17. Wilson G, Benoit T. Alkaline pH activates *Bacillus thuringiensis* spores. J Invertebr Pathol. 1993; 62:87-9.
18. Fornés L, Hernández JV. Reseña histórica e incidencia en la salud pública de *Hylesia metabus* (Crammer) (Lepidoptera: Saturniidae) en Venezuela. Entomotropica. 2001;16:137-41.
19. Vitelli-Flores J, Gajardo R, Lage L, Fajardo Y, Dorta B, Rodríguez Lemoine V. Aislamiento y caracterización molecular, ribotipificación, de aislados autóctonos de *Bacillus thuringiensis* en larvas de *Hylesia metabus* y suelos de la región nororiental de Venezuela XIX Congreso Latinoamericano de Microbiología. Quito, Ecuador. Octubre 2008.
20. Informe técnico de la Gerencia de Saneamiento Ambiental y Control de Endemias. Fundasud, estado Sucre. Ministerio de Salud. Venezuela. 2006.
21. World Health Organization, 1985. Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) Geneva. UNDP, World Bank. WHO pp24.
22. Porcar M, Juárez-Pérez V. Aislamiento y establecimiento de una colección de *Bacillus thuringiensis*. En: *Bacillus thuringiensis* en el control biológico (Eds. A. Bravo y J. Cerón) Editorial Buena Semilla. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
23. Ferreira da Silva S, Cabral de Sousa Dias J, Monnerat R. Comparação entre três métodos de isolamento de bacilos entomopatogênicos. Brasília Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica 2002; 14.
24. Jensen G, Hensen B, Eilenberg J, Mahillon J. The hidden lifestyles of *Bacillus thuringiensis* and relatives. Environ Microbiol. 2003;5:631-40.
25. Grimond F, Grimond PAD. DNA fingerprinting. In Nucleic Acid Techniques in: Bacterial Systematic. Stackebrandt & Goodfellow eds. John Wiley. 1991.
26. Ito Y, Linuma Y, Baba H, Supino Y, Hasegawa Y, Shimokata K, Ichiyama S, Hasegawa T, Ohta M. Evaluation of automated ribotyping system for characterization and identification of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated in Japan. Jpn J Infect Dis. 2003;56:200-4.
27. Priest FG, Kaji DA, Rosato YB, Canhos VP. Characterization of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria by ribosomal gene restriction fragment length polymorphisms. Microbiol. 1994;140:1015-22.
28. DeLucca AJ, Simonson JG, Larson AD. *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States. Can J Microbiol. 1981;27:865-70.
29. Santana MA, Moccia CC, Gillis AE. *Bacillus thuringiensis* improved isolation methodology from soil samples. J Microbiol Meth. 2008;75:357-8.
30. Schnep E, Crikmoere N, VanRie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler D, Dean D. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal protein. Microbiol. Mol Biol Rev. 1998;62:775-806.
31. Bravo A, Sarabia S, López L, Ontiveros H, Abarca C, Ortiz A, Ortiz M, Lina L, Villalobos F, Pena G, Núñez-Valdez M, Soberón M, Quintero R. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. Appl Environ Microbiol. 1998;64:4965-72.
32. Ash CJ, Farrow AE, Forsch M, Stackebrandt E, Collins MD. Comparative analysis of *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S tARN. Int J Syst Bacteriol. 1991;41:343-6.