

Análisis de la estabilidad de una bacteria recombinante con actividad larvicida

Stability analysis of a recombinant bacterium with larvicidal activity

Nora Helena Restrepo¹
María Mercedes Patiño
Sergio Orduz

Resumen

La tecnología del ADN recombinante abre nuevas alternativas para la obtención de microorganismos mejorados para su producción a gran escala, pero la inestabilidad de los plásmidos recombinantes durante largos períodos de cultivo es un problema serio para uso industrial. El objetivo de este trabajo fue introducir en una bacteria acuática nativa de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* (CIB 30-0501b) el plásmido pGSP11 que contiene los genes que codifican la toxina binaria de *B. sphaericus* y analizar la expresión y estabilidad de este plásmido bajo condiciones de laboratorio. El análisis indicó que la bacteria presentó mejor crecimiento en el medio de cultivo Luria Bertani a 28°C y con tetraciclina a una concentración de 30 mg/ml. La presencia del plásmido pGSP11 se detectó a partir de las 8 horas de crecimiento, lo cual coincide con el momento en que se inició la expresión de las proteínas que éste codifica. Sin embargo, la temperatura tuvo un efecto más notorio sobre la inhibición de la síntesis de la toxina binaria que sobre la presencia del plásmido en las células. La presencia del antibiótico que ejerce el factor de selección, demostró un efecto importante en el mantenimiento del plásmido en el tiempo.

Palabras claves: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, Propiedades biológicas, Toxinas, Plásmidos, Biotecnología, Control biológico.

Summary

The recombinant DNA technology offers new alternatives in the production of improved microorganisms for large scale production. However, the instability of recombinant plasmids during long culture periods is a serious problem for industrial use. The aim of this work was to introduce in the native aquatic bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* CIB 30-0501b the plasmid pGSP11 that contains the genes coding the binary toxin of *B. sphaericus* and to analyze the expression and stability of this plasmid under laboratory conditions. This analysis showed that the bacterium grew best in the culture medium Luria Bertani broth at 28°C with tetracycline (30 mg/ml). The presence of the pGSP11 plasmid was detected after eight hours of growth, coinciding with the moment that the expression of the plasmid-coded toxins started. An increase in the culture temperature was always correlated with a decrease in toxin synthesis which was not accompanied by plasmid loss. The presence of the selection antibiotic showed an important effect in plasmid conservation.

Introducción

La bacteria *Bacillus sphaericus* Neide (*Bs*) ha demostrado ser altamente efectiva en el control de varias especies de mosquitos (Yousten 1984). La toxina producida por esta bacteria es letal en pequeñas concentraciones y persiste por más tiempo en el ambiente acuático que la toxina de *B. thuringiensis* Berliner (*Bt*) H-14 (Ali et al. 1989). El potencial de *Bs* como agente de control ha creado interés en realizar estudios adicionales para introducir nueva información genética y mejorar aspectos tales como su producción y características larvicidas. Ejemplos de

tales mejoras han sido la inserción del gen que codifica para la toxina de 130-KDa de *Bt* H-14 en *Bs* 2362 para mejorar su actividad larvicida contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) (Trisrisook et al. 1990).

Plásmidos que transportan el gen *xyIE* que codifica para la catechol 2,3 dioxigenasa han sido insertados en *Bs* cepa 1593 para probar un método simple de detección colorimétrica para rastreo de la bacteria en el ambiente (Taylor y Burke 1991). Puesto que éstos y otros genes pueden ser insertados en *Bt* y *Bs* sobre plásmidos, es importante conocer la estabilidad de los plásmidos en las bacterias manipuladas genéticamente, tanto durante su producción como después de su liberación. Se han observado dos tipos comunes de inestabilidad: Estructural, que consiste en la inestabilidad genética del plásmido en sí mismo, reacomodamientos y más frecuentemente deleciones, y la inestabilidad segregacional o sea la eficiencia de la transferencia del plásmido de células madres a hijas durante la división celular con pérdida completa del plásmido (Ehrlich et al. 1986). Si los plásmidos se pierden debido a inestabilidad segregacional, la característica introducida podría perderse.

Se pretende obtener una bacteria acuática, nativa de los criaderos de larvas de mosquito, que una vez transformada genéticamente produzca las proteínas tóxicas de *B. sphaericus* y que sea estable para ser aplicada en el control de especies de mosquitos vectores de enfermedades, especialmente que tenga acción larvicida sobre los anofelinos de importancia médica.

Materiales y Métodos

La Dra. Armelle Delecluse, de la Unidad de Bacterias Entomopatógenas, Instituto Pasteur de París, donó los genes de las proteínas tóxicas de 41,9 y 51,4 kilodaltons (KDa) de *Bs* 1593 contenidos en un fragmento *HindIII* de 3,5 kilobases (Kb) de ADN clonado en el plásmido pGSP11. El plásmido pGSP11 fué formado al insertar los genes de la toxina binaria en el sitio de multiple clonaje (SMC) del vector bifuncional pBU4, que ha su vez fué for-

¹ Respectivamente, Investigadoras y Entomólogo, Jefe. Unidad de Biotecnología y Control Biológico. Corporación para Investigaciones Biológicas. CIB. Apartado Aéreo 7378. Medellín, Colombia.

mado por la fusión de fragmentos de restricción *Eco*O109 del plásmido pUC19 y *Eco*RI de pBC16-1 (Fig. 1) (Bourgouin et al. 1990). Uno de los fragmentos corresponde al plásmido bifuncional pBU4 (Fig. 1A), en el que se ha insertado el segundo fragmento de 3,5 Kb de los genes de la toxina binaria de *Bs* 1593 (Fig. 1B). Una vez confirmada la presencia de los genes de la toxina binaria de *Bs* 1593 en el plásmido pGSP11, se procedió a la transformación de la célula huésped *Bt* CIB 30-0501b con este plásmido.

Obtención de la cepa *Bt* CIB 30-0501b

La bacteria acuática nativa, cepa CIB 30-0501b corresponde a *B. thuringiensis* subsp. *israeliensis* (*Bti*) con actividad tóxica para larvas de mosquito, aislada de la superficie de un criadero localizado en la zona de Turbaco (Bol.). Esta cepa fue la única de un grupo de bacterias nativas previamente seleccionadas que se logró transformar con el plásmido pGSP11 mediante el método de electroporación, en un electroporador Bio-Rad según las especificaciones del fabricante y la metodología de Bone y Ellar (1989).

La presencia del plásmido pGSP11 en la bacteria transformada se confirmó mediante la extracción del ADN plasmídico por un método de lisis alcalina según la técnica de extracción de plásmidos de *Bacillus* recomendada por el Instituto Pasteur (Comunicación personal). La visualización del ADN después de restricción con la enzima *Hind*III se realizó por medio de electroforesis en gel de agarosa 0,8% teñido con bromuro de etidio. Se confirmó la funcionalidad de dichos genes demostrando la actividad larvicida ejercida por cepas de *E. coli* transformadas con dicho plásmido y por la cepa acristalífera de *Bti* 4Q2-81, que se vuelve tóxica al ser transformada con pGSP11.

Para evaluar la expresión de las proteínas tóxicas de *Bs* contenidas en el plásmido pGSP11, en la bacteria recombinante CIB 30-0501b pGSP11, la cepa se cultivó a dos temperaturas, 28°C y 40°C, en medio de cultivo con y sin el antibiótico, el cual sirve de agente de selección para la presencia del plásmido en bacilos (te-

traciclina 30 mg/ml). Se evaluó una fase vegetativa temprana y una fase tardía del crecimiento bacteriano. Se hicieron recuentos de unidades formadoras de colonias (UFC) en cajas de petri con medio Luria Bertani (LB)-agar (Sambrook et al. 1989) con y sin tetraciclina.

La cepa CIB 30-0501b pGSP11 se replicó en medio Luria Bertani (LB)-agar pH 7,2 con tetraciclina 30 mg/ml, a partir del cultivo stock en LB-glicerol mantenido a -70°C y se incubó toda la noche a 30°C para tener un cultivo fresco al iniciar el estudio. Del crecimiento fresco en LB con tetraciclina se tomó una asada y se inoculó un tubo con 5,5 ml de LB sin antibiótico. Este tubo se incubó por 4 horas a 30°C y 200 rpm. Luego se tomaron 500 ml de muestra de este tubo y se realizó la lectura de la densidad óptica a 600 nm para finalmente diluir el cultivo con LB estéril a una densidad óptica de 0,6 de absorbancia a 600 nm. Al tener listo el inóculo a la densidad óptica adecuada, se tomaron 8 ml de éste y se virtieron de a 2 ml en cuatro erlenmeyers de 250 ml, con 50 ml de LB cada uno (inóculo al 4%). A dos de los erlenmeyers se les adicionó tetraciclina a una concentración final de 30 mg/ml. Se mezclaron bien y se tomó 1 ml de muestra de cada uno, las cuales corresponden al tiempo 0. Luego se incubaron por 8 horas en las siguientes condiciones:

1. 28°C, 200 rpm, LB con tetraciclina.
2. 40°C, 200 rpm LB con tetraciclina.
3. 28°C, 200 rpm LB sin tetraciclina.
4. 40°C, 200 rpm LB sin tetraciclina.

Al cumplir 8 horas de incubación, se tomaron 2 ml de muestra de cada cultivo, correspondientes al tiempo 8, y se incubaron nuevamente en iguales condiciones hasta cumplir 24 y 48 horas, en las cuales se tomaron nuevamente 2 ml de muestra de cada uno que corresponden a los tiempos 24 y 48, respectivamente.

Con las muestras tomadas en los tiempos 0, 8, 24 y 48 se procedió a evaluar los siguientes parámetros:

- Lectura de densidad óptica a 600 nm para determinar el crecimiento bacteriano en cada una de las condiciones de cultivo.

- Recuentos de colonias con diluciones de 100 ml de cultivo, sembrados por triplicado en el medio correspondiente a cada tratamiento e incubados a la temperatura respectiva toda la noche.

- Placa para colorear por la tinción de Shaffer-Fulton¹ y detectar algún tipo de contaminación y si hubo esporulación en los cultivos.

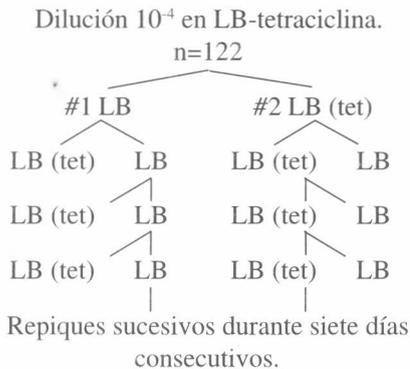
- Western Blot para determinar la expresión de las proteínas de *Bs* codificadas en el plásmido pGSP11. La síntesis de las proteínas tóxicas se evaluó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, en condiciones denaturantes. Las proteínas se visualizaron con azul de Coomassie. Se efectuó transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa, en las que se evidenció la presencia de las proteínas tóxicas mediante técnicas de inmunodetección usando el anticuerpo primario fabricado en ratón contra las proteínas tóxicas de *Bs* y un conjugado de proteína A marcada con la enzima fosfatasa alcalina, y se añadió el substrato naftol fosfato y sistema de color adecuado, fast red (Sigma Chemical Co).

- Minipreparaciones de ADN para tratar de aislar el plásmido pGSP11 que contiene los genes que codifican las proteínas de *Bs*. La extracción de plásmidos se hizo utilizando el método de la lisis alcalina de Birnboim y Doly (1979) modificado por Promega Biotec (1986). El ADN que se obtuvo, se sometió a digestión con la enzima *Hind*III, y los productos de esa digestión se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 0,8 % y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio bajo transiluminación con luz ultravioleta (Sambrook et al. 1989).

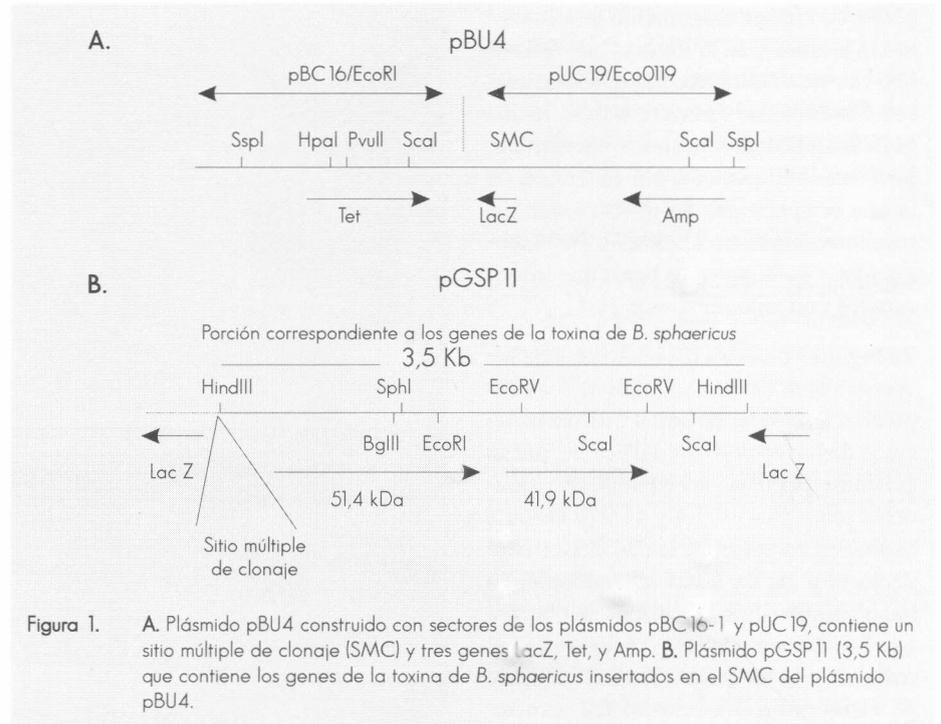
Para evaluar la estabilidad en el tiempo del plásmido pGSP11 en la bacteria CIB 30-0501b pGSP11 se procedió a crecer la cepa CIB 30-0501b pGSP11 en 5 ml de medio MI (conteniendo por litro:

¹ (S. SINGER. Comunicación personal)

proflo 1 g, peptona 5 g, glucosa 3 g, KH_2PO_4 6 g, solución de sales 10 ml, buffer de potasio 200 ml) por 48 horas a 200 rpm, hasta obtener un cultivo completo final (ccf) bien esporulado. Luego se hicieron diluciones (10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}) de este ccf en 4,5 ml de PBS (buffer salino fosfato) estéril y se sometieron a un choque térmico por 12 minutos a 80°C para eliminar las escasas células vegetativas. Posteriormente se sembraron 100 ml de cada dilución en medio LB-agar y LB-agar con tetraciclina 30mg/ml. Las cajas se incubaron por 24 horas a 30°C . Al obtener el crecimiento de las colonias se hicieron los respectivos recuentos en cada dilución y se seleccionó el recuento de la dilución 10^{-4} en LB con tetraciclina, el cual presentó un total de 122 colonias. Luego cada colonia se repicó en medio LB-agar y LB-agar con tetraciclina (30 mg/ml), con el fin de iniciar la evaluación de la estabilidad segregacional, o sea el paso del plásmido de células madres a células hijas (Ver esquema).



A partir del crecimiento del primer repique en LB y LB-tetraciclina se comenzaron a estudiar dos vías, una (#1) a partir de repiques sucesivos de cada colonia a partir del medio LB a medio LB y LB (tet) por ocho días consecutivos para observar la estabilidad del plásmido sin la presión del antibiótico, y otra vía (#2) fue a partir de repiques sucesivos de cada colonia a partir del medio LB (tet) a medios LB y LB (tet) por siete días consecutivos para evaluar la estabilidad del plásmido con la presión del antibiótico, el cual sirve de agente de selección para la presencia del plásmido pGSP11. Los repiques de cada día se incubaron a $29 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 horas. De cada colonia se llevó un registro diario de crecimiento pa-



ra finalmente determinar el porcentaje de colonias estables en cada una de las condiciones. Después de cada 24 horas de incubación, las colonias que crecieron en el medio LB pero fallaron en crecer sobre LB-tetraciclina eran sospechosas de la pérdida de resistencia a dicho antibiótico y nuevamente se transfirieron a LB y LB-tetraciclina para confirmar la pérdida. La resistencia a tetraciclina está codificada en el plásmido pGSP11 en el fragmento pBU4. Para reconfirmar esta pérdida de resistencia, la colonia se repicó a partir del LB a 5 ml de LB-tetraciclina y se incubó por 24 horas a 30°C , 200 rpm. Una vez terminados los pases, se seleccionó al azar el 11,5% de la población que había perdido la resistencia, incluyendo colonias de cada repique, para verificar la pérdida del plásmido pGSP11 mediante el aislamiento del ADN plasmídico por la técnica de lisis alcalina recomendada por el Instituto Pasteur.

Resultados y Discusión

La Figura 2 muestra los resultados de las curvas de crecimiento según las variaciones en la densidad óptica. Los resultados sugieren que los medios que mejor soportaron el crecimiento de la cepa CIB 30-0501b pGSP11 fueron aquellos cuya

incubación se llevó a cabo a 28°C , tanto con o sin la presión del antibiótico (tetraciclina 30 mg/ml). La presión de la alta temperatura afecta el crecimiento del cultivo en los medios LB con y sin tetraciclina. A las 48 horas de crecimiento, en todos los tratamientos se comenzó a observar la presencia de algunos bacilos que empezaron a formar el espacio que ocupará la spora en su interior, y se observaron escasas células esporuladas. Debido a que el medio LB es un medio muy nutritivo, se observó un retraso en la esporulación ya que todavía, posiblemente, no se habían agotado los nutrientes.

La Tabla 1 muestra los resultados de los recuentos de colonias en 100 ml de una dilución 10^{-5} . Se presenta el resultado promedio de 3 replicaciones. Los resultados de estos recuentos no se correlacionan con los datos de la curva de crecimiento obtenida de la densidad óptica, en donde a las 48 horas se observa un aumento de la absorbancia que indica un aumento del crecimiento bacteriano con respecto a las 24 horas, contrario a los recuentos que en las 48 horas muestran una disminución del recuento de colonias respecto a la lectura anterior. En el tratamiento LB-tetraciclina 40°C no se presentó crecimiento de colonias en la dilución 10^{-5} ,

pero pudo haber crecimiento en diluciones más altas, y en la Figura 2 se observa que en este tratamiento fué donde se presentó la densidad óptica más baja, lo que indica menos crecimiento bacteriano, posiblemente afectado por la acción de la alta temperatura. Se observa que los recuentos correspondientes a los tratamientos a 40°C son más bajos que los recuentos correspondientes a 28°C.

La Figura 3 muestra los resultados de los Western blot. Estos resultados indican expresión temprana (8 horas post-inoculación) de las proteínas codificadas por el plásmido pGSP11, las cuales corresponden a proteínas de 51,4 y 41,9 (KDa). La expresión es óptima a las 24 horas, para decrecer a las 48 horas. Claramente, en todas las muestras analizadas se observa que la expresión de las proteínas es muy reducida a la temperatura de 40°C, tanto en el medio LB como en LB con tetraciclina. Esto puede ser un reflejo del efecto de la temperatura en el proceso general de síntesis proteica más que un efecto específico inhibitorio de la síntesis de la toxina binaria. Sin embargo, con la información obtenida no se puede llegar a una conclusión definitiva.

La Figura 4 muestra los resultados del análisis de la presencia del plásmido pGSP11 a las 8, 24 y 48 horas (post inoculación) en el panel A, B y C, respectivamente. No se evaluó ninguna muestra a las 0 horas porque en esta etapa tan temprana el número de bacterias presentes no permiten obtener ADN plasmídico para estudiar. Se puede observar detección del pGSP11 en la etapa temprana de 8 horas, especialmente en los tratamientos con tetraciclina, debido a la presión que ejerce la selección con el antibiótico; el mismo resultado puede también observarse a las 24 y 48 horas. En general, en los paneles B y C (líneas 1 y 2) se observa que las muestras provenientes de crecimiento en medio sin antibiótico muestran una menor recuperación del plásmido tanto a 28 como a 40°C.

Los resultados del ensayo de estabilidad del plásmido pGSP11 se observan en la Tabla 2. Estos resultados revelaron que el plásmido es mantenido establemente en el 100% de la población durante los

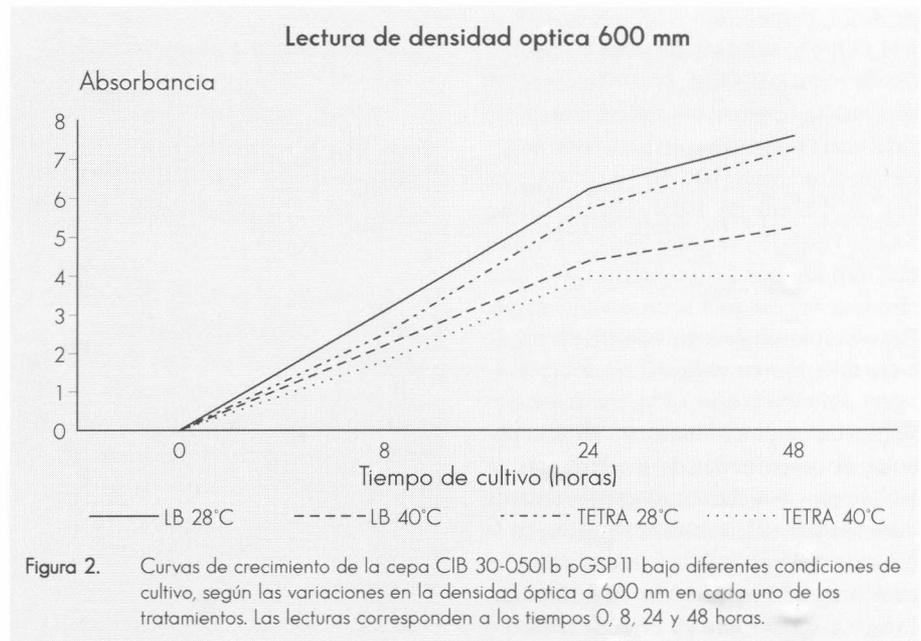


Figura 2. Curvas de crecimiento de la cepa CIB 30-0501 b pGSP11 bajo diferentes condiciones de cultivo, según las variaciones en la densidad óptica a 600 nm en cada uno de los tratamientos. Las lecturas corresponden a los tiempos 0, 8, 24 y 48 horas.

Tabla 1. Recuentos de colonias de los cultivos de la cepa 30-0501 b pGSP11 en la dilución 10⁻⁵ en los cuatro tratamientos.

	0 horas	8 horas	24 horas	48 horas
LB 28°C	1,3	105,3	195,6	179
LB 40°C	0,6	69,3	25,6	57
LB+Tet* 28°C	0,3	84,3	206,0	121
LB+Tet* 40°C	0	0	0	0

*Corresponde al antibiótico que sirve de marcador de la presencia del plásmido pGSP11 (Tetraciclina 30 mg/ml).

siete días de repiques consecutivos, cuando existe la presión de selección del antibiótico que sirve de marcador de la presencia del plásmido pGSP11 en las células (tetraciclina 30 mg/ml). En cambio, cuando no hubo presión de selección del antibiótico durante los ocho días de crecimiento de las colonias, éstas perdieron su característica de resistencia a la tetraciclina desde el primer repique (1,64% de la población) hasta el octavo repique (100% de la población), siendo esta respuesta muy sugestiva de la pérdida del plásmido pGSP11.

Al realizar el aislamiento del ADN plasmídico, al 11,5% de la población (n=14) que había perdido su característica de resistencia a la tetraciclina y de hacer el corte con la enzima *HindIII*, se esperaba encontrar en el gel de agarosa la ausencia del plásmido pGSP11, pero al visualizar este gel, se observó que la mayoría de las

colonias habían conservado la porción del plásmido correspondiente al fragmento pBU4 y no se observó ninguna banda a nivel del fragmento de 3,5 Kb correspondiente a los genes de las toxinas de *Bs*, pero se observaba un fragmento más pequeño, de aproximadamente 2,8 a 3 Kb (Fig. 5). En vista del resultado obtenido, se realizó un Western blot con una alícuota de los mismos cultivos usados para hacer las minipreparaciones de ADN y se reveló con anticuerpos específicos para las proteínas de *Bs* fabricados en ratón. El Western blot mostró que ninguna de las 14 colonias expresaba las proteínas de 51,4 y 41,9 KDa de la toxina de *Bs*, lo que llevó a plantear algunas hipótesis: (1). Se presentó un daño estructural a nivel del fragmento de 3,5 Kb de los genes de las proteínas tóxicas que impidió la expresión de las proteínas. (2). Hubo un daño o reacomodamiento estructural a nivel del plásmido completo, ya que tam-

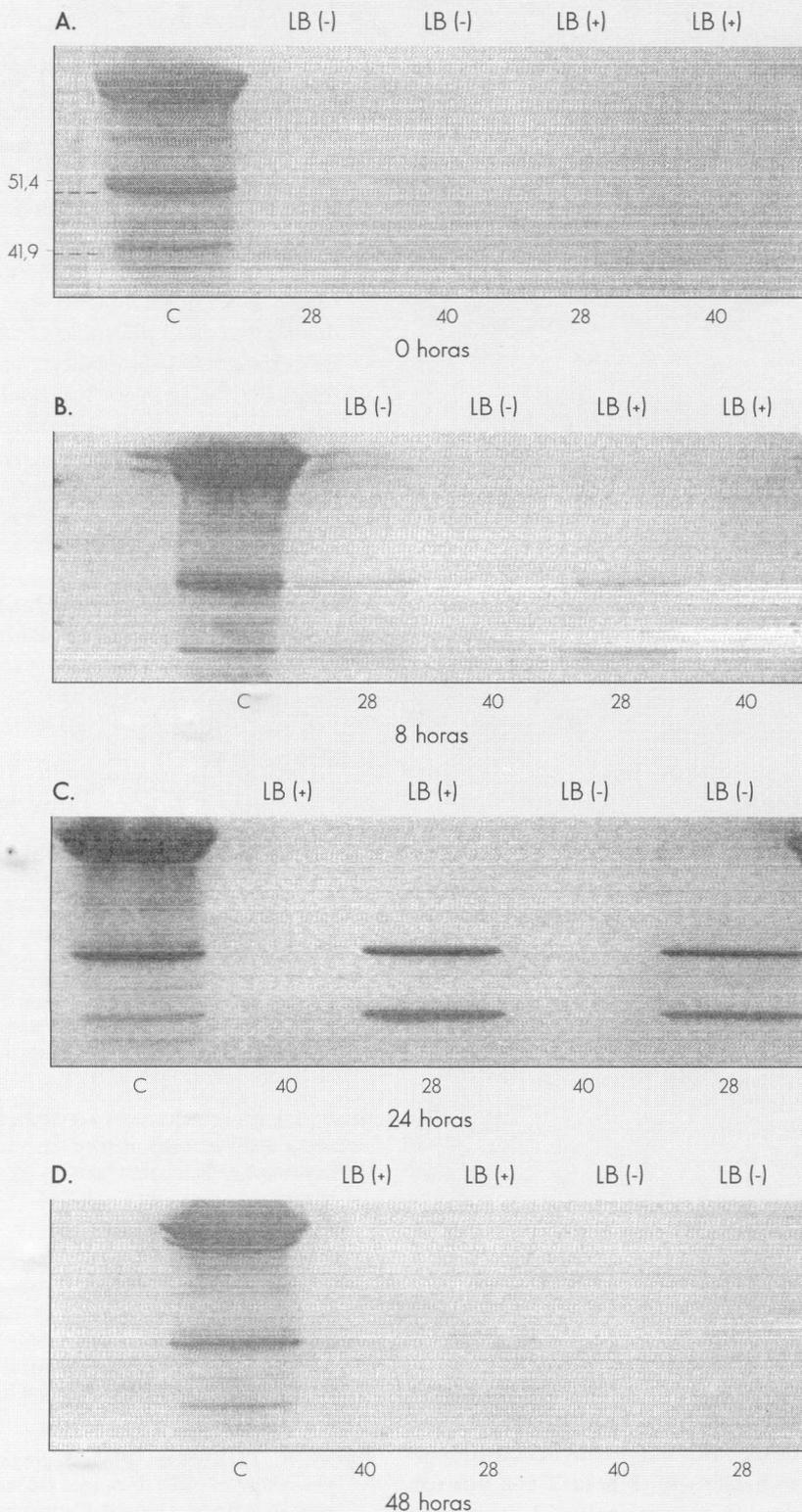


Figura 3. Western blot de las muestras correspondientes a los tiempos 0, 8, 24 y 48 horas en los paneles A, B, C y D, respectivamente. C: Muestra control. Corresponde a un cultivo completo final de una cepa de *Bs* CIB 143-1310 que demuestra las proteínas de 51,4 y 41,9 KDa que conforman el cristal tóxico. 28 y 40 corresponden a las temperaturas de incubación de cada uno de los tratamientos. LB(-) corresponde a medio sin antibiótico (tetraciclina); LB(+) corresponde a medio con tetraciclina 30 mg/ml.

bién se afectó la resistencia al antibiótico marcador. (3). Debido a la presencia del fragmento correspondiente al vector pBU4, al parecer no hubo inestabilidad segregacional del plásmido sino más bien un problema de tipo estructural que afectó las características del mismo al no haber tenido la presión de selección.

La inestabilidad estructural puede deberse a deleciones, inserciones o reacomodamiento del ADN. Algunos de los primeros reportes de deleciones se realizaron en vectores bifuncionales, los cuales se replican tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas (Kreft y Hughes 1982; Ehrlich et al. 1982) presentando el pBU4 esta característica. Las deleciones espontáneas han sido ahora detectadas en un amplio rango de ADNs plasmídicos, virales y cromosomales. La inestabilidad segregacional que se define como la pérdida del plásmido entero de su huésped, ocurre en forma natural. Se ha registrado que los plásmidos con bajo número de copias son establemente mantenidos y que los que poseen alto número de copias son segregados al azar en la división celular (Meacock y Cohen 1980). La inestabilidad de los plásmidos puede también presentarse como resultado de formas multiméricas del plásmido y del tamaño del mismo (Bron y Luxen 1985).

Conclusiones

- Con los resultados obtenidos se puede concluir que la bacteria recombinante CIB 30-0501b pGSP11 presenta un mejor crecimiento en medio Luria Bertani (LB) a 28°C con tetraciclina a una concentración de 30 mg/ml, pero que el crecimiento se ve afectado por la acción de la alta temperatura (40°C) y esto repercute considerablemente en el proceso de expresión de las proteínas de 51,4 y 41,9 KDa de *B. sphaericus* contenidas en el plásmido pGSP11 que ella transporta.
- La reducción del crecimiento bacteriano se puede observar tanto en las curvas de crecimiento obtenidas de las variaciones en la densidad óptica como en los recuentos de colonias, en comparación con el crecimiento del cultivo a 28°C. En este aspecto es

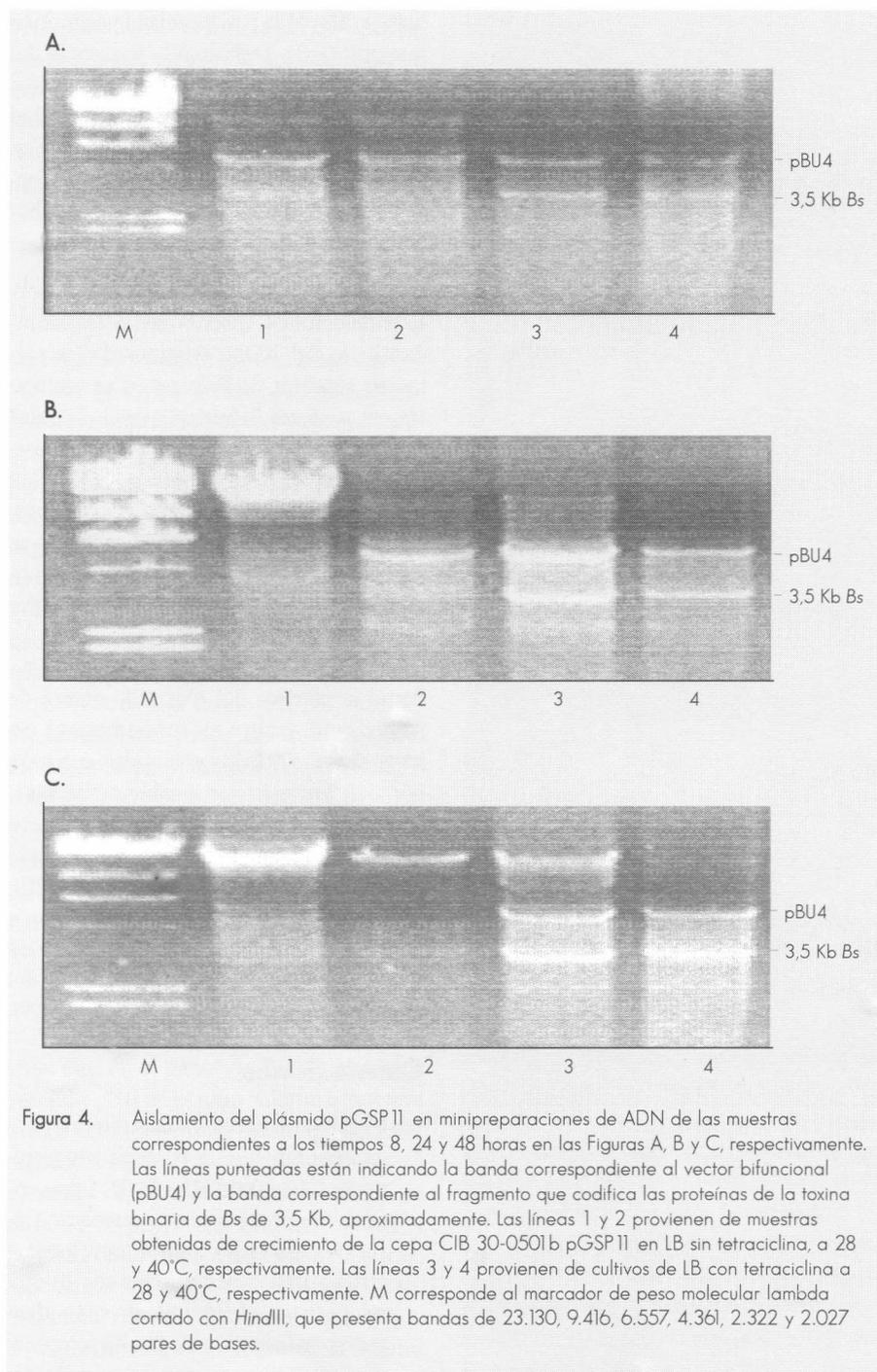


Figura 4. Aislamiento del plásmido pGSP11 en minipreparaciones de ADN de las muestras correspondientes a los tiempos 8, 24 y 48 horas en las Figuras A, B y C, respectivamente. Las líneas punteadas están indicando la banda correspondiente al vector bifuncional (pBU4) y la banda correspondiente al fragmento que codifica las proteínas de la toxina binaria de Bs de 3,5 Kb, aproximadamente. Las líneas 1 y 2 provienen de muestras obtenidas de crecimiento de la cepa CIB 30-0501 b pGSP11 en LB sin tetraciclina, a 28 y 40°C, respectivamente. Las líneas 3 y 4 provienen de cultivos de LB con tetraciclina a 28 y 40°C, respectivamente. M corresponde al marcador de peso molecular lambda cortado con HindIII, que presenta bandas de 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322 y 2.027 pares de bases.

importante realizar pruebas adicionales de crecimiento bacteriano, estabilidad del plásmido y expresión de las proteínas a temperaturas menos extremas, que oscilen entre los 30 y los 37°C, ya que la temperatura de 40°C es un factor extremo poco probable de presentarse en las aguas de los criaderos naturales de mosquitos, en donde solo se ha reportado temperaturas de hasta 35°C.

Es importante resaltar que la expresión de las proteínas de Bs toma lugar desde fases tempranas del crecimiento bacteriano (8 horas), con una expresión máxima a las 24 horas para luego decaer a las 48 horas, pero la detección temprana de estas proteínas podría ser indicativa de que la bacteria puede presentar toxicidad debida a estas proteínas desde una fase tan temprana del desarrollo bacteriano.

Se observa que la presión de selección con el antibiótico (tetraciclina 30 mg/ml) en las condiciones de cultivo es muy importante para el mantenimiento del plásmido en el tiempo, ya que la falta de presión con el antibiótico conlleva a la pérdida de resistencia a la tetraciclina y la pérdida de expresión de las proteínas tóxicas posiblemente por daños estructurales (delecciones, inserciones o reacomodamientos) en el plásmido completo o en el fragmento que codifica las proteínas tóxicas, pero con los resultados obtenidos no se puede determinar con exactitud el tipo de daño que ocasionó la inestabilidad.

Agradecimientos

Esta investigación recibió ayuda financiera de la Fundación para la Educación Superior (FES) y la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB).

Bibliografía

ALI, A.; WEAVER, M.; COSTENMOYER, E. 1989. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israeliensis* (Vectobac 12 AS) and *Bacillus sphaericus* 2362 (AGB-6232) against *Culex* spp. mosquitoes in a dairy lagoon in Central Florida. *Florida Entomologist* (Estados Unidos) v. 72, p. 585-591.

BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* (Reino Unido) v. 7, p. 1513-1523.

BONE, E.J.; ELLAR, D.J. 1989. Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation. *Federation of European Microbiology Societies. Microbiology Letters* (Holanda) v. 58, p. 171-178.

BOURGOUIN, C.; DELÉCLUSE, A.; DE LA TORRE, F.; SZULMAJSTER, J. 1990. Transfer of the toxin protein genes of *Bacillus sphaericus* into *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* and their expression. *Applied and Environmental Microbiology* (Estados Unidos) p: 340-344.

BRON, S.; LUXEN, E. 1985. Segregational instability of pBU110-derived recombinant plasmid in *Bacillus subtilis*. *Plasmid* (Estados Unidos) v. 14, p. 235-244.

EHRlich, S.D.; NIAUDET, B.; MICHEL, B. 1982. Use of plasmid from *Staphylococcus aureus* for cloning of DNA in *Bacillus subtilis*. In: R. H. Hofscheider; W. Goebel (Eds.). *Gene Cloning in Organisms other than E. coli*. Springer-Verlag, Berlín. p. 19-29.

Tabla 2. Estabilidad en el tiempo del plásmido pGSP11 en la cepa CIB 30-0501b pGSP11.

Repique ^a n=122	#1 colonias tet S ^b	#1 % de tet S (%)	#2 colonias tet S ^b	#2 % de de tet S (%)
1	2	1,64	0	0
2	0	0,00	0	0
3	4	3,28	0	0
4	38	31,15	0	0
5	59	48,36	0	0
6	17	13,93	0	0
7	0	0,00	0	0
8	2	1,64	-	-
Total	122	100,00	0	0

- a. Corresponde a los repiques sucesivos de las 122 colonias durante ocho días consecutivos.
 #1 corresponde al ensayo de repiques sucesivos sin la presión del antibiótico tetraciclina (de medio LB a LB y LB tet).
 #2 corresponde al ensayo de repiques sucesivos con la presión del antibiótico (de LB tet a LB y LB tet).
 b. Corresponde al número de colonias que crecieron en medio LB-agar pero fallaron en crecer en medio LB-tetraciclina porque perdieron su característica de resistencia.
 S: tetraciclina sensibles.

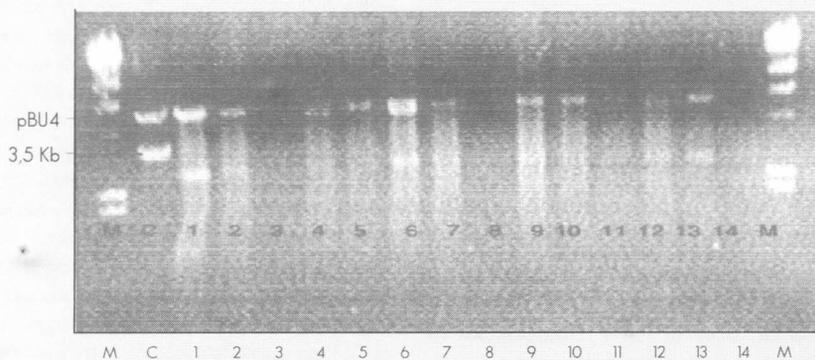


Figura 5. Aislamiento de ADN plasmídico de las colonias tetraciclina sensibles. M: corresponde al marcador de peso molecular lambda cortado con *Hind*III. C: corresponde a ADN plasmídico de la cepa CIB 30-0501b pGSP11 cortado con *Hind*III, en el cual se observan las bandas correspondientes al fragmento pBU4 y al fragmento de 3,5 Kb de los genes tóxicos de *Bs*. Los números 1 al 14 corresponden a ADN plasmídico de las colonias tetraciclina sensibles cortado con la enzima *Hind*III donde se observa una banda al nivel del fragmento pBU4 y una banda de 2,8 a 3 Kb. En las columnas correspondientes a las colonias 3, 8 y 11 hay poca concentración de ADN.

- EHRLICH, S.D.; NOIROT, P.; PETIT, M.A.; JANNIERE, L.; MICHEL, B.; TERIELE, H. 1986. Structural instability of *Bacillus subtilis* plasmids. In: J.K. Setlow; A. Hollander (Eds.). Genetic Engineering. Plenum, New York, p. 71-83.
- KREFT, J.; HUGHES, C. 1982. Cloning vectors derived from plasmid and phages of *Bacillus*. In: R. H. Hofschneider; W. Goebel (Eds.). Gene Cloning in Organisms other than *E. coli*. Springer-Verlag, Berlín. p. 1-17.
- MEACOCK, P.A.; COHEN, S.N. 1980. Partitioning of bacterial plasmid during cell division: A cis-acting locus that accomplishes stable plasmid inheritance. *Cell* (Estados Unidos) v. 20, p. 529-542.
- PROMEGA BIOTEC. 1986. Biological Research Products, 1986/1987 Catalogue. Section 3, p. 4.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. Molecular Cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- TAYLOR, L.D.; BURKE, W.F. Jr. 1991. Construction of tracer plasmids for *Bacillus sphaericus* 1593 utilizing the *xyIE* gene from *Pseudomonas putida*. *Journal of Invertebrate Pathology* (Estados Unidos) v. 57, p. 66-70.
- TRISRISOOK, M.; PANTUWANTANA, S.; BHUMIRATANA, A.; PANBANGRED, W. 1990. Molecular cloning of the 130-Kilodalton mosquitocidal delta endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* in *Bacillus sphaericus*. *Applied and Environmental Microbiology* (Estados Unidos) v. 56, p. 1710-1716.
- YOUSTEN, A.A. 1984. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. In: A. Mizrahi; A.L. van Wezel (Eds.). *Advances in Biotechnological Processes*. A. R. Liss, New York. p. 315-343.