

# Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* como método para predecir la susceptibilidad sobre insectos lepidópteros, dípteros y coleópteros plaga de la agricultura

## Microscopic, biochemical and molecular characterization of Colombian native strains of *Bacillus thuringiensis*

Rosa Rodríguez-Tolosa <sup>a</sup>, Roger Cifuentes-Vega <sup>a</sup> y Javier Hernández-Fernández <sup>ab</sup>

<sup>a</sup> Grupo de Investigación Genética, Biología Molecular y Bioinformática, GENBIMO, Departamento de Ciencias Naturales y Ambientales, Maestría en Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias e Ingeniería y Ciencias Naturales, Universidad Jorge Tadeo Lozano Colombia  
<sup>b</sup> [javier.hernandez@utadeo.edu.co](mailto:javier.hernandez@utadeo.edu.co) | <https://orcid.org/0000-0001-8442-9266>

**Citation:** Rodríguez-Tolosa, R., Cifuentes-Vega, R., y Hernández-Fernández, J. (2023). Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* como método para predecir la susceptibilidad sobre insectos lepidópteros, dípteros y coleópteros plaga de la agricultura. *Mutis*, 13(1), 1- 34.  
<https://doi.org/10.21789/22561498.1963>

**Recibido:** 6 de octubre de 2022  
**Aceptado:** 1 de diciembre de 2022

**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee *Mutis*. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### RESUMEN

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es una bacteria entomopatógena utilizada en el control de insectos lepidópteros, coleópteros y dípteros plaga. Por la alta variabilidad genética en las proteínas Cry insecticidas, la caracterización de cepas de *Bt* representa un potencial para descubrir proteínas y actividades biológicas novedosas. En este estudio se realizó la caracterización microscópica, bioquímica y molecular de 20 cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* pertenecientes al banco de cepas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano (UJTL) con el fin de predecir su actividad biológica y su posible uso en control biológico. Las cepas caracterizadas se aislaron previamente en los departamentos de Boyacá (4), Cundinamarca (2), Huila (1) y Santander (5) y del ecosistema de manglar de la Ciénaga Grande de Santa Marta (8). Por microscopía de contraste de fases se observaron cristales amorfos (81.8%), triangulares, cuadrados y bipiramidales (18.2%). Utilizando PCR se identificaron entre 2-5 genes *cry1* en 11 cepas nativas. Ocho cepas contienen los genes *cry1Aa*, *cry1Ba* y *cry1Ca*, (72.7%), cinco el gen *cry1Ab* (45.4%), tres el gen *cry1Ac* (27,2%) y únicamente dos cepas presentaron el gen *cry1Da* (18.1%). Se obtuvo el perfil electroforético de proteínas totales para las 11 cepas, encontrando proteínas con pesos moleculares entre 25-140 kDa e identificando cepas con perfiles electroforéticos con dos bandas (45.4%), tres (27.2%), cuatro (18.1%) y seis bandas de proteínas (9.1%). La secuenciación nucleotídica del gen ARNr 16S arrojó que cinco cepas nativas seleccionadas al azar presentaron un porcentaje de similitud por encima del 94% con relación a las secuencias depositadas en la base de datos del NCBI. De estas cuatro cepas, tres tuvieron un porcentaje de similitud del 99%, 98% y del 97% con el género *Bacillus sp* (ZSUJTL67, ZMUJTL63 y ZCUJTL3, respectivamente) y las otras dos cepas mostraron porcentajes de similitud del 96% y 94% con *Bacillus thuringiensis* (ZMUJTL94 y ZMUJTL96). De acuerdo con el análisis realizado, se relacionaron los espectros de susceptibilidad de 10 especies de insectos de importancia para la agricultura colombiana: cinco lepidópteros, tres dípteros y dos coleópteros frente a las 11 cepas nativas evaluadas, encontrándose que una de estas cepas presenta una posible actividad biológica sobre estas 10 especies de insectos (ZMUJTL94). La metodología

utilizada permite predecir la actividad biológica de las cepas antes de la realización de ensayos biológicos en los que se emplean mucho tiempo y representan altos costos.

**Palabras clave:** *Bacillus thuringiensis*; genes cry; SDS PAGE; PCR; cepas nativas; ciencias naturales.

## ABSTRACT

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) is an entomopathogenic bacterium used to control insect pest *Lepidoptera*, *Coleoptera* and *Diptera*. For its high genetic variability in the Cry proteins, characterization of *Bt* strains in worldwide represents a potential to discover new proteins and biological activities. In this study was performed the microscopic, biochemical and molecular characterization of 20 native strains of *Bacillus thuringiensis* that belong to the UJTL bank of strains, in order to predict the biological activity and possible uses in biological control. Native strains were isolated from the departments of Boyacá (4), Cundinamarca (2), Huila (1) and Santander (5) and the mangrove ecosystem of the Ciénaga Grande de Santa Marta (8). For microscopic characterization, amorphous, square, triangular and bipyramidal crystals were observed. Using PCR 11 strains amplified between 2-5 *cry1* genes. Eight strains had the *cry1Aa* gene (72.7%), five contained the *cry1Ab* gene (45.4%) and three contained the *cry1Ac* (27.2%) gene and two strains had the *cry1Da* gene only (18.1%). Eight strains also amplified *cry1Ba* gene and *cry1Ca* (72.7% for each gene) and only two strains showed the *cry1Da* gene (18.1%). Electrophoresis on denaturant polyacrylamide gel (SDS-PAGE) was used, where the total of protein electrophoretic profile for the 11 strains was obtained. In this profile it was found that the molecular weights obtained from the total proteins visualized in the gels ranged from 25 to 140 kDa and strains revealed two bands (45.4%), three bands (27.2%), four bands (18.1 found %) and 6 bands (9.1%). Nucleotide sequencing of 16S rRNA gene showed that, five native strains randomly selected showed a similarity percentage above 94% compared with the sequences deposited in the NCBI database. Of these five strains, three had a similarity percentage of 99%, 98% and 97% with *Bacillus sp.* (ZSUJTL67, ZMUJTL63 and ZCUJTL3 respectively) and the other two strains showed similarity percentages of 96% and 94% with *Bacillus thuringiensis* (ZMUJTL94 and ZMUJTL96).

According to analysis, we related the spectra of susceptibility of 10 species of insects of importance for Colombian agriculture: five *Lepidoptera*, three *Diptera* and two *Coleoptera*, compared to 11 native strains evaluated, finding that one of these strains presents a possible biological activity on these 10 species of insects (ZMUJTL94 strain). This method allows to predict the biological activity of the strains before to biological testing that it take time and high costs.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*; cry genes; SDS PAGE; PCR; native strain; natural sciences.

## INTRODUCCIÓN

En el sector agrícola, las pérdidas ocasionadas por insectos en los diferentes cultivos comerciales representan entre el 30 y 80% de los costos de producción y en ocasiones pueden llegar a ser del 100% en algunos cultivos y épocas del año (Bravo y Cerón, 2004). Los insecticidas químicos representan el principal método de control de plagas, produciendo serios problemas de contaminación ambiental por su uso indis-

criminado como eliminación de fauna benéfica, contaminación de fuentes de agua y del aire, presencia de residuos tóxicos en los alimentos que afectan la salud humana y resistencia de insectos a los plaguicidas (Bravo y Soberón, 2008). El control biológico de plagas mediante el uso de microorganismos entomopatógenos representa una alternativa atractiva de menor impacto ambiental para el manejo de insectos de importancia económica en la agricultura (Hernández, 2015; Ibarra *et al.*, 2006) y abarca una amplia gama de agentes entomopatógenos o sustancias que han sido producidas por estos, que presentan variación en sus propiedades, en la forma como actúan sobre las plagas y en su comportamiento en el ambiente (De Liñan, 2001).

*Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria Gram-positiva, esporulada nativa del suelo, ubicua, debido a que se ha aislado en diferentes partes del planeta y de muy diversos ambientes. Se caracteriza por la producción de cristales parasporales durante la fase estacionaria de su ciclo de crecimiento (Schnepf *et al.*, 1998) compuestos por proteínas insecticidas (ICP) o proteínas Cry, cuya característica más importante es su especificidad sobre insectos. Las proteínas Cry, al ser ingeridas por larvas de insectos susceptibles, se solubilizan en el medio alcalino del intestino formando proteínas activas capaces de interactuar con receptores específicos y desencadenar la inanición, septicemia y muerte de las larvas (Ammounh *et al.*, 2011; Bravo *et al.*, 2011; Arango *et al.*, 2002; Hernández, 2016). Estas proteínas han sido profundamente estudiadas debido a sus propiedades bio-pesticidas con el fin de encontrar proteínas novedosas y con amplia actividad biológica (Crickmore *et al.*, 1998).

La mezcla de las ICP de varias cepas de Bt se han utilizado como principio activo de formulaciones comerciales que se han venido usando como bioinsecticidas para el control de órdenes de insectos como himenópteros, coleópteros, dípteros, lepidópteros, plagas de una amplia gama de cultivos agrícolas desde hace casi medio siglo (Bravo *et al.*, 2011; Hernández, 2016). Actualmente, más del 90% de los bioplaguicidas comerciales a base de entomopatógenos son formulaciones basadas en *B. thuringiensis* (Sauka & Benintende, 2008; Muñiz, 2014; Galvis y Moreno, 2014). También su actividad tóxica, se ha extendido a protozoarios, trematodos, colémbolos y lombrices de tierra, entre otros, de interés agrícola (Velasco, 2010). Esta propiedad única hace de Bt un agente prometedor en el control biológico de insectos plaga, relevantes para la agricultura y la medicina (Ohba, 1996).

Además de sus propiedades insecticidas, Bt produce otros compuestos activos y factores de virulencia; algunos de ellos con buenas perspectivas de aplicarse en el control biológico, no sólo de insectos plaga o de vectores de enfermedades, sino también de bacterias, hongos y parásitos (Gillis, 2013; Huerta, 2013). Entre estos compuestos se encuentran:  $\alpha$ -exotoxinas,  $\beta$ -exotoxinas, quitinasas, citolisinas (proteínas Cyt), proteínas insecticidas vegetativas (proteínas VIP), lipopéptidos, autolisinas, flagelinas, enterotoxinas, hemolisinas, fosfolipasas, zwittermicinas y bacteriocinas (Gillis, 2013; Hernández, 2016). También se ha descubierto cepas de Bt que producen y muestran una fuerte actividad AHL-lactonasa que es capaz de inhibir el "quorum sensing" (mecanismo de comunicación celular bacteriana) mediado por N-Acil-homoserin-lactonas (Gillis, 2013).

Bravo *et al.* (1998) y Carreras *et al.* (2004) plantearon que las proteínas insecticidas contra insectos Lepidópteros pertenecen a los grupos Cry1 y Cry9, las toxinas

activas contra coleópteros son las proteínas de los grupos Cry3, Cry7 y Cry8, las proteínas tóxicas contra nemátodos son Cry5, Cry12, Cry13, Cry14, y contra dípteros son Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19 y proteínas Cyt. El grupo de proteínas Cry2 son activas tanto para Dípteros, como para Lepidópteros. También los subgrupos Cry1B y Cry1I tienen doble actividad contra lepidópteros y coleópteros. Para su clasificación en la actualidad, las toxinas Cry se clasifican por su secuencia primaria de aminoácidos y más de 500 secuencias diferentes se han organizado en 74 grupos (Cry1-Cry74) (Crickmore, 2016; Crickmore *et al.*, 2011).

La caracterización de cepas de *Bt* se realiza en tres pasos: 1) microscópica, que identifica la presencia, forma y cantidad de cristales parasporales y esporas presentes en los aislamientos nativos, los cuales se pueden agrupar de acuerdo con su capacidad para producir y acumular cristales; 2) bioquímica, que determina el perfil de proteínas totales presentes en una mezcla de esporas y cristales de las cepas o aislamientos nativos. Se realizan comparaciones entre la aparición de bandas de proteínas con pesos moleculares específicos y los pesos moleculares de las proteínas Cry de las cepas de referencia y se relacionan con una posible actividad biológica sobre una determinada familia o especie de insecto; y 3) molecular, en donde se identifican los genes *cry* presentes en aislamientos de *Bt* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Hernández *et al.*, 2012; Bravo y Cerón, 2004; Katara *et al.*, 2012).

Para verificar la identificación de algunos de los aislamientos nativos evaluados, se realizó la secuenciación del gen 16S. El ARNr 16S (rrs) es un polirribonucleótido codificado por el gen rrs o ADN ribosomal ARNr 16S (ADN 16S) incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. El ARNr 16S actúa como un cronómetro molecular al presentar un alto grado de conservación que permite su utilización para la identificación bacteriana o la asignación de género y especie. La secuencia de este gen presenta de forma aproximada 1500 pb (Bou, 2011; Rodicio y Mendoza, 2004).

La actividad insecticida de una cepa de *Bt* se puede revelar mediante la evaluación con bioensayos, empleando el insecto de interés, pero la realización de dichas pruebas es en cierta medida compleja, demorada y costosa. La caracterización de cepas de *Bt* a nivel microscópico, bioquímico y molecular realizada antes del ensayo biológico, constituye una herramienta que aumenta las posibilidades de identificar en menor tiempo cepas novedosas para el control biológico y/o cepas más tóxicas y ventajosas que las que se conocen y comercializan actualmente. Además, permite clasificar y seleccionar las cepas con mayor potencial insecticida, de acuerdo con la presencia de genes *cry* específicos y su capacidad de producir proteínas tóxicas contra una determinada especie o familia de insectos. Algunos de estos genes podrían codificar nuevas proteínas que permitirán ampliar el espectro de acción de los insecticidas y la producción de bioplaguicidas más efectivos basados en *Bt* o ampliar su uso para la producción de plantas u organismos transgénicos utilizados para la ingeniería genética resistentes al ataque de insectos lepidópteros plaga (Hernández, 2015; Orozco *et al.*, 2012).

En el presente estudio se caracterizaron a nivel microscópico, bioquímico y molecular 20 cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de municipios de cuatro departamentos de Colombia: Cundinamarca, Huila, Boyacá y Santander, y de un ecosistema particular, la Ciénaga Grande de Santa Marta (CGSM). Se identificaron las

posibles proteínas Cry presentes en estos aislamientos nativos comparándolas con las de las cepas de referencia de las variedades *kurstaki HD1* y *aizawai HD 137* y se identificó molecularmente el contenido de diferentes genes específicos en estos aislamientos de *Bt* pertenecientes a las familias *cry1* para predecir su posible actividad biológica sobre larvas de insectos susceptibles.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Jorge Tadeo Lozano sede Bogotá, en donde se adelantó la caracterización microscópica, bioquímica y molecular de las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*.

### Obtención de las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*

Las cepas utilizadas en este estudio fueron cedidas por el Banco de Cepas de Bacilos Esporulados de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Las cepas estaban conservadas a 4 °C en tiras de papel filtro inoculadas con una suspensión de esporas asépticamente guardadas en ampollitas de color ámbar previamente esterilizadas y selladas. En la Tabla 1 aparece el listado de las 20 cepas seleccionadas.

**Tabla 1.** Listado de los 20 aislamientos nativos evaluados en este estudio. Se presenta para cada uno el número de registro y su procedencia.

AISLAMIENTOS NATIVOS CARACTERIZADOS		
Departamento	Municipio	Registro
Cundinamarca	Chía	ZCUJTL3
	Susa	ZCUJTL13
Boyacá	Santa Sofía	ZBUJTL28
	Villa de Leiva	ZBUJTL32
	Sutamarchan	ZBUJTL37
	Sutamarchan	ZBUJTL44
Santander	Mesa de los Santos	ZSUJTL67
	Piedecuesta	ZSUJTL74
	Lebrija	ZSUJTL82
	Girón	ZSUJTL86
	Betulia	ZSUJTL62
Huila	Garzón	ZHUJTL46
Ciénaga Grande de Santa Marta (Magdalena)	Pueblo Viejo	ZMUJTL4
		ZMUJTL27
		ZMUJTL63
		ZMUJTL81
		ZMUJTL96
		ZMUJTL105
		ZMUJTL110
		ZMUJTL94

Fuente: elaboración propia.

### **Siembra y cultivo de las cepas**

Las tiras de papel filtro que contenían esporas de las cepas nativas se colocaron en cajas de Petri con medio de cultivo lb (Luria Bertani) (10 g/l de triptona, 10 g/l de NaCl, 5 g/l de extracto de levadura y 13 g/l de agar-agar). Luego se incubaron a 37 °C por 24 horas. Seguidamente, se realizó resiembra por triplicado seleccionando las colonias típicas formadas de Bt, las cuales se incubaron a 30 °C por siete días, después de los cuales se recolectó toda la biomasa en tubos eppendorf que se mantuvieron a 4 °C para los análisis posteriores.

### **Caracterización microscópica de las cepas nativas**

La observación se realizó a partir de un inóculo crudo sin tinción utilizando el microscopio de contraste de fases Zeiss Primo Star (100X).

### **Caracterización Bioquímica**

La caracterización bioquímica de los aislamientos nativos que dieron positivo para la presencia de esporas y cristales en la caracterización microscópica, se llevó a cabo mediante la electroforesis de proteínas totales en gel denaturante de poliacrilamida (duodecil-sulfato de sodio, SDS-PAGE) de extractos crudos de esporas y cristales de las cepas analizadas para relacionar la presencia de bandas de proteínas de los aislamientos con las bandas de proteínas Cry de las cepas de referencia: *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* - HD1 y *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* - HD137.

### **Obtención de extractos crudos de proteínas**

Los extractos crudos de proteínas se obtuvieron recogiendo con asas bacteriológicas toda la biomasa celular presente en la superficie del agar, a partir de un cultivo de 7 a 10 días de las cepas seleccionadas en medio Luria Bertani para luego ser resuspendida en 250 µl de solución buffer o tampón de solubilización (NaHCO<sub>3</sub> 50 mM, NaCl 100 mM, DDT 10 mM). Esta biomasa se conservó a 4 °C hasta su utilización en el análisis electroforético.

Las muestras se prepararon tomando entre 20 a 40 µl de extracto crudo de proteínas, 20 µl de buffer de carga Laemmli (1970) y 1,6 µl de 2-mercaptoetanol. Posteriormente, cada muestra se sometió a tres rondas de sonicación, cada una de 20 segundos de duración, con el fin de generar la lisis celular y la ruptura de los cristales. Después, la mezcla se colocó a baño maría en ebullición durante 10 minutos. Luego, se sirvieron 20 µl de cada muestra en el gel de servido y se utilizó 5 µl del marcador de peso molecular de proteínas Opti-Protein XL (abm,- Canadá) para poder identificar las posibles proteínas Cry presentes en las cepas estudiadas.

### **Corrido electroforético en gel denaturante de poliacrilamida (SDS - PAGE)**

Los geles se prepararon siguiendo las instrucciones de la casa comercial fabricante (Mini-PROTEAN® Tetra Cell - Bio-Rad, EE. UU.). Los corridos electroforéticos se llevaron a cabo a 200 voltios durante 40 minutos y los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 al 0.1% durante 30 minutos, para posterior lavado y decoloración del fondo durante una a cuatro horas en una mezcla entre agua destilada-metanol-ácido acético (50%, 40%, 10%, respectivamente). Una vez decolorados los geles, se determinó el peso molecular de las bandas de proteínas presentes en cada muestra según el marcador de peso molecular utilizado.

### **Extracción y cuantificación del ADN**

#### **Extracción de ADN plasmídico**

En un tubo de eppendorf de 1.5 ml se adicionaron 100 µl de la solución I (50 mM de Glucosa, 25 mM de Tris-HCl pH 8,0 y 10 mM de EDTA pH 8,0) y de 8-10 colonias del bacilo, sembradas en agar LB por 12-18 horas. Se homogenizó por inversión tres o cuatro veces y se adicionaron 200 µl de la solución II [0,2 N NaOH y 1% (p/v) de Dodecil sulfato sódico- SDS- (NaCl<sub>12</sub>H<sub>25</sub>SO<sub>4</sub>), el cual actúa como detergente anfipático, rompiendo las membranas y produciendo lisis celular] a cada tubo, se cerró y se mezcló por inversión suave (cinco veces) y se mantuvo en frío de dos a tres minutos. Luego se adicionaron 150 µl de la solución III (5 M de acetato de potasio, 11,5 ml de ácido acético glacial y 28,5 ml de agua fría) y se dispersó por inversión varias veces. Posteriormente se colocó el tubo en hielo por tres a cinco minutos, se centrifugó a máxima velocidad por cinco minutos a 4 °C y luego se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se adicionó un volumen igual de cloroformo-álcohol isoamílico, se mezclaron las fases orgánica y acuosa por vórtex y luego se centrifugó la emulsión a 14 000 rpm por dos minutos a 4 °C (Sambrook & Russell, 2001).

Posteriormente, se transfirió la capa superior acuosa a un tubo nuevo, se adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente para permitir que los ácidos nucleicos se precipiten, se mezclaron por inversión, se dejó reposar la mezcla por dos minutos a temperatura ambiente, se recogió el precipitado de ácidos nucleicos por centrifugación a máxima velocidad durante cinco minutos a 4°C, se removió el sobrenadante por aspiración suave y se invirtió el tubo sobre el papel. Luego, se adicionó al pellet obtenido 1 ml de etanol al 70% y se homogenizó por inversión y se centrifugó por dos minutos a 4 °C para recuperar el ADN. Nuevamente, se removió el sobrenadante suavemente, se dejó secar el pellet a temperatura ambiente hasta que el etanol se evaporó (5-10 minutos). Posteriormente, se disolvieron los ácidos nucleicos en 30 µl de agua (pH 8,0). Finalmente, se pasó por el vórtex suavemente por 10 segundos y se almacenó el producto de ADN a -20 °C (Sambrook & Russell, 2001).

Los DNA extraídos anteriormente se cuantificaron mediante un corrido electroforético en gel de agarosa al 1% en tampón TBE 0,5 X, en una cámara de electroforesis horizontal Gel XL Ultra V-2 Labnet International. Después del corrido,

los geles se observaron y se fotografiaron en el fotodocumentador UVP Gel-Doc-It™ Imaging System (\*UVP, LLC), con el software Visión Works and Analisis versión 6.4.3. (UVP LSC. UK).

### Amplificación de los genes cry1 generales mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La caracterización molecular se realizó utilizando la reacción en cadena de la polimerasa PCR. Para llevar a cabo esta reacción, se emplearon pares de oligonucleótidos universales reportados previamente (Bravo *et al.*, 1998). Estos oligonucleótidos amplifican regiones conservadas de los genes de las familias cry1.

En la Tabla 2 se muestran las características de los oligonucleótidos generales utilizados junto con el gen reconocido y el tamaño del producto de PCR esperado.

**Tabla 2.** Oligonucleótidos universales que reconocen 25 genes pertenecientes a la familia cry1.

Primer	Posición	Gen que se reconoce	Peso pb	Secuencia
cry1 General	1472 - 2029	cry1Aa, cry1 Ad	558	5'CTGGATTTACAGGTGGGGATAT3' 5'TGAGTCGCTTCGCATATTTGACT3'
	1475 - 2032	cry1Ab, cry 1Ae	558	
	1472 - 2035	cry1Ac	564	
	1636 - 2194	cry1Af	558	
	1559 - 2115	cry1Ba	558	
	1577 - 2131	cry1Bb	555	
	2181 - 2723	cry1Bc	555	
	1463 - 2017	cry1 Ca	594	
	1442 - 1984	cry1 Cb	555	
	1454 - 2011	cry 1 Da, cry Db	543	
	1451 - 2005	cry 1 Ea, cry 1 Fa	558	
	1936 - 2490	cry 1 Eb	555	
	1430 - 1987	cry 1 Fb	555	
	1457 - 2005	cry 1 G	558	
	2181 - 2723	cry 1 Ha	549	
	1583 - 2140	cry 1 Hb	543	
	1439 - 1993	cry 1 Eb	558	
	1615 - 2172	cry 1la, cry1lb	555	
	2012 - 2565	cry 1 Ja	558	
	1472 - 2029	cry 1 K	558	

Fuente: Bravo *et al.* (1998).

Para cada reacción de la pcr se utilizó 2,5 mM deMgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de oligonucleótidos, 2 U de Taq-dna polimerasa, 1X de buffer de pcr, 200 µM de dNTP y 60 a 100 ng de adn. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Labocon de doble bloque y el volumen final utilizado fue de 20 µl para todas las reacciones (Bravo *et al.*, 1998). El programa de termociclado fue: una denaturación inicial a 95



°C por cinco minutos, para 35 ciclos de amplificación (con un ciclo que consistía en la denaturación a 95 °C por un minuto, hibridación a 51 °C por un minuto 50 segundos, elongación a 72 °C por un minuto) y una elongación final a 72 °C por 10 minutos.

### Amplificación de los genes *cry1* específicos por PCR

Las cepas nativas esporuladas que dieron positivo para la presencia de genes *cry1* generales, se sometieron a dos rondas de PCR múltiple a partir de dos mezclas de seis oligonucleótidos cada una (Mezcla A y Mezcla B), que reconoce tres genes específicos en cada reacción. Los oligonucleótidos empleados reconocen los genes *cry1Aa*, *cry1Ab* y *cry1Ac* (Mezcla A), *cry1Ba*, *cry1Ca* y *cry1Da* (Mezcla B) (Cerón *et al.*, 1994).

En la Tabla 3 se muestran las características de los oligonucleótidos específicos utilizados para identificar los subgrupos de genes de la familia *cry1*.

**Tabla 3.** Características de los oligonucleótidos específicos para identificar los subgrupos de genes de la familia *cry1*.

	Pareja de oligonucleótidos (posición)	Gen reconocido	Tamaño del producto de PCR	Secuencia 5'- 3'
MEZCLA A	<b><i>cry1Aa</i></b>	<i>cry1Aa</i>	246 pb	5'TTATACTTGGTTCAGGCC3'
	1(1105-1125)			5'TTGGAGCTCTCAAGGTGTA3'
	2(1332-1351)			
	<b><i>cry1Ab</i></b>	<i>cry1Ab</i>	216 pb	5'AACAATCTGTCTTGAC3'
	1(1133-1153)			5'CTCTTATTACTTACTACTAC3'
	2(1328-1348)			
	<b><i>cry1Ac</i></b>	<i>cry1Ac</i>	180 pb	5'GTTAGATTAATAGTAGTG3'
	1(1495-1514)			5'TGTAGCTGGTACTGTATTG3'
2(1656-1674)				
MEZCLA B	<b><i>cry1Ba</i></b>	<i>cry1Ba</i>	367 pb	5'CTTCATCACGATGGAGTAA3'
	1(1007-1025)			5'CATAATTTGGTCGTCTGTT3'
	2(1355-1374)			
	<b><i>cry1Ca</i></b>	<i>cry1Ca</i>	130 pb	5'AAAGATCTGGAACACCTTT3'
	1(1306-1325)			5'CAAACCTAAATCCTTACAC3'
	2(1416-1436)			
	<b><i>cry1Da</i></b>	<i>cry1Da</i>	290 pb	5'CTGCAGCAAGCTATCAA3'
	1(837-856)			5'ATTTGAATTGTCAAGGCTG3'
2(1107-1127)				

Fuente: Cerón *et al.* (1994).

El volumen final utilizado para cada reacción fue de 25  $\mu$ l, que contenían 0,5  $\mu$ M de la mezcla de primers específicos, 5 unidades de Green Go Taq-DNA polimerasa (Promega, USA; la cual contiene el buffer de PCR, los dNTP y  $MgCl_2$ ), y 30 ng/ $\mu$ l de ADN. Las condiciones de amplificación incluyeron una denaturación inicial a 94 °C por cinco minutos, luego siguieron 30 ciclos de amplificación (con un ciclo de denaturación a 94 °C por un minuto, hibridación a 52 °C por un minuto, elongación a 72 °C por un minuto) y una elongación final a 72 °C por 10 minutos. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Labocon de doble bloque.

### **Corrido electroforético en gel de agarosa**

Para comprobar la presencia de los genes *cry1* generales amplificados, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% y para los genes *cry1* específicos amplificados se realizó una electroforesis al 2%.

Los dos geles se tiñeron con Safe View (NBS Biologicals, UK) y se corrieron en tampón TBE 0,5 X en una cámara Horizontal Gel XL Ultra V-2 Labnet International. Las muestras con los productos de la amplificación se tiñeron con buffer de carga, azul de bromofenol y se sirvieron 5  $\mu$ l en cada pozo junto con el marcador de peso molecular Hyperladder V (Bioline, UK). La electroforesis se llevó a cabo a 100 voltios durante 25 a 30 minutos, y los geles con las bandas se observaron y se fotografiaron en el fotodocumentador "UVP Gel-Doc-It™" Imaging System (\*UVP, LLC) con el software Visión Works and Analisis versión 6.4.3. (UVP LSC. UK).

### **Identificación de las cepas mediante secuenciación del gen ARNr 16S**

Se realizó la amplificación del gen ARNr 16S a partir del ADN extraído a cinco cepas al azar con el objetivo de verificar el género y especie de las cepas analizadas. La amplificación por PCR del gen se realizó utilizando los cebadores universales WBAC2 (5'-CCCGGGAACGTATTCACCGCG-3') y 63f (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') (López *et al.*, 2003). La reacción se llevó a cabo en un termociclador Labocon de doble bloque durante 30 ciclos (95 °C durante un min., 62 °C durante 1 min., 72 °C durante un min.) en un volumen final de 25  $\mu$ l de mezcla de reacción.

La mezcla de reacción contenía 0.5  $\mu$ M de oligonucleótidos específicos, cinco unidades de Green Go Taq-DNA polimerasa (Promega, USA) que ya incluye 0.2 mM de dNTP, 1.5 mM de  $MgCl_2$ , 5X de buffer de carga y 50 ng de ADN.

Los productos de la PCR se analizaron de la misma forma que para los genes *cry* descritos anteriormente, empleando el marcador de peso molecular VC1Kb DNA ladder (Vivantis technologies). Después de verificar la presencia de las bandas, estas se cortaron del gel de agarosa para purificarlas usando el kit GF-1 Gel DNA Recovery Kit (Malasia, HQ) siguiendo las instrucciones de la casa comercial fabricante Vivantis.

Los productos de la PCR purificados se secuenciaron de forma automatizada (Applied Biosystems 373<sup>®</sup> Stretch) (Laboratorio SSGMOL, Universidad Nacional de Colombia). Las secuencias obtenidas se ensamblaron con el programa CLC DNA

WorkBench 5.6.1 (CLC Bio, Dinamarca). La comparación e identificación a nivel de género y especie de cada una de las secuencias se realizó con la herramienta de búsqueda de alineamiento básico local, BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Selección de las cepas nativas

Se analizaron en total 20 cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas en el año 2008 del ecosistema de manglar de la Ciénaga Grande de Santa Marta y de los departamentos de Cundinamarca en los municipios de Chía y Susa; Boyacá en los municipios de Santa Sofía, Villa de Leyva y Sutamarchán; Santander en los municipios de Mesa de los Santos, Piedecuesta, Lebrija, Girón y Betulia y del Huila en el municipio de Garzón. Las cepas de referencia HD-1 *B. thuringiensis* var. *Kurstaki* y HD-137 *B. thuringiensis* var. *Aizawai*, se utilizaron como control positivo y se mantienen en el mismo laboratorio.

Los aislamientos nativos sembrados en agar Luria Bertani a las 24 horas, presentaron colonias características del género *Bacillus* sp. acorde con la literatura consultada, de color crema, bordes irregulares, ligeramente planas, opacas y cremosas. Además, en su mayoría, estas colonias presentaron la tendencia a crecer en masa (Agudelo *et al.*, 2002; Carreras, 2009; Bou *et al.*, 2011).

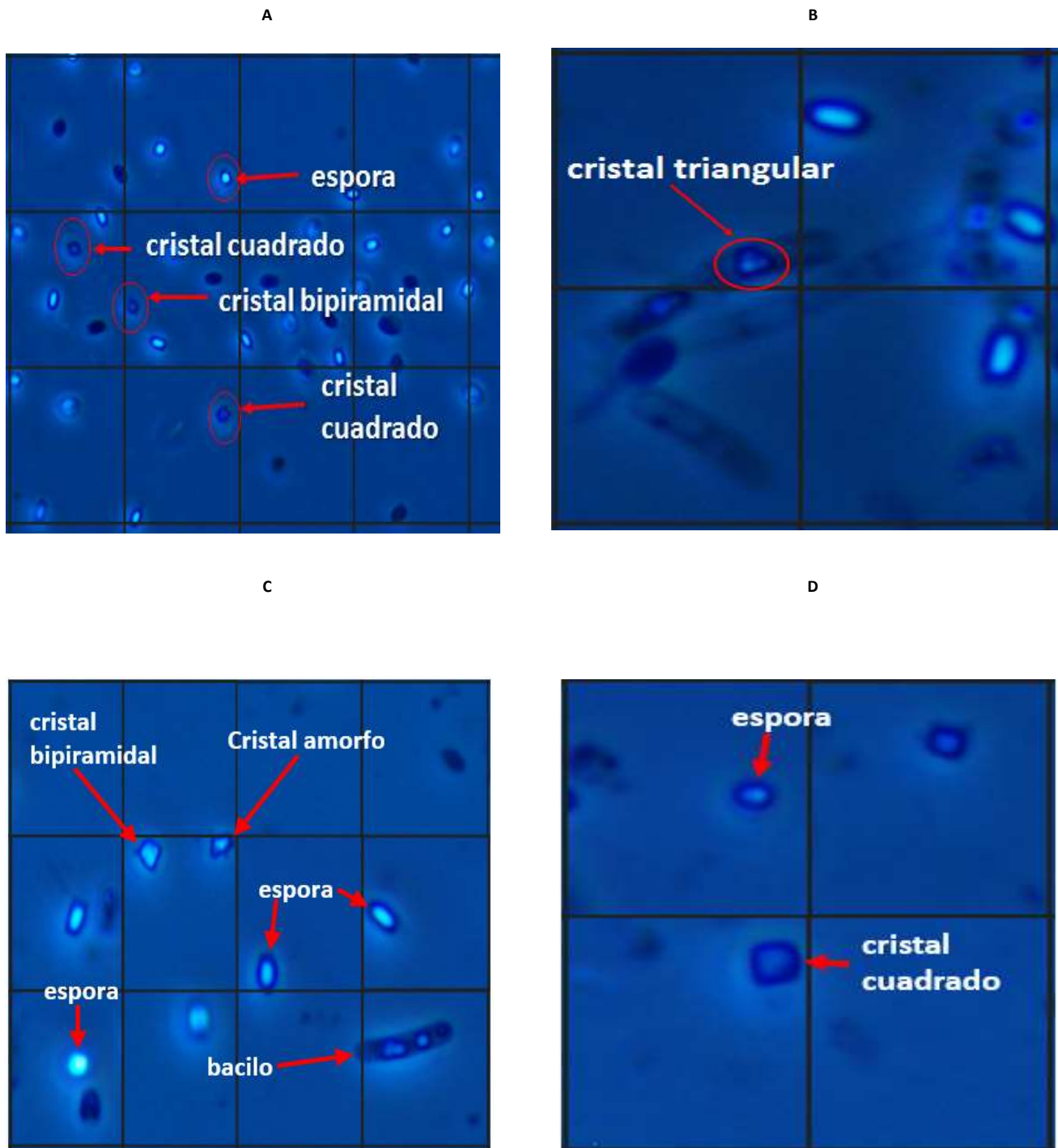
### Caracterización microscópica de los aislamientos nativos

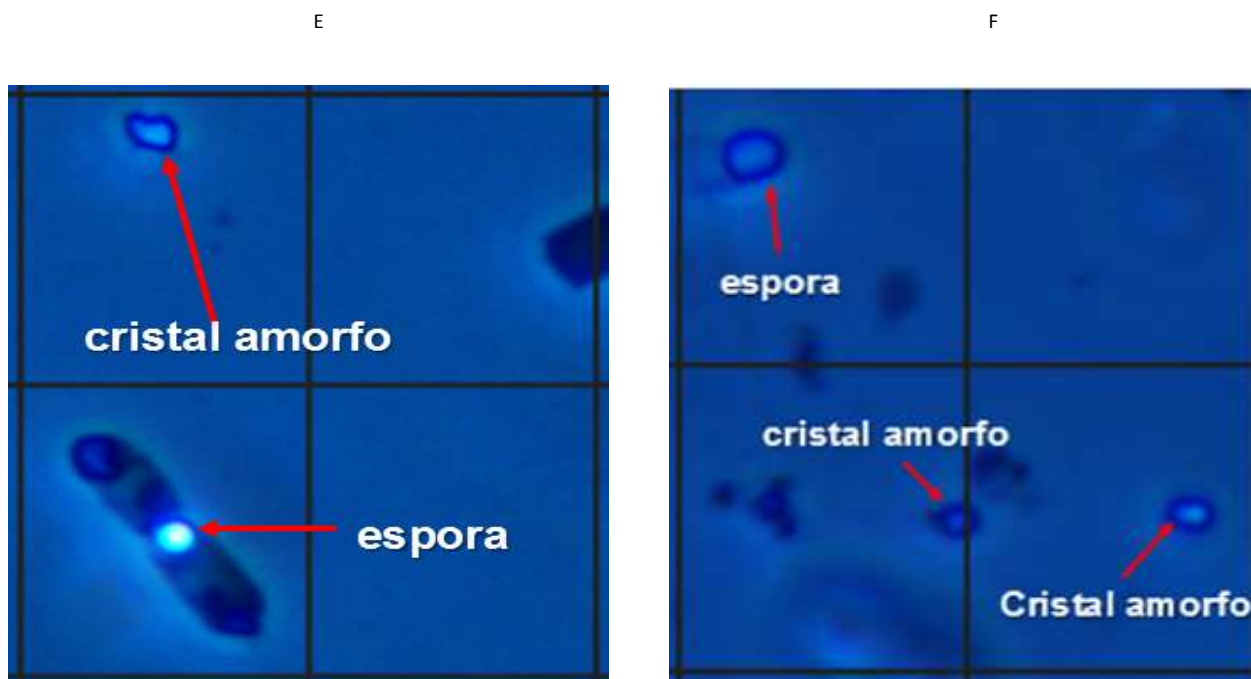
#### Observación de cristales

Se realizó la observación al microscopio de contraste de fases, de un inóculo sin tinción de cada uno de los aislamientos nativos, en donde se distinguieron las células vegetativas (bacilos), las esporas y los cristales parasporales. Este montaje permitió la identificación y reconocimiento de los cristales y las esporas tanto al interior de los bacilos como fuera de ellos ya que tienen la posibilidad de presentar brillo por refracción de la luz mientras que las células vegetativas se aprecian opacas. Se observaron cristales triangulares, cuadrados, bipiramidales y amorfos (Tabla 4). La morfología observada en las células vegetativas fue variada: desde bacilos cortos y gruesos hasta bacilos largos y delgados, organizados en su mayoría formando cadenas cortas de células, con esporas elipsoidales terminales o de gran tamaño que ocupaban gran parte del volumen interno del bacilo (Carreras, 2009; El-kersh *et al.*, 2012) (Figura 1).

Según Helgason *et al.* (2000), Bernhard *et al.* (1997) y Sauka & Benintende (2008), existen muchos estudios que dependen de la observación de los cristales para diferenciar a *Bacillus thuringiensis* de otras especies, como *Bacillus cereus*. Estas inclusiones cristalinas pueden presentar distintas formas y pueden clasificarse en bipiramidales, cúbicos, cuadrados, esféricos y otras formas atípicas menos frecuentes (Khetan, 2001).

**Figura 1.** Formas de cristales, esporas y bacilos observados al microscopio de contraste de fases (100X): **A.** Cepa zcuJTL3 Chía (Cundinamarca); **B.** zBUJTL44 Sutamarchan (Boyacá); **C.** zSUJTL62 Betulia (Santander); **D.** zMUJTL94; **E.** zMUJTL105; **F.** zMUJTL110 (Ciénaga Grande de Santa Marta).





Fuente: elaboración propia.

De las 20 cepas nativas evaluadas, 11 de ellas (55%) mostraron algún tipo de cristal, el 45% de las cepas restantes posiblemente son aislamientos nativos acristalíferos o pertenecían a otro tipo de bacilos diferentes a *B. thuringiensis*. Por eso la observación de los cristales es clave para su diferenciación. La morfología más frecuente fue amorfa encontrada en un 81.8% de los bacilos esporulados (nueve cepas), seguida por bipiramidal, triangular y cuadrada, la cuales se identificaron en el 18.2% de las cepas.

Lo anterior puede ser indicativo de la diversidad de estas cepas nativas que se manifiesta en la variedad de cristales observados. En nuestro estudio se reportaron cuatro formas distintas de cristales lo que permitió la organización de seis grupos de perfiles diferentes en donde cuatro de ellos evidencian la asociación de dos formas de cristales presentes en una misma cepa. Lo anterior puede deberse a un posible intercambio genético que realizan algunas bacterias como el *Bacillus thuringiensis* mediante un proceso llamado conjugación (Madigan *et al.*, 2003; Tortora *et al.*, 2007; Jiménez Y Guerrero, 1987), lo que permitiría intercambiar genes que codifican proteínas Cry presentes en los cristales parasporales. Esto se pudo evidenciar al momento de amplificar genes *cry1* específicos ya que se encontraron aislamientos que presentaron entre dos a cinco genes *cry*. También es posible que estén presentes en estas cepas otros tipos de genes que no fueron objeto de análisis en este estudio, lo que aumenta la diversidad de estos aislamientos de *Bt*.

Estudios anteriores han reportado la variedad y presencia de formas de cristales acordes a las observadas en estos 11 aislamientos nativos. Es el caso de Ramírez *et al.* (2010), a través de la observación por microscopía óptica de cepas nativas identificaron, entre otras, formas bipiramidales, triangulares, cuadradas y amorfas. Ammouneh *et al.* (2010) reportaron 25 aislamientos de *Bacillus thuringiensis* que mostraron formas de cristales bipiramidales y cuadradas. El-kersh *et al.* (2012) en su estudio de cepas nativas aisladas en Arabia Saudita encontraron en 64 aislamientos, cristales amorfos y bipiramidales, entre otros.

Se ha logrado en muchos casos establecer asociaciones entre la morfología del cristal, sus proteínas Cry constituyentes, el peso molecular de estas y su espectro de actividad insecticida. Sauka & Benintende (2008) proponen que los cristales bipiramidales se asocian con una posible actividad insecticida contra insectos lepidópteros, las formas cuadrangulares con una posible actividad insecticida contra coleópteros, los cristales esféricos asociados a una posible actividad contra dípteros y los cristales cúbicos posiblemente con una acción dual sobre lepidópteros y dípteros. Höfte & Whiteley (1989) asociaron los cristales cuadrangulares con actividades insecticidas contra insectos dípteros y lepidópteros. Lecadet *et al.*, (1998) y Aronson *et al.*, (1986), asociaron las formas bipiramidales con actividades contra insectos coleópteros y lepidópteros. Sin embargo, hay quienes afirman que la relación entre la forma de los cristales y su posible actividad biológica no se da, ya que su visualización depende del medio de cultivo en el que se desarrollen los aislamientos (Márquez *et al.*, 1996).

De acuerdo con la forma de los cristales, se establecieron 6 grupos o perfiles de acuerdo con Ramírez *et al.* (2010): I) amorfo; II) triangular; III) triangular y amorfo; IV) amorfo y bipiramidal, V) cuadrado y bipiramidal; y VI) cuadrado y amorfo (Tabla 4). Teniendo en cuenta lo anterior, cuatro aislamientos nativos presentaron más de una forma o tipo de cristal (cepas ZCUJTL3, ZSUJTL62, ZMUJTL63 y ZMUJTL94) que equivale al 36.3% de las cepas evaluadas. Siendo así, estas cepas tendrían potencial insecticida contra insectos lepidópteros, coleópteros y dípteros según lo descrito anteriormente, aspecto que se evaluará con las otras caracterizaciones. Lo anterior evidencia la diversidad de estos 4 aislamientos nativos estudiados. El resto de las cepas presentaron solo una forma de cristal (63.6%).

**Tabla 4.** Grupo de perfiles de los aislamientos nativos basados en la forma de los cristales.

Grupos	Perfiles	N° de aislamientos nativos	%
I	Amorfo	6	54.5%
II	Triangular	1	9.1%
III	triangular y amorfo	1	9.1%
IV	amorfo y bipiramidal	1	9.1%
V	cuadrado y bipiramidal	1	9.1%
VI	cuadrado y amorfo	1	9.1%

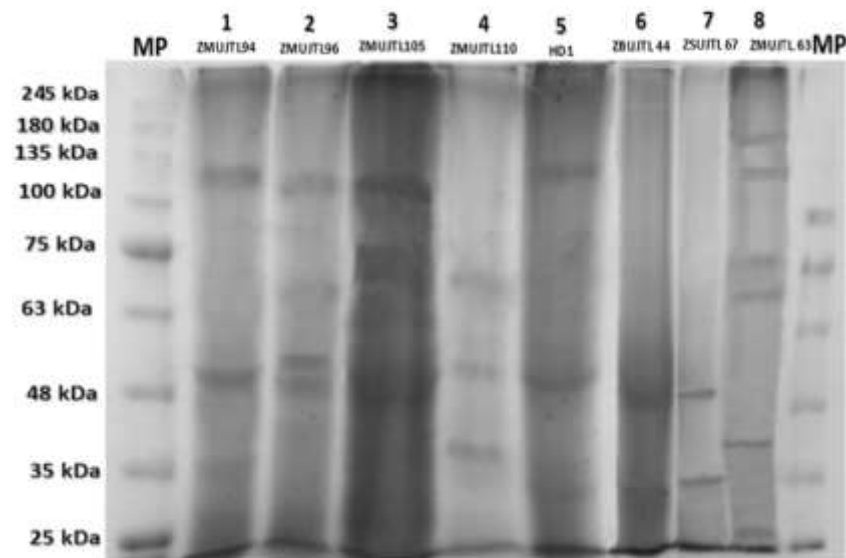
Fuente: Ramírez *et al.* (2010).

### Caracterización bioquímica

De acuerdo con Lecadet *et al.* (1998), las proteínas Cry de *Bt* pueden conformar hasta el 25% del peso seco de las células. La caracterización bioquímica permite determinar la presencia y abundancia relativa de estas proteínas Cry, dada la alta variabilidad de proteínas y posibles actividades biológicas novedosas.

De los 11 aislamientos nativos que presentaron cristales parasporales, el 63.7% (7) presentó perfiles electroforéticos claros de proteínas (Figura 2). El resto de los aislamientos (4) revelaron bandas muy tenues.

**Figura 2.** Perfil electroforético de proteínas totales de 7 de las 11 cepas nativas evaluadas: **carril 1:** ZMUJTL94; **carril 2:** ZMUJTL96, **carril 3:** ZMUJTL105, **carril 4:** ZMUJTL110, **5: Control positivo** *B. thuringiensis* var. *Kurstaki*-HD1. **carril 6:** ZBUJTL44, **carril 7:** ZSUJTL67 y **carril 8:** ZMUJTL63, **MP:** marcador de peso Opti Protein XL (abm,- Canadá). SDS-PAGE al 12%, teñido con azul de Coomassie.



Fuente: elaboración propia.

Por medio de la caracterización bioquímica de estos 11 aislamientos nativos se identificaron cinco cepas que revelaron dos bandas (45.4%) 3 cepas que revelaron tres bandas (27.2%), dos cepas con cuatro bandas (18.1%) y una cepa que reveló 6 bandas (9.1%).

A partir del perfil electroforético de las cepas estudiadas, se realizó la clasificación en grupos de acuerdo con su posible actividad biológica. Esta clasificación se estableció de la siguiente manera:

- El grupo I, constituido por bandas electroforéticas de proteínas cuyo peso molecular varía entre 10- 20 kDa, no se encuentra asociado a ninguna proteína Cry conocida.
- El grupo II, con bandas electroforéticas de proteínas con pesos moleculares de 25-30 kDa, asociado a proteínas Cyt (proteínas citolíticas), con actividad frente a insectos lepidópteros y dípteros (Gough *et al.*, 2005).
- El grupo III, con bandas de proteínas de pesos moleculares de 35-50 kDa, asociado a proteínas Cry3, Cry6, Cry34, Cry35 y Cyt1A con actividad biológica frente a insectos lepidópteros y coleópteros (Barloy *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997).
- El grupo IV, con bandas electroforéticas de pesos moleculares de 60-75 kDa, asociado a proteínas Cry2 y Cry3, con actividad biológica dual, frente a insectos lepidópteros dípteros y coleópteros (Zhang *et al.*, 1997; Arango *et al.*, 2002).
- El grupo V, con bandas electroforéticas de proteínas de pesos moleculares de 80-85 kDa, asociado a proteínas Cry11a, con actividad biológica frente a insectos lepidópteros y dípteros (Arango *et al.*, 2002).
- El grupo VI, con bandas electroforéticas de proteínas de pesos moleculares de 100-150 kDa, asociado a proteínas Cry1, Cry32Aa, con actividad biológica frente a insectos lepidópteros y coleópteros (Hofte & Whiteley, 1989) y del tipo Cry4 con actividad frente a dípteros (Barloy *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997).
- El grupo VII constituido para aquellos bacilos nativos esporulados que no revelaron bandas de proteínas.

En la Figura 2 se puede observar, para la cepa ZMUJTL94, bandas que se encuentran entre 35 y 120 kDa aproximadamente, que pueden asociarse a proteínas Cry1 y Cry3 (carril 1). También para la cepa ZMUJTL96 se observan bandas tenues correspondientes a 47, 50, 65 y 120 kDa posiblemente asociadas a proteínas Cry1 y Cry2 (carril 2). La cepa nativa ZMUJTL105 (carril 3) reveló bandas tenues de 50, 63, 75 y 120 kDa, que pueden asociarse a proteínas Cry1, Cry2 y Cry3, mientras que la cepa ZMUJTL110 (carril 4) reveló bandas de 40, 50 y 60 kDa que pueden asociarse a proteínas Cry2 y Cry3. También se observaron bandas de proteínas en las cepas ZBUJTL44 y ZSUJTL67 con pesos moleculares de 35-50 kDa (carriles 6 y 7) que pueden asociarse a proteínas Cry3. Esta diversidad de proteínas permite concluir que *Bacillus thuringiensis* puede tener cristales parasporales constituidos por mezclas de varios tipos de proteínas Cry. Esto también se pudo observar en la caracterización molecular, en donde para estos aislamientos nativos se amplificaron genes que



codifican para distintas proteínas que pueden estar presentes en el mismo tipo de cristal.

Con la determinación de los perfiles electroforéticos de proteínas se puede evidenciar la diversidad de aislamientos nativos que pueden existir en un determinado ecosistema. Lo anterior lo pudimos evidenciar en el caso de la cepa ZMUJTL63 que reveló bandas que se encuentran entre 25 y 140 kDa (seis bandas) y que presenta una posible actividad biológica amplia, debido a que las bandas de proteínas reveladas podrían asociarse a proteínas Cyt, Cry1, Cry2 y Cry3. Es importante destacar que este aislamiento nativo pertenece al ecosistema de manglar de la Ciénaga Grande de Santa Marta lo que deja en evidencia la biodiversidad de cepas de *Bt* que pueden existir en este ambiente, como una alternativa de ecosistema en la búsqueda de cepas novedosas. También es importante mencionar que la mayoría de los aislamientos nativos que revelaron bandas de proteínas, pertenecen a este ecosistema de manglar.

Teniendo en cuenta lo anterior y debido a que se encontraron cepas nativas que revelaron desde dos o más proteínas en su perfil electroforético, se realizó una clasificación individual de cada proteína con el grupo al que pertenece. La comparación de bandas proteicas también permite identificar una posterior relación con su actividad biológica (Ramírez *et al.*, 2010). En la Tabla 5 se identifican las 11 cepas positivas para la presencia de cristales y se presenta la relación entre los tamaños de las proteínas reveladas, los grupos establecidos y la posible actividad biológica.

**Tabla 5.** Grupos de proteínas establecidos y su posible actividad biológica de acuerdo con el peso de las bandas de proteínas totales reveladas por SDS-PAGE, para cada una de las 11 cepas de *Bt* caracterizadas.

Código	Bandas de proteínas reveladas kDa	Grupos	Posible actividad biológica		
			Lepidópteros	Coleópteros	Dípteros
ZCUJTL3	28, 35	II, III	Lepidópteros	Coleópteros	Dípteros
ZBUJTL32	50,75	III, IV			
ZHUJTL46	50,75				
ZMUJTL94	35,51,120				
ZMUJTL110	40,50,60				
ZSUJTL62	30,50,75	II,III, IV			
ZMUJTL96	47,50,65,120	III, VI, VI			
ZMUJTL105	50,63,75,120				

<b>ZMUJTL63</b>	<b>25,42,60,65,120,140</b>	<b>II,III, IV,VI</b>			
<b>ZBUJTL44</b>	<b>35, 50</b>	<b>III</b>			
<b>ZSUJTL67</b>	<b>35, 50</b>				

Fuente: Gough *et al.*, (2005); Barloy *et al.* (1996); Zhang *et al.* (1997); Arango *et al.* (2002); Hofte & Whiteley (1989).

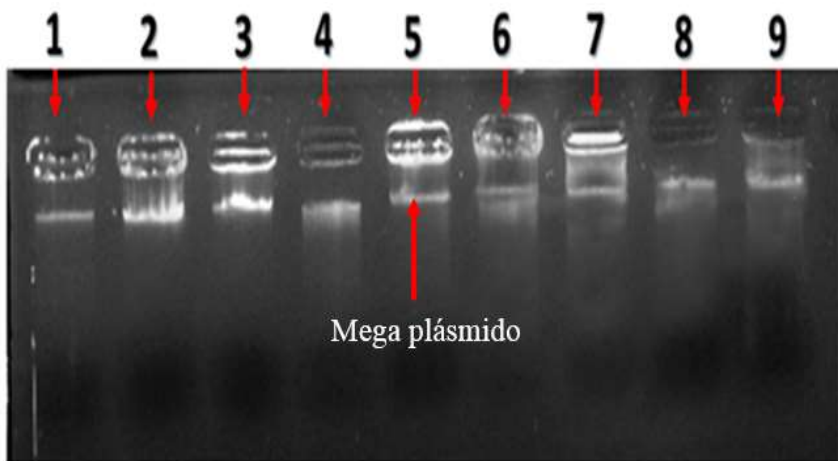
En este estudio, la técnica del SDS-PAGE se ha utilizado para caracterizar los 11 aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis*, como se ha adelantado en otros estudios similares en donde también ha permitido establecer la variabilidad en el potencial de los aislamientos caracterizados (Ramírez *et al.*, 2010; Salama *et al.*, 2015). El análisis de proteínas ha indicado, que es posible distinguir entre diferentes cepas a partir de sus patrones de bandas de proteínas y en muchos casos puede existir un enlace entre los principales componentes de las proteínas de cristal y las actividades potenciales del aislamiento en estudio (Salama *et al.*, 2015). Por ejemplo, en el caso de cepas como ZMUJTL94, ZMUJTL96, ZMUJTL105 y ZMUJTL63 que compartieron bandas de proteínas de 120-130 kDa con la cepa de referencia *B. thuringiensis* var. *Kurstaki*, posiblemente tengan actividad biológica sobre los mismos grupos de insectos. Además, cepas como ZBUJTL44 y ZSUJTL67, que presentaron el mismo perfil electroforético y el mismo grupo de proteínas ya que compartieron bandas de 35 y 50 kDa y presentan actividades potenciales sobre lepidópteros y coleópteros, pero no sobre dípteros (Tablas 5 y 6). Varios autores han investigado la relación entre la posible actividad biológica de cepas de *Bt* y sus patrones de proteínas como en el caso de Zheng *et al.* (2010), Merdan *et al.* (2010) y Hofte & Whiteley (1989).

### Caracterización molecular

#### Extracción de ADN

Según Schnepf *et al.* (1998) los genes que codifican para las proteínas Cry son de origen plasmídico. Por lo anterior, de los 20 aislamientos nativos iniciales, se realizó la extracción de DNA plasmídico para identificar posteriormente los genes *cry1* por PCR y Múltiple PCR. El ADN se corrió en gel de agarosa al 1% para verificar su presencia (Figura 3).

**Figura 3.** ADN de 7 de las 20 cepas estudiadas; Carril 1: zcuJTL3, carril 2: zcuJTL13, carril 3: zmuJTL27, carril 4: zbuJTL37, carril 5: zmuJTL63, carril 6: zsuJTL67, carril 7: zmuJTL110 y carriles 8 y 9: cepas de referencia HD1 (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*) y HD137 (*B. thuringiensis* var. *aizawai*). Gel de agarosa al 1%, teñido con SafeView (NBS Biologicals, U.K.).

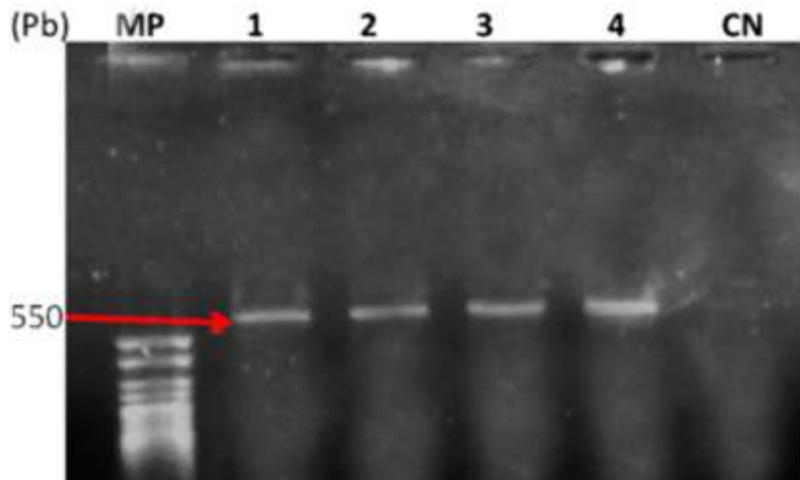


Fuente: elaboración propia.

#### Amplificación de los genes *cry1* por PCR

El ADN de las 20 cepas iniciales caracterizadas microscópicamente se sometió a las primeras reacciones con la mezcla de oligonucleótidos universales para *cry1* general (Bravo *et al.*, 1998). De estos se obtuvo amplificación en 11 cepas correspondientes al 55% del total de cepas estudiadas, amplificando genes pertenecientes a la familia *cry1* (Figura 4). Lo anterior concuerda con lo que varios autores plantean, que los genes *cry* que más abundan en la naturaleza entre las cepas de *B. thuringiensis* son los genes *cry1* y sus subfamilias; por tal razón, son los más estudiados (Salama *et al.*, 2015; Bravo *et al.*, 1998; Martínez & Caballero, 2002; Valicente *et al.*, 2000; Sauka & Benintende, 2008).

**Figura 4.** Amplificación de fragmentos de genes *cry1* por PCR, utilizando los oligonucleótidos universales (Bravo *et al.*, 1998). MP: Marcador de peso molecular Hypper Ladder V (Bioline, UK); Carriles 1 al 4 Aislamientos nativos: **1:**ZMUJTL94, **2:**ZMUJTL96, **3:**ZMUJTL105, **4:**ZMUJTL110. CN: Control negativo. Gel de agarosa al 1% teñido con SafeView (NBS Biologicals, U.K.).

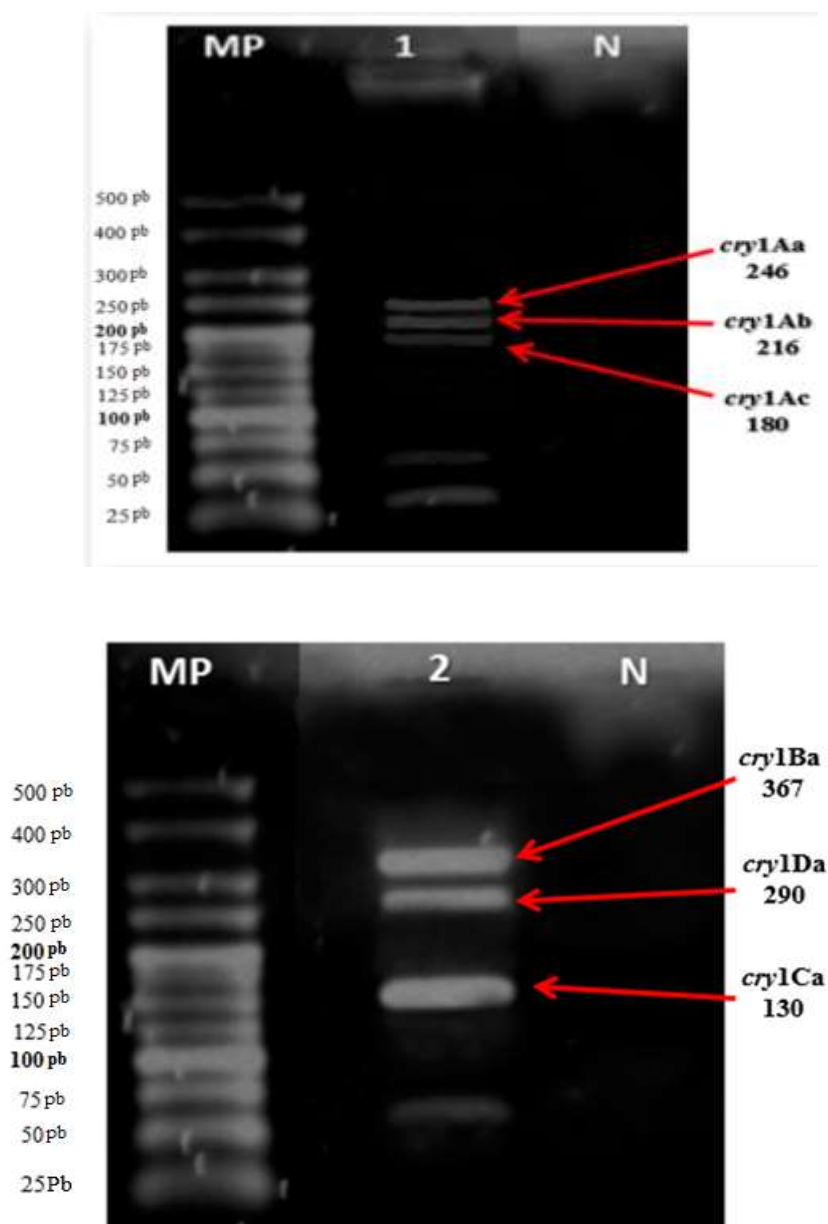


Fuente: elaboración propia.

#### Amplificación de genes *cry1* específicos

De los 11 aislamientos nativos que amplificaron fragmentos para la presencia de genes *cry1*, cuatro se aislaron del ecosistema de manglar: uno de Cundinamarca, tres de Santander, dos de Boyacá y uno del Huila. Estas 11 cepas se sometieron a dos rondas de PCR múltiple (Multiplex-PCR). En primera instancia, estas rondas se realizaron con las cepas de referencia *Bt. var. kurstaki* y *Bt. var. aizawai*, para facilitar la identificación de las bandas de los genes *cry1* específicos amplificados (Figura 5).

**Figura 5.** Productos de amplificación por PCR de genes *cry1* específicos en las cepas de referencia *Bt. var. kurstaki* (Mezcla A) y *Bt. var. aizawai* (Mezcla B). Gel de Agarosa al 2% teñido con Safe View (NBS Biologicals, U.K.).



Fuente: elaboración propia.

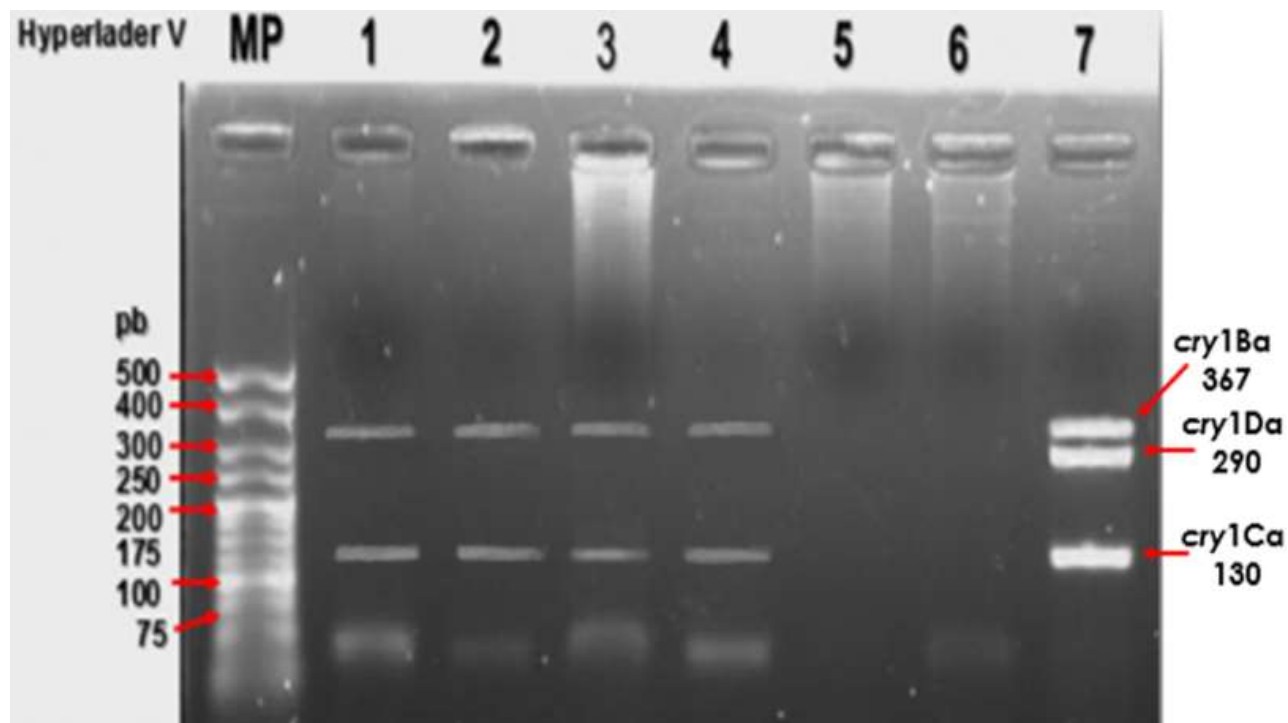
Según la literatura, la frecuencia con que se detecta los genes *cry1* varía en forma marcada. Algunos genes, como *cry1A*, se detectan con más frecuencia que otros, presentándose en más de la mitad de las cepas analizadas (Sauka & Benintende, 2008; Baig & Mehnaz, 2010). Lo anterior lo pudimos observar debido a que, en la primera reacción (Mezcla A), se amplificaron bandas con pesos moleculares de 246, 216 y 180 pb aproximadamente que pertenecen a los genes *cry1Aa*, *cry1Ab* y *cry1Ac*. Se observó que el fragmento de 246 pb que identifica el gen *cry1Aa* es el

de mayor presencia en los aislamientos (72.7%) y el gen *cry1Ac* de 180 pb se presenta en menor número en estas cepas (27.2%) (Tabla 6).

Según Sauka y Benintende (2008), luego de los genes *cry1A*, los genes más comunes son *cry1C* y *cry1D* y los que se hallan con menos frecuencia son los genes *cry1B*, *cry1E*, *cry1F* y *cry1G*, a pesar de existir excepciones. Para nuestro estudio, en la segunda reacción (Mezcla B), se identificaron bandas con pesos moleculares de 367, 290 y 130 pb aproximadamente, pertenecientes a los genes *cry1Ba*, *cry1Da* y *cry1Ca*, respectivamente. También en este caso se pudo evidenciar que existe diversidad de estos genes en los aislamientos estudiados en donde los genes *cry1Ba* y *cry1Ca* fueron los más identificados (72.7%) y el gen *cry1Da* se presentó en menor número de los 11 aislamientos nativos analizados (18.1%) (Figura 6). Vemos que, con relación a las referencias, en este estudio solo se coincidió en la mayor frecuencia, en los genes *cry1Ca*, pero no en la menor frecuencia. Esto confirma que hay estudios en donde se presentan excepciones.

Con la investigación realizada por Ramírez, et al., (2010), los resultados concuerdan, debido a que describieron que los genes distribuidos en las 99 cepas nativas esporuladas analizadas se presentaron con mayor frecuencia los genes *cry1Aa* con un 76%, seguido del gen *cry1B* con un 35% y del gen *cry1C* con un 32%.

**Figura 6.** Productos de amplificación por PCR de genes *cry1* específicos en cepas nativas, utilizando la Mezcla B de oligonucleótidos: *cry1Ba*, *cry1Ca* y *cry1Da* con pesos moleculares de 367, 130 y 290 pb., respectivamente: carril 1: ZMUJTL110, carril 2: ZMUJTL105, carril 3: ZMUJTL94, carril 4: ZMUJTL96, carril 5: ZSUJTL67, carril 6: ZMUJTL63, carril 7: *Bt.* var. *aizawai*, MP: Marcador de peso molecular Hyper Ladder V (Bioline, UK). Gel de agarosa al 2% teñido con SafeView (NBS Biologicals, U.K.).



Fuente: elaboración propia.

De las 11 cepas evaluadas por PCR, ocho presentaron el gen *cry1Aa*, (72.7%) cinco contenían el gen *cry1Ab* (45.4%), tres contenían el gen *cry1Ac* (27,2%), ocho amplificaron el gen *cry1Ba*, y *cry1Ca* (72.7% para cada gen) y únicamente dos cepas presentaron el gen *cry1Da* (18.1%).

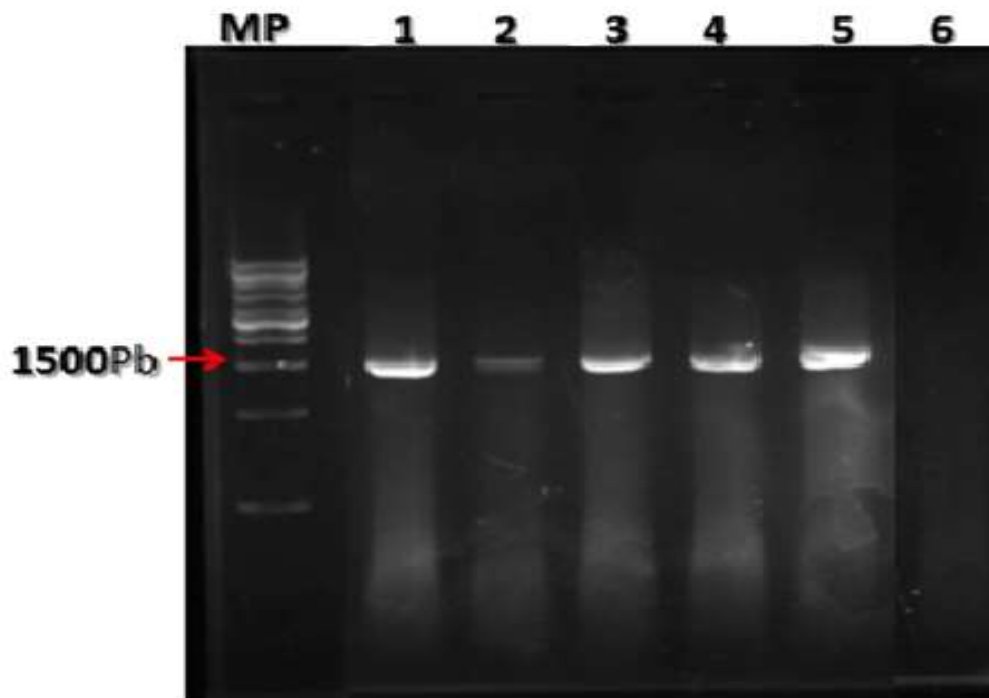
En estudios previos sobre distribución de genes, se ha demostrado la existencia de distintas asociaciones o perfiles de genes *cry* presentes en una misma cepa de *B. thuringiensis* (Wang *et al.*, 2003; Aronson, 2002). Ben-Dov *et al.*, (1997) reportó la presencia de genes *cry1*, *cry3* y *cry8* en la misma cepa de *Bt* al igual que Bravo *et al.*, (1998) observaron genes *cry1* activos contra Lepidópteros y genes *cry3A*, *cry3Ba* y *cry7A* activos contra Coleópteros en el mismo aislamiento. Dentro de las 11 cepas se encontró que presentaron diferentes perfiles de genes *cry1* específicos debido a que amplificaron dos tipos de genes diferentes (cuatro aislamientos nativos) (36.3%) tres (cuatro cepas) (36.3%) cuatro (un aislamiento) (9.1%) y cinco (dos cepas) (18.1%) del total de las cepas estudiadas (Tabla 6). Quienes han realizado estos estudios han sugerido que las cepas de *B. thuringiensis* que contienen más de un gen *cry*, tienen una alta frecuencia de intercambio de información genética (Baig & Mehnaz, 2010).

#### SECUENCIACION NUCLEOTÍDICA ARNr 16S

Posterior a la caracterización de genes *cry1* específicos de los aislamientos nativos, se realizó la amplificación por PCR, la secuenciación y el análisis del gen ARNr 16S a cinco cepas escogidas al azar (ZCUJTL3, ZMUJTL63, ZSUJTL67, ZMUJTL94 y ZMUJTL96) para identificar género y especie y corroborar si estas cepas pertenecen a *Bt*.

Después de la amplificación de los fragmentos del gen ARNr 16S mediante la PCR, se verificó el tamaño del producto de amplificación a través de una electroforesis en gel de agarosa (Figura 7). En las cinco cepas evaluadas se obtuvo fragmentos del gen del tamaño esperado (1500 pb).

**Figura 7.** Productos de amplificación por PCR del gen ARNr 16S, empleando los oligonucleótidos WBAC 2 y 63F. MP: Marcador de peso VC1Kb (Vivantis technologies), carril 1: ZMUJTL63, carril 2: ZSUJTL67, carril 3: ZMUJTL94, carril 4: ZMUJTL96, carril 5: *Bt. var. kustaki*, carril 6: Negativo. Gel de Agarosa al 2% teñido con Safe View (NBS Biologicals, U.K.).



Fuente: elaboración propia.

Las secuencias obtenidas se evaluaron contra base de datos del NCBI (BLAST-Basic Local Alignment Search Tool) para establecer el posible género y especie de las cepas nativas seleccionadas. El resultado del BLAST de la secuencia del gen ARNr 16S con las que reposan en la base de datos mostró que las cinco cepas secuenciadas presentaron un porcentaje de similitud por encima del 94% con relación a las secuencias depositadas en la base de datos del NCBI. De estas cinco cepas, tres tuvieron un porcentaje de similitud del 99%, 98% y del 97% con el género *Bacillus sp* (ZSUJTL67, ZMUJTL63 y ZCUJTL3 respectivamente) y las otras dos cepas mostraron porcentajes de similitud del 94% y 96% con la especie *Bacillus thuringiensis* (ZMUJTL96 y ZMUJTL94).

Diversas investigaciones han empleado el análisis del gen ARNr 16S como una herramienta de identificación molecular para *Bacillus thuringiensis* (El-Kersh *et al.*, 2012; Soufiane & Cote, 2009; Marchesi *et al.*, 1998) y no solamente para la identificación de especies de *Bt* sino también por su habilidad para discriminar entre los diferentes serotipos H (Soufiane & Cote, 2009) y para establecer las relaciones filogenéticas existentes entre distintas cepas (Rodicio y Mendoza, 2004). En nuestro estudio, el análisis del gen ARNr 16S, fue útil para identificar dos de estos cinco aislamientos nativos, como pertenecientes a *Bacillus thuringiensis* con altos porcentajes de similitud.



En la Tabla 6 se presenta el resumen de los resultados obtenidos en las tres caracterizaciones: microscópica, bioquímica y molecular, para los 20 aislamientos nativos evaluados. La presencia de esporas y cristales fue fundamental para seguir con el proceso, a pesar de que todas las cepas se sometieron a la amplificación del gen *cry1* por PCR, nueve cepas no arrojaron productos de amplificación. Es posible que estos aislamientos presenten genes *cry* de otras familias y perfiles de proteínas distintos que podrían ser novedosos. Es importante realizar nuevos estudios con metodologías que permitan identificar que genes y que proteínas sintetizan y direccionar estos hallazgos hacia el control de insectos plaga de la agricultura en nuestro país.

**Tabla 6.** Resultados de la caracterización microscópica, bioquímica y molecular de los 20 aislamientos nativos estudiados junto con la identificación a nivel de género y especie utilizando la herramienta de Búsqueda de Alineamiento Básico Local, BLAST.

Departamento	Municipio	Registro	Formas del Cristal	Esporas	Bandas de proteínas totales kDa	Perfil de genes <i>cry1</i> específicos (pb)	Secuenciación nucleotídica rRNA16S (BLAST)	Similaridad
Cundinamarca	Chía	ZCUJTL3	Cu, Bp	●	28, 35	1Ba, 1Ca	<i>Bacillus sp</i>	97%
	Susa	ZCUJTL13	no observado	●	N/A	N/A	N/A	
Boyacá	Santa Sofía	ZBUJTL28	no observado	●	N/A	N/A	N/A	
	Villa de Leiva	ZBUJTL32	Am	●	50,75	1Aa, 1Ba	N/A	
	Sutamarchán	ZBUJTL37	no observado	●	N/A	N/A	N/A	
		ZBUJTL44	Tr	●	35, 50	1Aa, 1Ab, 1Ba, 1Ca	N/A	
Santander	Mesa de los Santos	ZSUJTL67	Am	●	35, 50	1Ab, 1Ac	<i>Bacillus sp</i>	99%
	Piedecuesta	ZSUJTL74	no observado	●	N/A	N/A	N/A	
	Lebrija	ZSUJTL82	no observado	●	N/A	N/A	N/A	
	Girón	ZSUJTL86	no observado	●	N/A	N/A	N/A	
	Betulia	ZSUJTL62	Am, Bp	●	30, 50, 75	1Aa, 1Ca, 1Da	N/A	
Huila	Garzón	ZHUJTL46	Am	●	50, 75	1Aa, 1Ab, 1Ba, 1Ca, 1Da	N/A	
Ciénaga Grande de Santa Marta	Manglar	ZMUJTL4	no observado	●	N/A	N/A	N/A	
		ZMUJTL27	no observado	●	N/A	N/A	N/A	
		ZMUJTL63	Tr, Am	●	25, 42, 60, 65, 120, 140	1Ab, 1Ac	<i>Bacillus sp</i>	98%
		ZMUJTL81	no observado	●	N/A	N/A	N/A	
		ZMUJTL94	Cu, Am	●	35, 51, 120	1Aa, 1Ab, 1Ac, 1Ba, 1Ca	<i>Bacillus thuringiensis</i>	96%
		ZMUJTL96	Am	●	47, 50, 65, 120	1Aa, 1Ba, 1Ca	<i>Bacillus thuringiensis</i>	94%
		ZMUJTL105	Am	●	50, 63, 75, 120	1Aa, 1Ba, 1Ca	N/A	
		ZMUJTL110	Am	●	40, 50, 60	1Aa, 1Ba, 1Ca	N/A	

Fuente: elaboración propia.

El estudio de identificación de cinco cepas nativas a nivel de género y especie produjo excelentes resultados debido a que las cepas ZMUJTL94 y ZMUJTL96 se

identificaron como *Bacillus thuringiensis* con un alto porcentaje de similitud (Tabla 6) y las otras tres al género *Bacillus*.

**Tabla 7.** Posible actividad biológica de las 11 cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* de acuerdo a la presencia de genes *cry1* identificados por PCR.

			AISLAMIENTOS NATIVOS ESTUDIADOS																										
código de cepas			3	32	44	46	62	63	67	94	96	105	110																
Microscopia (formas de cristal)			Cu,Bp	Am	Tr	Am	Am, Bp	Tr, Am	Am	Am	Am	Am	Am																
perfil de proteínas totales			Cyt, Cry3	Cry2, Cry3	Cry3	Cry2, Cry3	Cyt, Cry2, Cry3	Cyt, Cry2, Cry3	Cry3	Cry1, Cry3	Cry1, Cry2	Cry1, Cry2, Cry3	Cry2, Cry3																
perfil de genes <i>cry1</i>			1Ba	1Ca	1Aa	1Ba	1Aa	1Ab	1Ba	1Ca	1Aa	1Ab	1Ba	1Ca	1Aa	1Ab	1Ba	1Ca	1Aa	1Ab	1Ba	1Ca	1Aa	1Ab	1Ba	1Ca			
Orden	Genero	Especie																											
Lepidóptera	<i>Diatraea</i>	<i>saccharina</i>	•		•	•	•		•	•					•		•			•					•			•	
	<i>Manduca</i>	<i>sexta</i>			•	•	•		•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
	<i>Plutella</i>	<i>xylostella</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
	<i>Spodoptera</i>	<i>frugiperda</i>		•				•		•	•	•	•							•		•				•		•	
	<i>Tecia</i>	<i>solanivora</i>																		•		•							
Díptera	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>		•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
	<i>Anopheles</i>	<i>gambiae</i>		•					•		•										•		•			•		•	
	<i>Culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>		•						•		•										•		•			•		•
Coleóptera	<i>Leptinotarsa</i>	<i>decemlineata</i>	•		•				•													•		•			•		•
	<i>Anthonomus</i>	<i>grandis</i>	•		•				•														•		•			•	

Fuente: Van Frankenhuyzen (2009)

### Predicción de la actividad biológica

Para realizar la predicción de la actividad biológica de los 11 aislamientos nativos evaluados, se detallaron los espectros de susceptibilidad de 10 especies de insectos de interés para la agricultura colombiana: cinco especies de Lepidópteros, tres especies de Dípteros y dos especies de Coleópteros frente a la gama de genes *cry1* reportados para las 11 cepas nativas estudiadas. Para lo anterior se realizó una adaptación de los espectros de susceptibilidad de distintas especies de insectos de los órdenes Lepidóptera, Díptera y Coleóptera reportadas por Van Frankenhuyzen, (2009). Los resultados de esta relación se muestran en la Tabla 7.

La cepa ZMUTL94 fue la que presentó el posible espectro de actividad insecticida (especificidad) más alto con relación a los genes *cry* identificados, debido a que potencialmente esta cepa es activa sobre las 10 especies de insectos seleccionados. La cepa ZMUTL94 de acuerdo con el análisis molecular contiene los genes *cry*: 1Aa, 1Ab, 1Ac, 1Ba y 1Ca. Además, presenta cristales amorfos y cuadrados y expresa proteínas con tamaños de 30, 50 y 120 kDa (Tabla 6).

Las cepas ZBUJTL44, ZHUJTL46, ZMUJTL96, ZMUJTL105 y ZMUJTL110 presentaron actividades potenciales altas, debido a que podrían ser tóxicas sobre nueve especies de insectos (cuatro Lepidópteros, tres Dípteros y dos Coleópteros) (90%). La cepa ZCUJTL3 presentó especificidad sobre ocho de las 10 especies (tres Lepidópteros, tres Dípteros y dos Coleópteros) (80%). La cepa ZSUJTL62 presentó especificidad sobre seis de las 10 especies (tres Lepidópteros y tres Dípteros) con un equivalente del 60%. A continuación, se encuentran las cepas ZBUJTL32, ZMUJTL63 y ZSUJTL67 con una especificidad sobre cinco especies (50%). En términos generales, estos 11 aislamientos esporulados presentan un amplio espectro de actividad para el control biológico de insectos Lepidópteros ya que todas las cepas tienen acción sobre este orden de insectos, como mínimo del 60% (tres especies de Lepidópteros en adelante).

Cabe destacar que algunas de estas cepas posiblemente no presentan espectros de susceptibilidad sobre las especies de Coleópteros seleccionados como en el caso de las cepas ZSUJTL62, ZMUJTL63 y ZSUJTL67 que solo equivalen al 27.2%, de las cepas nativas estudiadas, ya que dentro de su perfil de genes no se encuentra el gen *cry1Ba* como sí lo está en el resto de las 11 cepas. Lo anterior permitiría inferir que es posible que las proteínas Cry1Ba codificadas por estos genes tengan acción sobre ese grupo de insectos, así como lo establece López-Pazos & Cerón (2010) quienes plantean que se han descrito proteínas con actividad dual Lepidóptera-Coleóptera (Cry1B y Cry1I).

Los genes *cry1* de estos aislamientos nativos también difieren en el número de especies de insectos a los que afecta. La proporción de especies de insectos que menos fueron susceptibles sobre el total de las 10 especies seleccionadas fue del 10% (una especie) para genes *cry1Aa*, 20% (dos especies) para *cry1Da* y el 30% (tres especies) para *cry1Ac*. En contraste, la proporción de especies de insectos más susceptibles que varió entre el 40% (cuatro especies) para *cry1Ab* y *cry1Ba* y el 50% (cinco especies) para *cry1Ca*. Estos genes que codifican proteínas que generan afectación sobre la mitad de las especies de insectos seleccionadas, están presentes en el 72.7% (ocho cepas) de los aislamientos nativos caracterizados (Tabla 7).

De acuerdo con la predicción de la actividad biológica realizada, *Plutella xylostella* presentó un espectro de susceptibilidad muy alto debido a que los 11 aislamientos nativos estudiados presentan genes *cry1* que codifican posibles proteínas activas sobre esta especie de Lepidóptero. *Tecia solanivora*, por el contrario, presentó los espectros de susceptibilidad más bajos o menos permisivos debido a que solo tres de las cepas nativas contienen genes *cry1* que codifican posibles proteínas activas sobre este insecto, en los genes *cry1Ac*. Esto posiblemente limita el control biológico sobre esta especie de Lepidóptero ya que solo tres aislamientos nativos contienen genes *cry* que codifican para estas proteínas (ZMUJTL63, ZSUJTL67 y ZMUJTL94) (Tabla 7).

También es importante destacar que, de los 11 aislamientos nativos, cinco de ellos corresponden al ecosistema de manglar de la Ciénaga Grande de Santa Marta. A nivel mundial, son muy pocos los estudios que se han adelantado sobre la caracterización de cepas nativas de este tipo de ecosistema marino, que permitan encontrar cepas con perfiles de genes *cry* y de proteínas novedosas. Lo anterior le

da una gran importancia a este estudio ya que contribuye no solo a la descripción de la biodiversidad de aislamientos de *Bt* que se encuentran en el suelo de este ecosistema sino también al conocimiento de la diversidad biológica de nuestro país en especial de estas cepas que son únicas y que no se han estudiado con anterioridad. También brinda información muy importante antes de la realización de futuros bioensayos con estos aislamientos lo que se ve reflejado en la reducción de tiempo y costos.

## CONCLUSIONES

A través de la microscopía de contraste de fases se pudo identificar y diferenciar las formas de los bacilos (células vegetativas) de las esporas y los cristales, y permitió la observación de cuatro formas distintas de cristales en 11 de los 20 aislamientos nativos seleccionados.

El perfil electroforético de proteínas (sds-page) permitió identificar en los 11 aislamientos nativos, el tamaño de bandas de proteínas similares a las proteínas Cry presentes en la cepa de referencia para así mismo poder predecir su posible actividad biológica sobre diversos órdenes de insectos-plaga.

La amplificación de genes *cry1* específicos mediante pcr Múltiple a partir de oligonucleótidos específicos, permitió la identificación de los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ba*, *cry1Ca* y *cry1Da* presentes en 11 de los 20 aislamientos nativos esporulados, que codifican proteínas todas posiblemente activas sobre cinco especies de Lepidópteros, tres de Dípteros y dos de Coleópteros de interés en nuestro país.

De acuerdo con las caracterizaciones realizadas en este estudio, las 11 cepas nativas tienen posible actividad biológica sobre insectos lepidópteros, coleópteros y dípteros.

La caracterización microscópica, bioquímica y molecular como método para predecir la actividad biológica de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* sobre insectos plaga, permitió determinar y predecir la posible actividad biológica de las cepas caracterizadas de una manera práctica, y brinda la posibilidad de emplear estas cepas en futuros bioensayos como controladores biológicos.

## REFERENCIAS

Agudelo, C., Hernández, C. y Realpe, M., (2002). *Especies del género Bacillus: morfología macroscópica y microscópica*. Grupo de Microbiología, División de Biblioteca y Publicaciones. Instituto Nacional de Salud de Colombia.

Ammounh, H., Harba, M., Idris, E. & Makee, H. (2011). Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Syrian soil and testing of their insecticidal activities against some insect pests. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35(4), 421-431. <https://doi.org/10.3906/tar-1007-1117>

Arango, J. A., Romero, M. & Orduz, S. (2002). Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of applied microbiology*, 92(3), 466-474. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01545.x>

Aronson, A. I., Beckman, W. & Dunn, P. (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiological reviews*, 50, 1-24. <https://doi.org/10.1128/mr.50.1.1-24.1986>

Aronson, A. (2002). Sporulation and d-endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cell Mol Life Sci*, 59, 417-425. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8434-6>

Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A. & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>

Bravo A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina, L., Villalobos, F., Peña, G., Nuñez, M., Soberón, M. & Quintero, R. (1998). Characterization of cry Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 4965-4972. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.12.4965-4972.1998>

Bravo, A. y Cerón, J. (2004). Productos comerciales: nativos y recombinantes en *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. *Universidad Nacional de Colombia*, 123-147.

Bravo, A. & Soberón, M. (2008). Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México*, 303-313

Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S. & Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41(7), 423-431. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>

Baig, D.N. & Mehnaz, S. (2010). Determination and distribution of cry-type genes in halophilic *Bacillus thuringiensis* isolates of Arabian Sea sedimentary rocks. *Elsevier*, 165, 376-383. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.08.003>

Barloy, F., Delécluse, A., Nicolas, L. & Lecadet, M. M. (1996). Cloning and expression of the first anaerobic toxin gene from *Clostridium bifermentans subsp. malaysia*, encoding a new mosquitocidal protein with homologies to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Journal of bacteriology*, 178(11), 3099-3105. <https://doi.org/10.1128/jb.178.11.3099-3105.1996>

Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan E., Barak, Z., Sina, R. & Manasherob, R. (1997). Extended screening by PCR for seven cry group genes from field collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Applied Environmental Microbiology*, 63(12), 4883–90. <https://doi.org/10.1128/aem.63.12.4883-4890.1997>

Bernhard, K., Jarrett, P., Meadows, M., Butt, J., Ellis, D. J., Roberts, G. M. & Burges, H. D. (1997). Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *Journal of Invertebrate Pathology*, 70(1), 59-68. <https://doi.org/10.1006/jipa.1997.4669>

Carreras S. B., Bravo, A. y Sánchez, J. F. (2004). Caracterización molecular de cuatro cepas de *Bacillus thuringiensis*. Relación con su actividad biológica. *Rev. Protección Veg.* 19(2), 80-85.

Carreras, S. B. (2009). Obtención de aislados de *Bacillus thuringiensis* Berliner autóctonos de Cuba. Instituto de Investigaciones de Sanidad. *Fitosanidad*, 13(2).

Cerón, J., Covarrubias, L., Quintero, R., Ortiz, A., Ortiz, M., Aranda, E., Lina, L. & Bravo, A. (1994). PCR analysis of the cryI insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(1), 353-356. <https://doi.org/10.1128/aem.60.1.353-356.1994>

Crickmore, N., Zeigler, D.R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A. & Dean D.H. (2011). *B. thuringiensis* toxin nomenclature. [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)

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), 807-813. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.807-813.1998>

Crickmore, N., Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., Schnepf, E., Sun, M. & Zeigler, D.R. (2016). *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature.

De Liñan, C. (2001). *Vademécum de productos fitosanitarios y nutricionales*. Ediciones Agrotécnicas S.L.

El-kersh, T. A., Al-sheikh, Y. A., Al-akeel, R. A. & Alsayed, A. A. (2012). Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*, 11(8), 1924-1938. <https://doi.org/10.5897/AJB11.2717>

Galvis, F. y Moreno, L. Y. (2014). Caracterización molecular mediante rep-PCR de aislados nativos de "*Bacillus thuringiensis*", obtenidos de muestras de suelo. *Agronomía costarricense: Revista de ciencias agrícolas*, 38(1), 223-229.

Gillis, A. (2013). El arsenal de *Bacillus thuringiensis*: su uso en manejos agrícolas y en la industria alimentaria [The arsenal of *Bacillus thuringiensis*: its use in agricultural management and in the food industry]. *Entomotropica*, 28, 106-107.

Gough, J. M., Kemp, D. H., Akhurst, R. J., Pearson, R. D. & Kongsuwan, K. (2005). Identification and characterization of proteins from *Bacillus thuringiensis* with high toxic activity against the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Journal of invertebrate pathology*, 90(1), 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.05.012>

Hernández Fernández, J., Reyes, R., Hernández, L. R., Quintero, N. F. y Fernández, L. (2012). Métodos estandarizados para la caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* para el control de insectos plaga: modelo *Tuta absoluta*. Universidad Jorge Tadeo Lozano. <https://doi.org/10.2307/j.ctv2175qf9>

Hernández-Fernández, J. (2015). Caracterización molecular de aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis* en Colombia. Universidad Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Ciencias e Ingeniería. 7-99

Hernández-Fernández, J., (2016). *Bacillus thuringiensis: a Natural Tool in Insect Pest Control. The Handbook of Microbial Bioresources*. CABIS. <https://doi.org/10.1079/9781780645216.0121>

Helgason, E., Okstad, O. A., Caugant, D., Johansen, H., Fouet, A., Mock, M., Hengal. & Kolsto, A.B. (2000). Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1615– 1622. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.4.1615-1622.2000>

Höfte, H., & Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, 53(2), 242-255. <https://doi.org/10.1128/mr.53.2.242-255.1989>

Huerta Canales, D. V. (2013). Caracterización molecular de cepas de *Bacillus thuringiensis* con propiedades entomocidas, para vectores transmisores de enfermedades metaxénicas (dengue) [Tesis de doctorado]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas.

Ibarra, J., Del Rincón Castro, C., Galindo, E., Patiño, M., Serrano, L., García, R., Carrillo, J., Pereyra-Alfárez, B., Alcázar-Pizaña, A., Luna-Olvera, H., Galán-Wong, I., Pardo, I., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Soberón, M. & Bravo A. (2006). Los Microorganismos en el control biológico de insectos fitopatógenos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48 (2), 113 – 120.

Jiménez-Sánchez, A. & Guerrero, R. (1987). *Genética Molecular Bacteriana*. Editorial Reverté.

Katara, J., Deshmukh, R., Singh, N., Kaur, S. (2012). Molecular typing of *native Bacillus thuringiensis* isolates from diverse habitats in India using REP-PCR and ERIC-PCR analysis. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 58, 83-94. <https://doi.org/10.2323/jgam.58.83>

Khetan, S. (2001). *Bacterial Insecticide: Bacillus thuringiensis*. *Microbial Pest Control*. <https://doi.org/10.1201/9781482270631>

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Lecadet, M., Frachon, E., Cosmao Dumanoir, V. C., Ripouteau, H., Hamon, S., Laurent, P. & Thiery, I. (1999). Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 86(4), 660-672. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00710.x>

Lopez, I., Ruiz-Larrea, F., Cocolin, L., Orr, E., Phister, T., Marshall, M. & Mills, D. A. (2003). Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6801-6807. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6801-6807.2003>

López-Pazos, S. A., & Cerón, J. (2010). Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* y su interacción con Coleópteros. *NOVA*, 8(14), 183-194. <https://doi.org/10.22490/24629448.449>

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., Fernández, E. G., Fernández, C. R. & Pérez, M. S. (2003). *Biología de los Microorganismos*. Décima Edición. Editorial Pearson Educación.

Márquez, A. M., Bergmann, M., Ribeiro, J. M. & Dias, C. S. (1996). *Molecular screening of Bacillus thuringiensis strain for specific detection of cry III- type genes*. Abstracts 29<sup>th</sup> Annual meeting 3rd International Colloquium on *Bacillus thuringiensis*. Society for Invertebrate Pathology.

Martinez, C. & Caballero, P. (2002). Contents of cry genes and insecticidal toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains from terrestrial and aquatic habitats. *Journal of applied microbiology*, 92(4), 745-752. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01579.x>

Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J. & Wade, W.G. (1998). Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. American Society for Microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*. 64, (2).95-799. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.6.2333-2333.1998>



Merdan, A., Salama, H.S., Labib, E., Ragaei & Abd El-Ghan, N.M., (2010). *Bacillus thuringiensis* isolates from soil and diseased insects in egyptian cotton fields and their activity against lepidopterous insects. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43 (12), 1165-1176. <https://doi.org/10.1080/03235400802366750>

Muñíz, H. M. (2014). Control de hongos fitopatógenos de importancia agrícola utilizando como agente a *Bacillus thuringiensis* (Berliner) [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias biológicas, Nuevo León, México.

Ohba, M. (1996). *Bacillus thuringiensis* populations naturally occurring on mulberry leaves: a possible source of the populations associated with silkworm-rearing insectaries. *Journal of Applied Bacteriology*, 80(1), 56-64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03190.x>

Orozco, M., Bernal Villegas, J., & Hernández-Fernández, J. (2012). LSSP-PCR para la identificación de polimorfismos en el gen cry1B en cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 121-134.

Ramírez L., Ramírez N., Fuentes L., Jiménez J. & Hernández J., 2010. Aislamiento y caracterización molecular y biológica de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Tuta absoluta* (Meyrick: Lepidoptera: Gelechiidae), insecto plaga del tomate (*Lycopersicon esculentum*). *Revista Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, (1) 22, 73-96.

Rodicio, M. & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología. Universidad de Oviedo. España. *Revista Elsevier*, 22(04), 238-244. <https://doi.org/10.1157/13059055>

Sambrook, J. & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Salama, H. S., El-Ghany, N. A. & Saker, M. M. (2015). Diversity of *Bacillus thuringiensis* isolates from Egyptian soils as shown by molecular characterization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13(2), 101-109. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2015.10.001>

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., Zeigler, D.R. & Dean, D.H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 775-806. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.775-806.1998>

Schwieger, F., & Tebbe, C. C. (1998). A new approach to utilize PCR–single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 4870-4876. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.12.4870-4876.1998>

Soufiane, B. & Cote, J.C. (2009). Discrimination among *Bacillus thuringiensis* H serotypes, serovars and strains based on 16S rRNA, gyrB and aroE gene sequence analyses. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 95, 33-45. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9285-4>

Tortora, G., Funke, B. & Case, C. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Novena Edición. Editorial Médica Panamericana.

Valicente, F.H., Barreto, M.R., de Vasconcelos, M.J.V., de Figueiredo, J.E.F.E. & Paiva, E. (2000). PCR identification of *cry1* genes in *Bacillus thuringiensis* strains that are efficient against fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil*, 29(1), 147–153. <https://doi.org/10.1590/S0301-80592000000100018>

Van Frankenhuyzen, K. (2009). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of invertebrate pathology*, 101(1), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.02.009>

Velasco, F. (2010). Estudio de los niveles de expresión temporal del *cry 1* en aislados nativos mexicanos de *Bacillus thuringiensis* [Tesis de Maestría]. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica.

Wang, J., Boets, A., Van Rie, J. & Ren, G. (2003.) Characterization of *cry1*, *cry2* and *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. *Journal of invertebrate Pathology*, 82: 63-71. 130. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(02\)00202-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(02)00202-1)

Zhang J, Kumar, S. & Nei, M. (1997) Small-sample tests of episodic adaptive evolution: a case study of primate lysozymes. *Molecular Biology and Evolution*, 14, 1335-1338. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025743>

Zheng, A., Zhu, J., Tan, F., Guan, P., Yu, X., Wang, S., Deng, Q., Li, S., Liu, H. & Li, P. (2010). Characterization and expression of a novel haplotype *cry2A*-type gene from *Bacillus thuringiensis* strain JF19-2. *Annals of Microbiology*, 60(1), 129–134. <https://doi.org/10.1007/s13213-009-0011-x>