



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**Escuela Nacional de Ciencias Biológicas**

Sección de Estudios de Posgrado e Investigación

**Caracterización morfológica y bioquímica**  
**de *Bacillus thuringiensis* Bt-EM14**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO**  
**BIOLÓGICAS**  
**P R E S E N T A**  
**Q.B.P. SALVADOR EMBARCADERO JIMÉNEZ**

**DIRECTORES**  
**Dra. Luz Irene Rojas Avelizapa**  
**Dr. Ramón Cruz Camarillo**



México D.F.

Junio 2011



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-14-BIS

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de México D. F., siendo las 12:30 horas del día 25 del mes de mayo del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para examinar la tesis titulada:

**Caracterización morfológica y bioquímica de *Bacillus thuringiensis* Bt-EM14**

Presentada por el alumno:

<u>Embarcadero</u> Apellido paterno	<u>Jiménez</u> Apellido materno	<u>Salvador</u> Nombre(s)							
Con registro:									
<table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px 10px;">B</td> <td style="padding: 2px 10px;">0</td> <td style="padding: 2px 10px;">9</td> <td style="padding: 2px 10px;">1</td> <td style="padding: 2px 10px;">0</td> <td style="padding: 2px 10px;">1</td> <td style="padding: 2px 10px;">6</td> </tr> </table>			B	0	9	1	0	1	6
B	0	9	1	0	1	6			

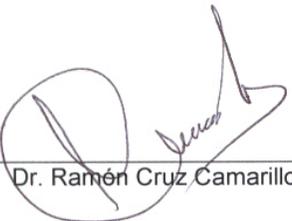
aspirante de:

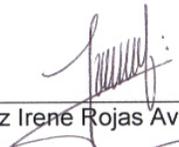
**Maestría en Ciencias Quimicobiológicas**

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

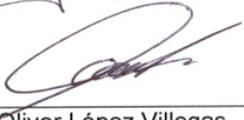
**LA COMISIÓN REVISORA**

Directores de tesis

  
 \_\_\_\_\_  
 Dr. Ramón Cruz Camarillo

  
 \_\_\_\_\_  
 Dra. Luz Irene Rojas Avelizapa

  
 \_\_\_\_\_  
 Dr. En Tao Wang Hu

  
 \_\_\_\_\_  
 Dr. Edgar Oliver López Villegas

  
 \_\_\_\_\_  
 Dra. Deifilia Ahuatzí Chacón

  
 \_\_\_\_\_  
 Dra. Nora Ruiz Ordaz

**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**

  
 \_\_\_\_\_  
 Dr. Manuel Jesús Piñón López





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México, D.F., el día 25 del mes Mayo del año 2011, el que suscribe Salvador Embarcadero Jiménez alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias Quimicobiológicas con número de registro B091016, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dra. Luz Irene Rojas Avelizapa y Dr. Ramón Cruz Camarillo y ceden los derechos del trabajo intitulado Caracterización morfológica y bioquímica de *Bacillus thuringiensis* Bt-EM14, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección sembarcadero@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
Salvador Embarcadero Jiménez

  
Dra. Luz Irene Rojas Avelizapa

  
Dr. Ramón Cruz Camarillo

Las obras de los seres humanos son como el oro, y las joyas de un galeón hundido que el océano arrojó a la playa: son el único triunfo que puede alcanzar un ser efímero frente al enigma del tiempo y el destino...

Jacques Soustelle

México y los cuatro soles

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Enzimas Microbianas del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Ramón Cruz Camarillo y la Dra. Luz Irene Rojas Avelizapa

Trabajo apoyado por los proyectos

SIP 20090912

SIP 20101478

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi sincero agradecimiento a todos aquellos que contribuyeron a la realización de este trabajo.

A mis asesores, Dr. Ramón Cruz Camarillo y Dra. Luz Irene Rojas Avelizapa, por su apoyo y dedicación.

A mis compañeros en el Laboratorio de Enzimas Microbianas: Brenda, Fabiola, Dario y Antonio por su camaradería y apoyo a lo largo de dos años.

Al Dr. Édgar Oliver López Villegas por su apoyo, asesoría y trabajo realizado para la obtención de las micrografías electrónicas en la Central de Microscopía de la ENCB.

Por su tiempo y revisión final del documento a la Dra. Nora Ruíz Ordaz, Dr. Deifilia Ahuatzi Chacón y Dr. En Tao Wang Hu, y al Dr. Édgar Oliver López Villegas.

A todos aquellos cuyos nombres se me escapan de la memoria y que permitieron la finalización de este trabajo.

**Este trabajo está dedicado a mi familia, ya que sin su apoyo y cariño incondicional no hubiera sido posible llevarlo a buen término. Gracias por su comprensión y por aguantar las desveladas.**

## ÍNDICE GENERAL DE LA OBRA

ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
RESUMEN.....	viii
SUMMARY.....	ix
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 El grupo <i>Bacillus cereus</i> .....	1
1.1.1 <i>B. cereus</i> .....	2
1.1.2 <i>B. anthracis</i> .....	2
1.1.3 <i>B. thuringiensis</i> .....	4
1.1.4 <i>B. mycoides</i> .....	6
1.1.5 <i>B. pseudomycoides</i> .....	7
1.1.6 <i>B. weihenstephanensis</i> .....	7
1.2 Identificación de los miembros del grupo <i>B. cereus</i> .....	7
1.3 Cepas atípicas del grupo <i>B. cereus</i> .....	11
1.3.1 Cepas atípicas patógenas de <i>B. thuringiensis</i> .....	13
1.3.2 Cepas atípicas de <i>B. thuringiensis</i> aisladas en Trinidad y Tobago.....	14
1.4 Antecedentes de la cepa Bt-EM14, objetivo de la presente investigación.	14
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>15</b>
<b>3. OBJETIVO PRINCIPAL.....</b>	<b>16</b>
3.1 Objetivos particulares.....	17
<b>4. METODOLOGÍA .....</b>	<b>18</b>
4.1 Cepas y condiciones de cultivo .....	18
4.2 Caracterización morfológica .....	20
4.2.1 Tinción de Gram .....	20
4.2.2 Tinción de esporas .....	20
4.2.3 Tinción negativa de la cápsula .....	20
5.2.4 Tinción de McFaydean para cápsula .....	20
4.2.5 Tinción de cristales paraesporales .....	21

4.2.6 Tinción diferencial de cristales paraesporales con amido negro y fucsina básica.....	21
4.2.7 Tinción flagelar .....	21
4.3 Pruebas bioquímicas .....	22
4.3.1 Pruebas de movilidad y producción de indol.....	22
4.3.2 Pruebas de catalasa .....	22
4.3.3 Reducción de nitratos .....	23
4.3.4 Licuefacción de gelatina .....	23
4.3.5 Arginina descarboxilasa .....	23
4.3.6 Crecimiento en medios con alta salinidad .....	23
4.4 Perfil exoenzimático de Bt-EM14 .....	24
4.4.1 Actividad amilolítica .....	24
4.4.2 Actividad de pectinasa .....	25
4.4.3 Actividad de quitinasa .....	25
4.4.4 Actividad de quitosanasa .....	25
4.4.5 Actividad de celulasa .....	25
4.4.6 Actividad de estearasa .....	26
4.4.7 Actividad de fosfolipasa .....	26
4.4.8 Actividad de lipasas .....	26
4.4.9 Actividad de caseinasa .....	27
4.4.10 Actividad de elastasa .....	27
4.4.11 Actividad de queratinasa .....	27
4.4.12 Actividad de colagenasa .....	27
4.4.13 Actividad de DNAsa .....	28
4.5 Perfil de asimilación de fuentes de carbono .....	28
4.6 Sistemas comerciales para la identificación de Bt-EM14 .....	29
4.7 Actividad hemolítica .....	29
4.8 Sensibilidad a los antibióticos $\beta$ -lactámicos .....	29
4.9 Bioensayo de patogenicidad en ratón .....	30
4.10 Ensayo de Bt-EM14 contra hongos fitopatógenos .....	31
4.11 Obtención y purificación de la cápsula de Bt-EM14 .....	31

4.12 Cromatografía en capa fina del hidrolizado capsular .....	32
4.13 Ensayo para determinar la unión covalente o laxa de la cápsula a la pared celular.....	32
4.14 Electroforesis de la cápsula de Bt-EM14 .....	33
4.15 Espectrometría IR de la cápsula de Bt-EM14 .....	33
4.16 Separación de los cristales paraesporales de Bt-EM14 .....	34
4.16.1 Purificación de los cristales mediante sistema bifásico .....	34
4.16.2 Recuperación de los cristales de Bt-EM14 mediante ultracentrifugación .....	35
4.17 Determinación del peso molecular de las proteínas del cristal .....	35
4.18 Microscopía electrónica de barrido de los cristales de Bt-EM14 .....	36
4.19 Estudio de la ultraestructura y del ciclo de esporulación de Bt-EM14 mediante microscopía electrónica de transmisión .....	37
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>38</b>
5.1 Aspectos morfológicos .....	38
5.2 Tinción de McFaydean para cápsula de PGA .....	39
5.3 Pruebas bioquímicas .....	42
5.4 Perfil exoenzimático y perfil de asimilación de fuentes de carbono .....	44
5.5 Identificación de Bt-EM14 utilizando el sistema API50 CHB y BBL-Crystal .....	46
5.6 Prueba de actividad hemolítica .....	48
5.7 Sensibilidad a antibióticos $\beta$ -lactámicos .....	50
5.8 Análisis del material capsular por cromatografía en capa fina .....	51
5.9 Patrón electroforético de la cápsula .....	52
5.10 Espectroscopía IR .....	53
5.11 Unión de la cápsula a la pared celular .....	56
5.12 Bioensayo en ratones .....	58
5.13 Bioensayo en placa contra hongos filamentosos .....	61
5.14 Recuperación de cristales y perfil electroforético .....	62

5.15 Ultraestructura de los cristales de Bt-EM14 mediante Microscopía Electrónica de Barrido.....	64
5.16 Observación del proceso de esporulación de Bt-EM14 mediante Microscopía Electrónica de Transmisión.....	65
5.17 Discusión General .....	75
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>78</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>80</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>81</b>
8.1 Manuales y páginas electrónicas.....	93

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Microorganismos empleados en el presente trabajo.....	18
<b>Tabla 2.</b> Pruebas bioquímicas primarias para la identificación de <i>Bacillus</i> .....	43
<b>Tabla 3.</b> Perfiles enzimáticos comparativos entre Bt-EM14 y microorganismos del grupo <i>B. cereus</i> .....	45
<b>Tabla 4.</b> Asimilación de diferentes fuentes de carbono por las cepas microbianas probadas .....	46
<b>Tabla 5.</b> Resultados del sistema API 50CHB para la identificación de Bt- EM14.....	47
<b>Tabla 6.</b> Resultados del sistema BBL-Crystal para Bt-EM14 .....	48
<b>Tabla 7.</b> Picos de absorción en el espectro IR de los enlaces covalentes de las muestras de PGA incluidas en pastillas de KBr.....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Tres técnicas de microscopía para demostrar la presencia de la cápsula de poli-D-glutamato de <i>B. anthracis</i> .....	4
<b>Figura 2.</b> Micrografía electrónica de transmisión de <i>B. thuringiensis</i> en la que se muestra un cristal proteico romboidal y una espora madura.....	5
<b>Figura 3.</b> Árbol filogenético obtenido a través del alineamiento de las secuencias del gen 16S rRNA de varias especies de <i>Bacillus</i> .....	9
<b>Figura 4.</b> Árbol filogenético obtenido a través de la tipificación de secuencias multilocus (MLST) y alineamiento con el algoritmo Neighbor-Joining, de diversas cepas de microorganismos del grupo de <i>B. cereus</i> .....	10
<b>Figura 5.</b> Aspectos morfológicos de Bt-EM14.....	40
<b>Figura 6.</b> Resultados de la tinción de McFaydean.....	41
<b>Figura 7.</b> Tinción de Bt-EM14 mediante la técnica de McFaydean .....	42
<b>Figura 8.</b> Halos de hemólisis en agar suplementado con sangre de carnero, fotografiados después de 24 h de incubación.....	49
<b>Figura 9.</b> Halos de hemólisis en agar suplementado con sangre de carnero, fotografiados después de 72 h de incubación.....	49

<b>Figura 10.</b> Prueba de sensibilidad a la penicilina G.....	50
<b>Figura 11.</b> Cromatograma realizado en placa de sílica gel.....	52
<b>Figura 12.</b> Electroferograma de las muestras de PGA de <i>B. subtilis</i> DAF-1 y Bt-EM14.....	53
<b>Figura 13.</b> Espectro de absorción en la región del infrarrojo que corresponde al PGA de Bt-EM14 en pastilla de KBr.....	54
<b>Figura 14.</b> Espectro de absorción en la región del infrarrojo que corresponde al PGA de <i>B. subtilis</i> DAF-1 en pastilla de KBr.....	55
<b>Figura 15.</b> Comparativa de los perfiles de absorción del PGA de Bt-EM14 y <i>B. subtilis</i> DAF-1.....	56
<b>Figura 16.</b> Tinción negativa con tinta china de Bt-EM14 para determinar la unión de la cápsula a la pared celular.....	57
<b>Figura 17.</b> Micrografías de <i>B. anthracis</i> obtenidas mediante microscopía óptica.....	60
<b>Figura 18.</b> Fotografía que muestra los halos de inhibición del crecimiento de <i>Curvularia</i> sp. producido por el antagonismo de Bt-EM14. ....	61
<b>Figura 19.</b> Representación del tubo de ultracentrífuga y fotomicrografía de los cristales de Bt-EM14 teñidos con azul de Coomasie.....	63
<b>Figura 20.</b> Electroferograma en gel de poliacrilamida al 8%, de las proteínas del cristal de Bt-33 y Bt-EM14.....	64
<b>Figura 21.</b> Electromicrografías de barrido de los cristales irregulares de Bt-EM14.....	65
<b>Figura 22.</b> Micrografía electrónica de transmisión de Bt-EM14, mostrando los estadios iniciales del crecimiento de Bt-EM14.....	66
<b>Figura 23.</b> Micrografías electrónicas de transmisión de Bt-EM14, en las que se observa la etapa II del ciclo de esporulación.....	66
<b>Figura 24.</b> Micrografía electrónica de transmisión de Bt-EM14 y de <i>B. subtilis</i> DAF-1.....	68

<b>Figura 25.</b> Micrografías electrónicas de transmisión de Bt-EM14, en las que se observa la etapa III del ciclo de esporulación.....	69
<b>Figura 26.</b> Micrografía electrónica de transmisión de Bt-EM14, correspondiente al final de la etapa III del ciclo de esporulación.....	69
<b>Figura 27.</b> Micrografía electrónica de transmisión de Bt-EM14, en las que se observa la etapa IV del ciclo de esporulación.....	70
<b>Figura 28.</b> Micrografía electrónica de transmisión de Bt-EM14, en la que se observan las etapas V y VI del ciclo de esporulación.....	71
<b>Figura 29.</b> Micrografía electrónica de transmisión de Bt-EM14, en la que se observa la etapa VII del ciclo de esporulación.....	72
<b>Figura 30.</b> Micrografía electrónica de transmisión de Bt-EM14, en la que se observa la lisis de la célula madre después de 60 h.....	73
<b>Figura 31.</b> Micrografías electrónicas de transmisión de cristales libres de Bt-EM14.....	74
<b>Figura 32.</b> Micrografías electrónicas de transmisión de Bt-EM14 y <i>B. thuringiensis</i> HD-1.....	75

## RESUMEN

La bacteria Bt-EM14 fue aislada de muestras de agua colectadas en el Pitch Lake, en la isla de Trinidad en el Caribe. Se trata de un bacilo Gram-positivo, aerobio, formador de esporas y capaz de sintetizar cristales proteicos paraesporales. Por tales características se sugirió que podría ser una cepa de *Bacillus thuringiensis*. Sin embargo, observaciones realizadas mediante microscopía óptica empleando tinción negativa, revelaron la presencia de una cápsula rodeando el cuerpo bacteriano. La cápsula recordaba a la producida por *B. anthracis*, el agente etiológico del ántrax.

En la presente investigación se realizó la identificación de Bt-EM14, empleando para ello pruebas de microbiología convencional para bacilos Gram-positivos esporulados. También se emplearon los sistemas API 50CHB y BBL-Crystal. Los resultados mostraron que Bt-EM14 pertenece al grupo *B. cereus*. Además se determinaron los perfiles exoenzimáticos y asimilatorios de diversas fuentes de carbono. Tales perfiles se realizaron simultáneamente con otras cepas de *Bacillus* empleadas como referencia. Los perfiles de Bt-EM14 fueron muy similares a los de las cepas de *B. thuringiensis* probadas.

Otro aspecto de la investigación fue determinar si Bt-EM14 era una cepa de *B. anthracis*, por lo que se realizaron las pruebas de producción de hemolisinas, movilidad y susceptibilidad a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Los resultados mostraron que Bt-EM14 no es una cepa de *B. anthracis*. No obstante, se realizó un bioensayo de patogenicidad con ratones, a los cuales se les inocularon por vía intraperitoneal esporas de Bt-EM14. Los resultados mostraron que Bt-EM14 no produjo daño alguno en los animales inoculados.

Por otro lado, se determinó también la composición química de la cápsula de Bt- mediante cromatografía en capa fina, electroforésis en geles de poliacrilamida y espectroscopía en la región del infrarrojo. Los resultados mostraron que la cápsula está constituida por ácido poliglutámico, y sus características son similares a algunas cepas silvestres de *Bacillus subtilis*.

En cuanto a los cristales paraesporales de Bt-EM14, estos fueron aislados y purificados, se analizaron mediante SDS-PAGE. Se encontró que dichos cristales están constituidos por al menos dos proteínas, una de ellas con un peso molecular de 43 KDa, mientras que el peso molecular de la otra proteína fue superior a los 66 KDa. Los cristales fueron también observados mediante microscopía electrónica de barrido, encontrándose que poseen una forma irregular, con un tamaño aproximado de 1  $\mu$ m de largo.

Mediante microscopía electrónica de transmisión se observó todo el proceso de esporulación y la formación del cristal paraesporal. Como cepa tipo se empleó a *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD-1. Se observó que Bt-EM14 presenta los 7 estadios típicos de la esporulación descritos en la cepa tipo HD-1.

Considerando el conjunto de resultados se concluyó que la presencia del cristal proteico paraesporal, en conjunto con la batería de pruebas bioquímicas y el perfil exoenzimático, sustentan que Bt-EM14 es una inusual cepa capsulada de *B. thuringiensis*.

## SUMMARY

The bacterial strain Bt-EM14 was found in water samples collected from the “Pitch Lake”, located in the Trinidad Island at the Caribbean Sea. Such strain is a Gram-positive, aerobic, spore former, able to synthesize an intracellular proteinic crystal. According with such features, Bt-EM14 was considered initially as a *Bacillus thuringiensis* strain. However, observations by optical microscopy using negative staining revealed the presence of a capsule surrounding the bacterial body. Such structure is normally found in *Bacillus anthracis*, but do not in *B. thuringiensis*, although both bacterial species are genetically closed.

The aim of the present study was to identify the bacterial strain Bt-EM14, by using conventional biochemical test for Gram-positive spore-formers, including some commercial kits as the API 50CHB and the BBL-Crystal ones. Results showed that Bt-EM14 belonged to the *B. cereus* group. Other assays as the profile of 13 extracellular hydrolytic enzymes, as well the utilization of a set of carbohydrates as carbon sources, showed that Bt-EM14 had a similar behaviour with respect to the *B. thuringiensis* typical strains included in the assays.

Another aspect of the research was to determine whether Bt-EM14 was a new strain of *B. anthracis*, able to produce intracellular proteinic crystals. Therefore, its ability to produce hemolysins, the presence of functional flagella for movility, and its resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics, was investigated. In addition, the pathogenicity of Bt-EM14 on a mice model was also studied. Results showed that the studied bacterium is not a pathogenic one, which it is either a *B. anthracis* strain.

With respect to the capsulate of Bt-EM14, its composition and characteristics were studied by thin-layer chromatography, polyacrylamide gel electrophoresis and infrared spectroscopy. Results showed that such cellular structure is formed by polyglutamic acid and its molecular weight and characteristics are similar to the capsule found in some wild type strains of *B. subtilis*.

Related to the parasporal crystals produced by Bt-EM14, such proteinic bodies were purified by a discontinuous gradient ultracentrifugation technique, and then analyzed using PAGE-SDS electrophoresis. The crystals showed to be composed by at least two different proteins, whose molecular weights were 43 and more 66 KDa. The crystals showed an irregular, non-previously described shape, the crystals were observed by scanning electronic microscopy. Their size is close to one micron.

Another aspect of the present study concerns to the sporulation cycle, and the formation of the intracellular crystals, by means of transmission electron microscopy. The well-known *B. thuringiensis* HD-1 strain was included as a reference. The results showed that Bt-EM14 presents the seven typical stages during its sporulation, as occurred with the reference strain.

The conclusion of the present study is that considering the presence of the paraesporal proteinic crystal, and as well the biochemical and extracellular enzymes profiles, Bt-EM14 is a rare capsulated strain of *B. thuringiensis*.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 El grupo de *Bacillus cereus*

*B. thuringiensis* es un microorganismo estrechamente emparentado con *B. anthracis* y *B. cereus*, los que por sus características genotípicas y fenotípicas han sido incluidos como miembros del grupo *B. cereus*, aunque en años recientes han sido considerados como una sola especie, al tomar en cuenta la evidencia molecular que brinda el análisis de sus genomas (Helgason *et al.* 2000). Sin embargo, se siguen diferenciado por sus características fenotípicas; *B. thuringiensis* produce cristales proteicos con acción insecticida, mientras que *B. anthracis* es considerado una arma biológica por poseer una cápsula con actividad antifagocítica y una toxina letal de naturaleza proteica; en tanto que *B. cereus* produce intoxicaciones alimentarias. La capacidad para producir los cristales proteicos intracelulares de *B. thuringiensis*, y los factores de virulencia de *B. cereus* y de *B. anthracis*, están codificados en plásmidos de alto peso molecular, cuya pérdida reduce o elimina la virulencia de las cepas. Colectivamente, estos organismos presentan una gran importancia económica y médica (Rasko *et al.* 2005).

A este grupo se han incorporado recientemente las especies *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* y *B. weihenstephanensis* (Lechner *et al.* 1998; Nakamura 1998). En general, sus integrantes presentan morfología bacilar, son Gram-positivos y formadores de endoesporas. Sus colonias son planas, secas o cremosas con bordes irregulares, las cuales crecen confluentemente en pocos días. En medios enriquecidos con sangre de mamífero, algunas especies como *B. cereus* expresan fosfolipasas extracelulares, produciendo hemólisis.

Son organismos quimiorganoheterótrofos, aerobios y catalasa positivos. La mayoría de las especies pueden emplear el nitrato como aceptor final de electrones. Su metabolismo es versátil, al ser capaces de degradar una gran variedad de carbohidratos de alto peso molecular, aminoácidos y ácidos orgánicos. En el caso de *B. thuringiensis*, destaca su capacidad de degradar quitina y quitosana.

La mayoría son mesófilos, con crecimiento óptimo entre 28 y 35 °C, aunque *B. weihenstephanensis* es psicrotolerante a temperaturas de refrigeración (Lechner *et al.* 1998).

La mayoría presenta motilidad mediante flagelos peritricos, y su tiempo de generación en medio de cultivo es aproximadamente de 25 min. (Todar 2011). Todos los microorganismos del grupo presentan autólisis de la pared celular, la cual es un mecanismo para la liberación de la espora madura, y en el caso de *B. thuringiensis*, este proceso permite además la liberación del cristal paraesporal (Raddadi *et al.* 2005). A continuación se describen con más detalle las características particulares de los miembros de este grupo bacteriano.

### **1.1.1 *B. cereus***

*B. cereus* es un microorganismo ubicuo, aunque su nicho ecológico primario es el suelo. En la naturaleza es un microorganismo comensal, que coloniza los intestinos de invertebrados, (Margulis *et al.* 1998). Se aísla de una gran variedad de alimentos ricos en almidón y azúcares, como harina de maíz, puré de papa y arroz. La contaminación de estos alimentos por *B. cereus* han producido en años recientes grandes brotes de intoxicaciones alimenticias. También es considerado un patógeno oportunista frecuentemente aislado en pacientes inmunocomprometidos, que son sometidos a cirugía mayor y tratamientos invasivos. Las infecciones más comunes que produce *B. cereus* son endoftalmitis, septicemia, endocarditis, infecciones cutáneas, neumonía y meningitis (Drobniewski 1993). La virulencia de las infecciones oportunistas causadas por *B. cereus* se ve agravada por su gran capacidad para producir diversas de exoenzimas hidrolíticas, tales como lipasas, proteasas, esterases, hialuronidasas y hemolisinas (Rasko *et al.* 2005).

### **1.1.2 *B. anthracis***

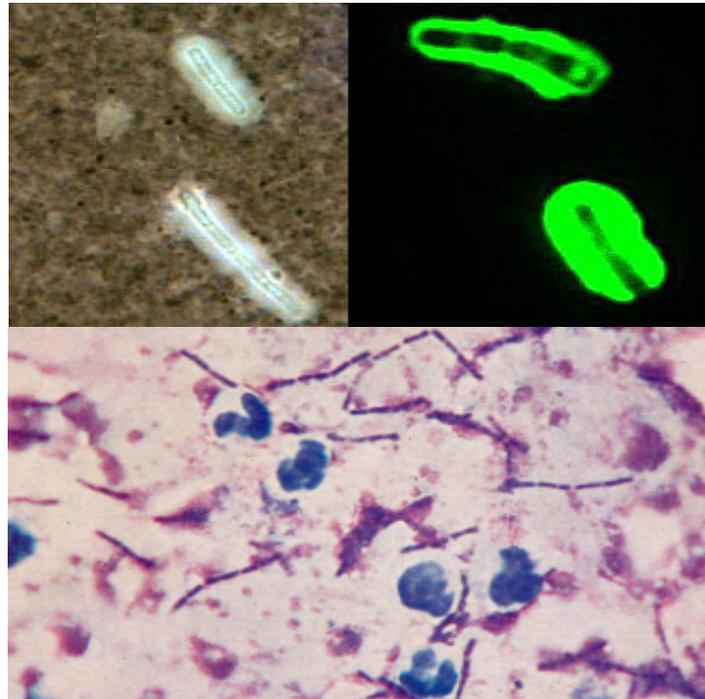
*B. anthracis* es el agente etiológico del ántrax, enfermedad fatal de curso agudo que afecta principalmente a mamíferos rumiantes. La bacteria se ha aislado en los cinco continentes, principalmente del suelo, en donde se encuentra en estado esporulado.

La espora de *B. anthracis* es altamente resistente al calor, radiaciones ionizantes y ultravioleta, presión y agentes químicos, lo que le permite sobrevivir intacta por décadas, incluso siglos (Turnbull 1999). Por esta característica, y su facilidad de cultivo y dispersión, es una potencial arma biológica con fines terroristas, tal como ocurrió durante los brotes intencionales de ántrax posteriores a los eventos del 11 de Septiembre del 2001 en los Estados Unidos (Atlas 2002).

El ciclo de la infección producida por *B. anthracis* comienza con la ingestión de las esporas por mamíferos herbívoros, en donde germinan produciendo células vegetativas, las cuales se multiplican y producen los factores de virulencia que terminan matando a su hospedero. Después de la muerte del animal, las células vegetativas esporulan al ser expuestas al oxígeno y yacen en el suelo completando el ciclo (Mock & Fouet 2001). Aunque el microorganismo se encuentra diseminado a nivel mundial, la incidencia de ántrax en la población humana es limitada. El principal grupo de riesgo son personas que tienen contacto con animales vivos o con productos de carne y piel, como es el caso de veterinarios, granjeros, peleteros y carniceros. La infección se presenta en forma cutánea, respiratoria y digestiva (Todar 2011).

*B. anthracis* posee importantes factores de virulencia: una cápsula de ácido poli-D-glutámico (PGA), y una toxina de tres componentes proteicos. Ambos factores están codificados en plásmidos de alto peso molecular, cuya pérdida elimina la virulencia de la cepa. La toxina tripartita de *B. anthracis* está codificada en el plásmido pXO1, de 186 megadaltones, el cual porta los genes estructurales que codifican para las proteínas que conforman las exotoxina de *B. anthracis*: factor edema, factor letal y el antígeno protector (Rasko *et al.* 2005). Por otra parte, la cápsula de PGA no es tóxica por sí misma, pero permite al microorganismo protegerse de la fagocitosis y de la opsonización. Los genes necesarios para la síntesis de la cápsula están codificados en el plásmido pXO2, un plásmido de 90 megadaltones (Candela *et al.* 2005). La detección de la cápsula se puede realizar mediante tinción negativa con tinta china, por inmunofluorescencia y con la tinción especial de McFadyean, o de azul de metileno policrómico para la observación conjunta de cápsula y de la célula microbiana (Figura 1). La observación de la cápsula es una característica para el diagnóstico presuntivo. Además, las

cepas “clásicas” de *B. anthracis* carecen de movilidad, son sensibles a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, y no expresan hemolisinas. (Hoffmaster *et al.* 2004).

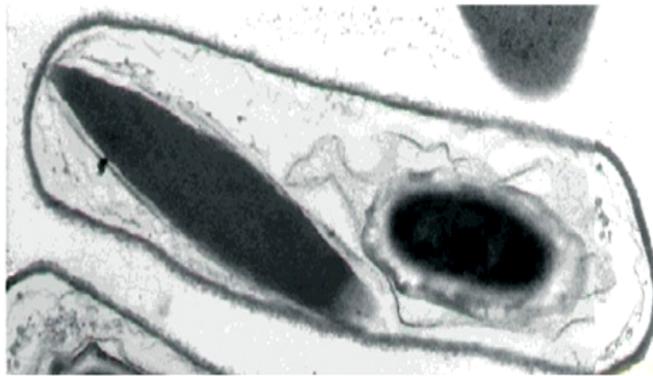


**Figura 1.** Tres técnicas de microscopía para demostrar la presencia de la cápsula de poli-D-glutamato de *B. anthracis*. Arriba a la izquierda, tinción negativa con tinta china. Arriba a la derecha, inmunofluorescencia directa con anticuerpos específicos para los componentes de la cápsula y proteínas asociadas. Abajo, tinción con azul de metileno policrómico de muestras sangre de ganado muerto por ántrax. Las estructuras rosas amorfas alrededor de los bacilos corresponden al polímero capsular, mientras que los cuerpos azules son leucocitos polimorfonucleares. Imágenes tomadas de Todar (2011).

### 1.1.3 *B. thuringiensis*

*B. thuringiensis* (Bt) fue descubierto en 1911, como patógeno de las polillas de la harina en la provincia de Thuringia, Alemania. En 1938, fue empleado por primera vez en Francia como bioinsecticida comercial, y luego en los Estados Unidos en la década de los 50's. *B. thuringiensis* es una bacteria cosmopolita, ya que se ha aislado en suelo, superficie de hojas, polvo, agua dulce y salobre, telarañas, arena de mar, aguas termales, entre otros sitios de aislamiento (Alam *et al.* 2010).

La característica distintiva de este microorganismo es que forma durante la esporulación, cuerpos paraesporales comúnmente denominados cristales (Helgason *et al.* 2000). Estos cristales son de naturaleza proteica y presentan actividad insecticida. Las proteínas que los conforman son denominadas  $\delta$ -endotoxinas, también conocidas como proteínas Cry. Estas proteínas son activas contra las larvas de insectos, tales como lepidópteros (orugas de mariposas y polillas), dípteros (mosquitos), y coleópteros (escarabajos) (Höfte & Whiteley, 1989; Bravo *et al.* 1992), las cuales están codificadas mayoritariamente en plásmidos, muchos de ellos autotransferibles (Aronson *et al.* 1995). Los cristales pueden presentar diferencias de forma y de tamaño, y pueden ser romboidales, amorfos, bipiramidales, cuboidales, esféricos, entre otros (Figura 2).



**Figura 2.** Micrografía electrónica de transmisión de *B. thuringiensis* en la que se muestra un cristal proteico romboidal y una espora madura. Tomado de Soberón y Bravo 2003.

El modo de acción de las  $\delta$ -endotoxinas consiste en lo siguiente: primero, los cristales proteicos liberados durante la esporulación de *B. thuringiensis* son ingeridos por las larvas de insectos. Posteriormente los cristales son solubilizados en el intestino, debido a su pH alcalino. Al solubilizarse el cristal quedan en libertad proteínas no tóxicas, llamadas protoxinas. Estas protoxinas son procesadas parcialmente por proteasas digestivas, las cuales generan la toxina activa. Después, la  $\delta$ -endotoxina se une a receptores específicos localizados en las membranas de las células que constituyen el epitelio intestinal. Dicha unión desequilibra la estructura de tales membranas formando poros, lo cual altera la presión osmótica de las células, provocando su muerte. Esto provoca a su vez la muerte por inanición de la larva del

insecto, debido a su incapacidad de asimilar nutrientes y a la pérdida de agua y sales (Höfte & Whiteley 1989; Knowles 1994).

Además de las  $\delta$ -endotoxinas, *B. thuringiensis* ha desarrollado otros factores de virulencia que le permiten infectar a sus blancos con mayor eficiencia, como las fosfolipasas (Zhang *et al.* 1993), proteasas (Fedhila *et al.* 2002), quitinasas y exotoxinas termolábiles (Schnepf & Whiteley 1985). *B. thuringiensis* produce también  $\beta$ -exotoxinas, las cuales funcionan como inhibidores de la RNA polimerasa de las células del insecto hospedero (Vila-Bôas *et al.* 2007), así como proteínas VIP que son proteínas insecticidas que se producen en la fase vegetativa del crecimiento bacteriano (Sevapandiyan *et al.* 2001).

Considerando la estrecha relación de *B. thuringiensis* con *B. cereus* y *B. anthracis*, se pone en duda el dogma de que el liberar grandes cantidades de esporas de *B. thuringiensis* al medio ambiente no se causa ningún efecto nocivo, sobre todo si se toma en cuenta que la transferencia de plásmidos puede alterar dramáticamente los fenotipos de virulencia de estas especies bacterianas. Es por esto que en algunos países las esporas se inactivan por exposición a radiación ionizante (Soberón y Bravo 2003).

#### **1.1.4 *B. mycoides***

*B. mycoides* es un microorganismo común del suelo. Se caracteriza por presentar una vistosa morfología colonial, que recuerda el micelio fúngico, formando remolinos, rizos y bucles que abarcan grandes superficies. Algunas cepas atípicas pueden presentar cápsula de polisacáridos, originando así colonias mucoides. Esta bacteria ha sido empleada de forma experimental como agente fungicida, mediante aspersión mecánica en cultivos de remolacha azucarera para el control de *Cercospora* sp., hongo fitopatógeno que produce la enfermedad del “manchón foliar” (USA Environmental Protection Agency, EPA, 2009).

### **1.1.5 *B. pseudomycooides***

A través de la secuenciación y comparación del gen que codifica al rRNA 16S, así como del estudio de la composición y abundancia de los ácidos grasos presentes en la membrana celular, fue posible diferenciar esta especie microbiana, dentro de un amplio número de muestras de origen ambiental. Esta especie comparte las características fenotípicas de *B. mycooides*, como la inmovilidad de las células vegetativas, la reducción de nitratos, y la producción de diversas fosfolipasas (Nakamura 1998).

### **1.1.6 *B. weihenstephanensis***

Este microorganismo fue considerado inicialmente como una cepa psicrotolerante de *B. cereus*. Fue aislada por primera vez en la localidad de Freising-Weihenstephan, Alemania. Comparte las mismas características microscópicas y de morfología colonial de *B. cereus*. Sin embargo, esta nueva especie se caracteriza por su capacidad de crecer a 4 °C en medio líquido agitado, así como por su incapacidad de crecer a temperaturas superiores a 43 °C. Es un microorganismo que acelera la descomposición de alimentos lácteos. Su identificación se desarrolló al efectuar comparaciones de la secuencias de los genes que codifican al rRNA 16S, tRNA, hibridación DNA-DNA, y por PCR de diversos genes del metabolismo central (Lechner *et al.* 1998).

## **1.2 Identificación de los miembros del grupo de *B. cereus***

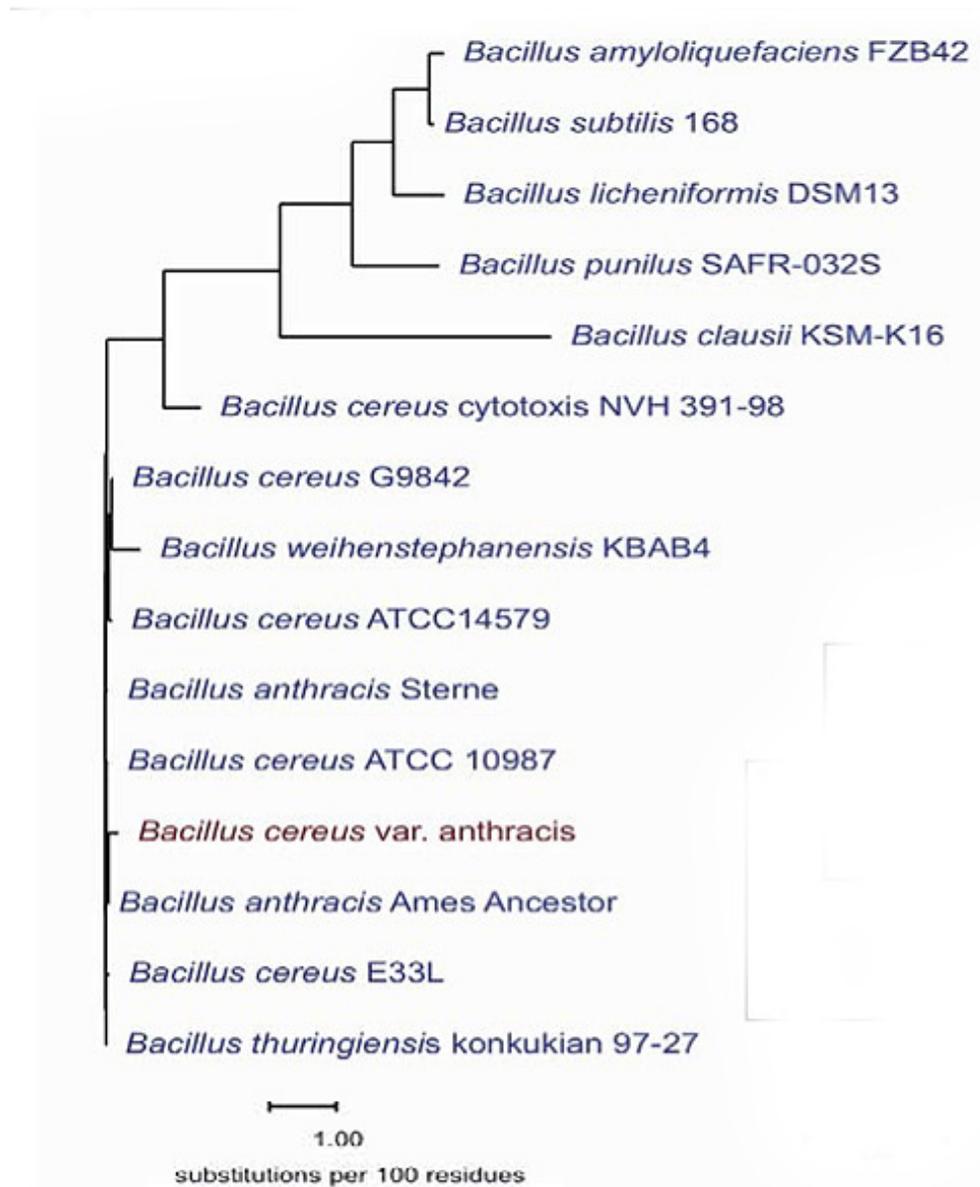
La clasificación y separación taxonómica de los miembros del grupo *B. cereus* ha sido controversial, ya que aún con las modernas tecnologías de la biología molecular, ha sido difícil distinguir diferencias genéticas entre las tres principales especies del grupo, de ahí que prevalezca la opinión de que estos microorganismos son en realidad una sola especie. Los factores de virulencia como la toxina emética de *B. cereus*, la toxina compuesta del ántrax y los cristales paraesporales que expresa *B. thuringiensis* están codificados en plásmidos de alto peso molecular. Una vez perdidos estos plásmidos, no es posible discriminar entre las tres

especies por métodos convencionales. Por lo tanto, se ha sugerido que más que especies distintas, son plasmidovares microbianos (Rasko *et al.* 2005).

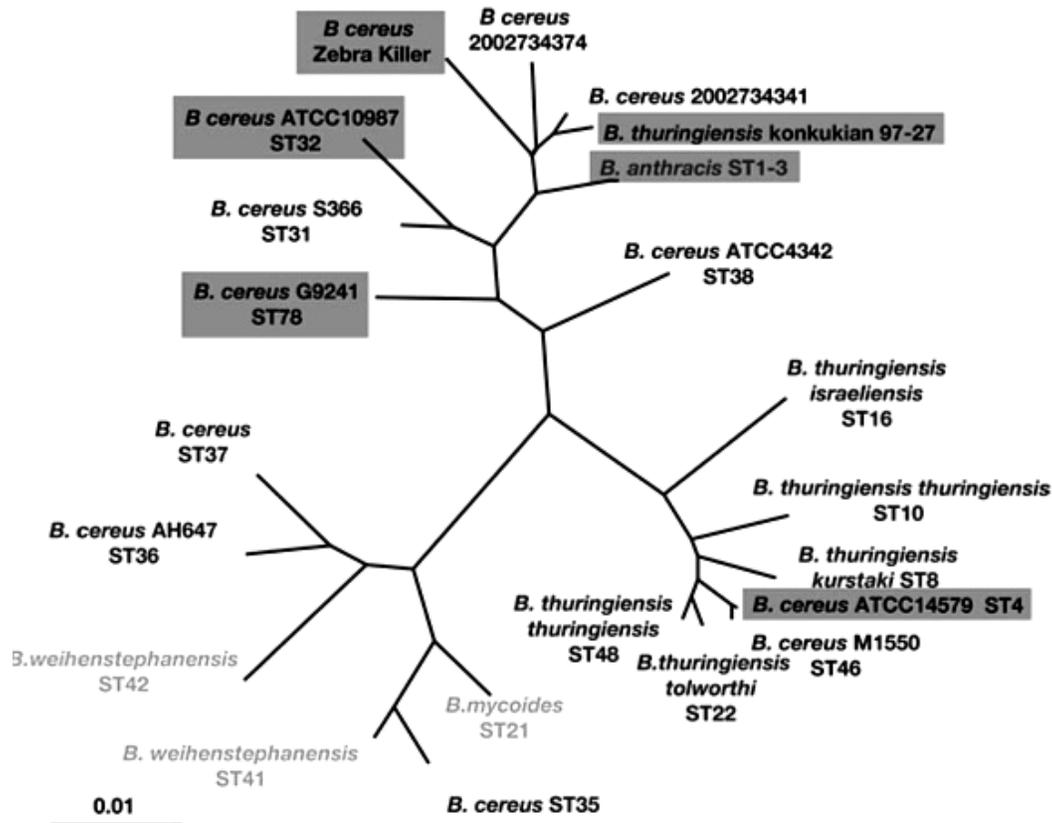
Los primeros métodos utilizados para diferenciar entre *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis*, se basaron en aspectos fenotípicos como la capacidad de degradar diferentes azúcares, polisacáridos complejos, ácidos orgánicos y aminoácidos (Baumann *et al.* 1984). Los perfiles fenotípicos resultantes fueron prácticamente idénticos para *B. cereus* y *B. anthracis*, además de que cada cepa en particular presenta perfiles fenotípicos distintivos, que dependen de las condiciones ambientales y nutricionales en que se desarrolla. Años antes se analizaron sus perfiles de ácidos grasos por cromatografía en fase reversa, pero no se logró una clara diferenciación (Niskanen *et al.* 1978). A fines de los 90's, se intentó establecer diferencias entre *B. thuringiensis* y *B. cereus*, analizando sus perfiles de fosfolípidos a través de cromatografía de alta resolución, pero tampoco se encontraron diferencias significativas (Black *et al.* 1997). Debido a que los perfiles fenotípicos no han sido útiles para diferenciar con certeza a nivel de especie, se han implementado técnicas de biología molecular que han arrojado resultados diversos. Técnicas como la hibridación de DNA-DNA, y secuenciación y alineamiento de regiones intergénicas de los genes que codifican para los rRNA 16S y 26S no permiten distinguir con seguridad entre las diferentes especies (Daffonchio *et al.* 2000).

Comparando la secuencia de varios genes, y por medio del análisis de isoformas de varias enzimas centrales del metabolismo, se encontró que estas tres especies bacterianas son genéticamente indistinguibles (Helgason *et al.* 2000). Con la amplificación, secuenciación y comparación de los genes que codifican el rRNA 16S de varias cepas de *B. anthracis*, *B. thuringiensis* y *B. cereus*, se encontraron diferencias puntuales en 13 nucleótidos no consecutivos, de entre los 1554 pares de bases que comprenden la totalidad del gen, lo que representa menos de 0.8% de diferencia entre las secuencias nucleotídicas, (Figura 3), lo cual se considera evidencia a favor de que los miembros del grupo *B. cereus* son una misma especie (Sacchi *et al.* 2002). Por otra parte, también se han empleado las secuencias del gen 23S rRNA y de los genes *gyrA* y *gyrB* (genes que codifican la DNA topoisomerasa). Sin embargo, no se logró establecer con claridad si *B. thuringiensis* y *B. cereus* son especies diferentes, aunque tampoco pudieron ser unificadas dentro de una sola (Bavykin *et al.* 2004).

El empleo de otras metodologías como la electroforesis de enzimas multilocus (MEE), la tipificación de secuencias multilocus (MLST, figura 4), el análisis de fragmentos fluorescentes de longitud variable (AFLP) y las huellas genéticas, tampoco han sido concluyentes para distinguir entre las tres diferentes especies bacterianas (Rasko *et al.* 2005).



**Figura 3.** Árbol filogenético obtenido a través del alineamiento de las secuencias del gen 16S rRNA de varias especies de *Bacillus*. Los números situados delante del nombre corresponden a la clave de la cepa. En la parte inferior del gráfico se observa la gran homología que tienen las secuencias de los miembros del grupo *B. cereus*. Tomado de Klee *et al.* 2010.



**Figura 4.** Árbol filogenético obtenido a través de la tipificación de secuencias multilocus (MLST) y alineamiento con el algoritmo Neighbor-Joining, de diversas cepas de microorganismos del grupo de *B. cereus*. Se muestran algunas cepas patógenas atípicas descritas en la sección 1.3. El número situado después de las letras ST corresponde a la clave de cada secuencia albergada en la base de datos PubMLST. Tomado de Rasko *et al.* 2005.

Existen sin embargo diferencias sutiles entre *B. thuringiensis* y *B. cereus* con respecto a *B. anthracis*. Una de las más importantes es la mutación *non sense* en *B. anthracis* del factor transcripcional P1cR, el cual modula la expresión de genes que codifican para factores de virulencia, lo cual explica algunas diferencias fenotípicas en *B. anthracis*, tales como la ausencia de actividad hemolítica, la ausencia de lecitinas extracelulares y la inmovilidad celular por la ausencia de flagelos (Agaisse *et al.* 1999; Han *et al.* 2006). Ante la posibilidad de que *B. anthracis* sea empleado como arma bacteriológica, en la actualidad se ha dado un gran impulso a las investigaciones encaminadas a su rápida identificación, a través de metodologías basadas en la detección de proteínas específicas en la superficie de las esporas, en el desarrollo de microarreglos de DNA, y al estudio de morfología y tamaño de las esporas

vistas a través de microscopía electrónica de transmisión (Carrera *et al.* 2006, Felder; *et al.* 2009), lo cual ha permitido la discriminación de cepas de *B. anthracis* “clásicas”, es decir, portadoras de los factores de virulencia, al mismo tiempo que se ha detectado la aparición de cepas atípicas de este microorganismo, que no presentan características fenotípicas propias de *B. anthracis*.

Destaca que sea *B. anthracis* el que presente la mayor homogeneidad genética, en comparación con *B. cereus* y *B. thuringiensis*, esto se explicaría al considerar que las células vegetativas de *B. anthracis* se desarrollan principalmente en mamíferos. Una vez muerto el animal el microorganismo esporula, por lo que se limita el crecimiento y la proliferación de las células vegetativas, reduciendo la oportunidad de intercambio genético (Rasko *et al.* 2005). Sin embargo, *in vitro* se ha observado que las esporas de *B. anthracis* pueden germinar en presencia de raíces de pastos, donde pueden también intercambiar plásmidos con otros miembros del grupo *Bacillus cereus* en la rizósfera (Saile & Koehler 2006).

### **1.3 Cepas atípicas del grupo *B. cereus*.**

La transferencia horizontal de genes es un fenómeno común en los microorganismos, lo que les permite adquirir genes que favorecen su supervivencia y adaptación a las cambiantes condiciones ambientales, para alcanzar nuevos nichos ecológicos. Éste fenómeno se comprobó *in vitro* en el grupo *B. cereus*, al probar que los genes que codifican la cápsula de PGA de *B. anthracis* se encuentran en plásmidos. El plásmido pXO2 fue transferido a cepas de *B. cereus* por transducción mediada por fagos, y a través de transformación genética. La cápsula se expresó en las células de *B. cereus* receptoras, al cultivarlas en un medio alcalino y en atmósfera de CO<sub>2</sub> (Green *et al.* 1985). En años recientes se han aislado cepas atípicas de *B. cereus* y de *B. thuringiensis* que expresan factores de virulencia semejantes a los de *B. anthracis*, dependientes de plásmidos, lo que los convierte en potenciales agentes patógenos para el hombre.

Entre los aislamientos de patógenos atípicos está *B. cereus* G9241, asociado a casos fatales de neumonía (Hoffmaster *et al.* 2004; Sue *et al.* 2006). Este microorganismo posee una cápsula de polisacárido, así como también expresaba la toxina antrácica debido a que portaba un plásmido semejante al pXO1 de *B. anthracis*. La patogenicidad de esta cepa se confirmó infectando ratones, en donde la letalidad fue del 100%, y presentó además resistencia a varios antibióticos de amplio espectro (Hoffmaster *et al.* 2004).

Otros aislamientos comprenden microorganismos aislados en primates africanos en Camerún y en Costa de Marfil, los cuales murieron de una enfermedad semejante al ántrax. Estas cepas diferían significativamente de las cepas clásicas de *B. anthracis*, ya que presentaban movilidad, resistencia al fago Gamma y a la penicilina G. También tenían una cápsula de PGA de síntesis constitutiva. Algunas colonias de cultivos posteriores presentaron actividad hemolítica y susceptibilidad al fago Gamma, lo que sugiere que estas cepas presentaban diferencias puntuales en la regulación genética de los factores de virulencia, en comparación con las cepas típicas de *B. anthracis* (Klee *et al.* 2006). Análisis posteriores por PCR y Southern Blot confirmaron la presencia de los plásmidos pXO1 y pXO2. Debido a su importancia veterinaria y clínica, el genoma de uno de los aislados fue secuenciado por completo y a través de su análisis informático se determinó que el cromosoma bacteriano correspondía a *B. cereus*, pero los plásmidos de virulencia eran de *B. anthracis*. Por este motivo, al aislamiento se le nombró *B. cereus* variedad *anthracis*, aspecto que complica aun más la taxonomía de este grupo microbiano (Klee *et al.* 2010).

También en Namibia, África se aisló a *B. cereus* E33L del cadáver de una cebrá que murió de una infección semejante al ántrax. Aunque se consideró un patógeno oportunista, se detectaron genes que codificaban hemolisinas y proteasas extracelulares (Økstad *et al.* 1999). También se detectaron genes que hipotéticamente codifican una cápsula de polisacárido, semejante a los encontrados en el plásmido pBC218 de *B. cereus* G9241, aunque no se demostró la expresión de dicha cápsula en el laboratorio (Rasko *et al.* 2005).

### 1.3.1 Cepas atípicas patógenas de *B. thuringiensis*

*B. thuringiensis*, se considera un microorganismo inocuo para el ser humano, al tratarse de un entomopatógeno habitante del suelo. Sin embargo, en años recientes se han aislado cepas patógenas, capaces de producir enterotoxinas similares a las de *B. cereus* (Ankolekar *et al* 2009). También se han encontrado cepas capaces de producir necrosis en heridas traumáticas (Hernández *et al.* 1998), y causantes de infecciones pulmonares fatales en pacientes inmunosuprimidos (Ghelardi *et al.* 2007). Recientemente se han encontrado cepas cuyas proteínas Cry tienen actividad necrótica en tejidos de mamífero (Tamez. *et al.* 2007).

Por su potencial patogenicidad destacan las cepas *B. thuringiensis konkukian* 97-27 y *B. thuringiensis* serovar Monterrey, cepa BGSC 4AJ1. La primera se aisló en 1995 de las heridas de guerra de un soldado francés en Bosnia, Se identificó como *B. thuringiensis* por la presencia de cristales paraesporales y serotipificación flagelar. La patogenicidad de la cepa fue comprobada en ratones inmunosuprimidos, al tener una letalidad del 100% (Hernández *et al.* 1998). El perfil enzimático determinado por secuenciación del genoma reveló que portaba genes para enterotoxinas no hemolíticas, hemolisinas formadoras de canales iónicos, fosfolipasas, así como varias proteasas extracelulares. Se aisló un plásmido, nombrado pBT9727, el cual presentaba 89% de homología con el plásmido pXO2 de *B. anthracis*, aunque no se comprobó la síntesis de cápsula de PGA *in vivo* o *in vitro* (Rasko *et al.* 2005).

Por otra parte, *B. thuringiensis* BGSC 4AJ1 es un aislamiento ambiental. Destaca por presentar una cápsula de PGA, similar a la de *B. anthracis*. Esta cápsula estaba codificada por un plásmido que porta genes homólogos a los contenidos en el plásmido pXO2 de *B. anthracis*. Anticuerpos fluorescentes específicos para la cápsula de *B. anthracis* reaccionaron positivamente con la cápsula de BGSC 4AJ1. La identificación de esta cepa como *B. thuringiensis* se determinó al observar la presencia de cristales paraesporales bipiramidales, a través de microscopía electrónica de barrido (Cachat *et al.* 2008).

### **1.3.2 Cepas atípicas de *B. thuringiensis* aisladas en Trinidad y Tobago**

Debido a que las toxinas de *B. thuringiensis* presentan especificidad restringida hacia un grupo de insectos huésped, continuamente se buscan nuevas cepas de origen ambiental, que produzcan diversas y más potentes toxinas Cry. En 2005, investigadores de la University of West Indies, en Trinidad y Tobago, realizaron nuevos aislamientos empleando microscopía de contraste de fases y tinción de los cristales paraesporales con azul de Coomassie. Resaltan las cepas Bt-26, Bt-40 y Bt-90, las cuales presentan pequeños cuerpos paraesporales (Rampersad & Ammons 2005). También son importantes las cepas Bt1-88 y Bt 2-56, las cuales presentaron complejos cristal-espora con largos filamentos de naturaleza proteica, que probablemente favorecen la adherencia del complejo espora-cristal al epitelio de sus hospederos. Destaca la caracterización de la cepa Bt1-88 en el Laboratorio de Enzimas Microbianas del Departamento de Bioquímica de la ENCB (Ventura *et al.* 2011).

### **1.4 Antecedentes de la cepa Bt-EM14, objetivo de la presente investigación**

La cepa Bt-EM14 fue aislada en el Laboratorio de Enzimas Microbianas, en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, a partir de muestras de agua provenientes del Pitch Lake, cerca de la localidad de La Brea, al suroeste de la isla de Trinidad, República de Trinidad y Tobago. La naturaleza del sitio de aislamiento es singular, pues se trata del lago de asfalto de origen natural más grande del mundo, el cual ocupa una superficie de 40 hectáreas y presenta una profundidad máxima de 75 metros. Bt-EM14 fue aislado en agua que fluía sobre la superficie de brea. Su morfología es bacilar, es esporulado, capaz de sintetizar un cuerpo paraesporal irregular, además presenta una cápsula visible a través de la tinción negativa con tinta china, que recuerda a la cápsula de *B. anthracis*. Por esta característica, desde el principio se relacionó con *B. thuringiensis* BGSC 4AJ1, otra cepa capsulada ya reportada (Cachat *et al.* 2008).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La cepa Bt-EM14 tiene una relevante importancia por haberse encontrado en aguas del Pitch Lake o Lago de Brea, en la Isla de Trinidad, en el Caribe, el cual es un ambiente propicio para el aislamiento de nuevos microorganismos extremófilos. La principal característica de Bt-EM14 es la síntesis de cristales proteicos como *B. thuringiensis*, pero al mismo tiempo expresa una cápsula semejante a la *B. anthracis*.

Considerando que en años recientes numerosas cepas atípicas del grupo de *B. cereus* han sido aisladas de animales y de seres humanos, resulta importante caracterizar a Bt-EM14 para conocer sus posibles implicaciones biotecnológicas, médicas y evolutivas, concernientes al grupo de *B. cereus*.

### **3. OBJETIVO PRINCIPAL**

Caracterizar bioquímica y morfológicamente la cepa Bt-EM14 de *B. thuringiensis*.

### 3.1 Objetivos particulares

3.1 Observar mediante microscopía óptica la presencia de flagelos, cápsula, cristal y espora de Bt-EM14, y de cepas de referencia del grupo *B. cereus*.

3.2 Comparar el perfil enzimático extracelular (13 hidrolasas diferentes) de Bt-EM14, y de otras cepas referenciales del grupo *B. cereus*.

3.3 Comparar el crecimiento y comportamiento de Bt-EM14 y de cepas de referencia del grupo *B. cereus*, en medios selectivos, en condiciones ambientales y nutricionales que permitan clasificar a Bt-EM14 como un miembro del grupo *B. cereus*.

3.4 Caracterizar la cápsula de Bt-EM14: su tipo de unión (covalente o laxa) al soma bacteriano.

3.5 Determinar su composición a través de cromatografía en capa fina y espectrofotometría IR.

3.6 Estudiar la morfología de Bt-EM14 por microscopía electrónica de transmisión (ciclo de esporulación y formación de cristales paraesporales).

3.7 Realizar un ensayo en ratones para determinar la patogenicidad de Bt-EM14.

3.8 Probar la capacidad de Bt-EM14 para inhibir el crecimiento de hongos filamentosos seleccionados.

3.9 Purificar los cristales de Bt-EM14, y determinar mediante electroforesis el patrón de proteínas que los conforman.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Cepas y condiciones de cultivo

Los microorganismos se cultivaron para su conservación en tubos con medio BHI. Para la obtención de biomasa se empleó agar nutritivo, agar papa dextrosa (para el cultivo de hongos filamentosos), agar soya tripticaseína (agar TSI) y agar de infusión de cerebro corazón (BHI). Estos últimos fueron especialmente empleados para el cultivo de *B. anthracis*. Para su conservación a largo plazo, Bt-EM14 fue conservada en tiras de papel impregnadas de esporas que posteriormente fueron liofilizadas. Las cepas empleadas, finalidad de su empleo y características relevantes se detallan en la Tabla 1.

**Tabla 1. Microorganismos empleados en el presente trabajo**

Microorganismo	Características	Empleo	Procedencia de la cepa
<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i> HD-1	Produce cristales bipiramidales con una alta actividad insecticida.	Cepa internacional de referencia para la caracterización de nuevos aislamientos de <i>B. thuringiensis</i> .	Laboratorio de Enzimas Microbianas ENCB
<i>B. thuringiensis</i> LIBT-418	Produce cristales bipiramidales. Productor de amilasas	Cepas empleadas en las pruebas de actividad enzimática con fines comparativos y de referencia.	CINVESTAV Irapuato
<i>B. thuringiensis</i> 132	Produce cristales cúbicos		Laboratorio de Enzimas Microbianas ENCB
<i>B. thuringiensis</i> 33	Cristales triangulares y bipiramidales	Las proteínas de sus cristales se emplearon como marcadores de peso molecular en geles de SDS-PAGE	Laboratorio de Enzimas Microbianas ENCB
<i>B. anthracis</i> Sterne	Cepa vacunal atenuada para su empleo en la inmunización de ganado	Empleado con fines comparativos y de referencia en pruebas de actividad enzimática, resistencia a beta-lactámicos, producción de hemolisinas, y para bioensayo en ratones.	Laboratorio de Microbiología Veterinaria ENCB

Tabla 1 (Continuación)

<i>B. cereus</i> ATCC 11778	Productor de una gran variedad de enzimas hidrolíticas. Esta cepa en particular se emplea en pruebas para determinar la potencia de antibióticos.	Microorganismo empleado con fines comparativos y de referencia en pruebas de actividad enzimática, resistencia a beta-lactámicos y producción de hemolisinas.	Laboratorio de Bacteriología Médica ENCB
<i>B. subtilis</i> DAF-1	Aislamiento ambiental, productor de antimicóticos y de polímero de PGA	Fines comparativos y de referencia en las pruebas de actividad enzimática y como organismo productor de PGA.	Laboratorio de Enzimas Microbianas ENCB
<i>Serratia marscencens</i> WF (cepa apigmentada).	Bacilos Gram negativos de la familia de las Enterobacterias. Son patógenos de importancia médica.	Empleado como control positivo en la producción de diversas enzimas hidrolíticas.	Laboratorio de Enzimas Microbianas ENCB
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Empleado en las pruebas de asimilación de fuentes de carbono. Control en la tinción de cápsula (tinta china y policrómica).	Laboratorio de Bacteriología Médica ENCB
<i>Erwinia carotovora</i>	Bacilo Gram-negativo. Produce la podredumbre blanda de la papa.	Control positivo en la producción de pectinasas extracelulares.	Laboratorio de Fitopatología ENCB
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 2593	Coco Gram positivo agrupado en racimos. Microorganismo de importancia médica.	Control positivo en la producción de nucleasas extracelulares.	Laboratorio de Bacteriología Médica ENCB
<i>Aspergillus niger</i>	Hongos filamentosos imperfectos. Causan pudrición de granos y frutos. Patógenos oportunistas.	Se emplearon para probar la capacidad de Bt-EM14 para inhibir el crecimiento de hongos filamentosos.	Laboratorio de Enzimas Microbianas ENCB
<i>Aspergillus flavus</i>			
<i>Fusarium sp.</i>	Hongo que produce pudrición de granos, frutos, tallos y raíces.		
<i>Helminthosporium sp.</i>	Hongo que produce tizones y manchones foliares en diversas plantas.		
<i>Curvularia sp.</i>	Hongo que produce manchones foliares y favorece la descomposición de granos.		

## **4.2 Caracterización morfológica**

A continuación se describen las metodologías empleadas para la observación de estructuras microbianas mediante microscopía óptica.

### **4.2.1 Tinción de Gram**

Se realizó empleando el equipo y los colorantes empleados para la tinción diferencial, siguiendo el protocolo típico (Harley & Prescott, 2002).

### **4.2.2 Tinción de esporas**

La verificación de la formación de esporas en Bt-EM14 se realizó mediante la tinción diferencial de Schaeffer-Fulton, en la cual se emplearon cultivos en fase estacionaria (más de 24 h de incubación). La técnica consistió en preparar un frotis y adicionar suficiente colorante verde de malaquita para cubrir el portaobjetos, luego se colocó éste cerca de la flama del mechero y se calentó sin hervir durante 10 min, evitando que se secase; se enjuagó con agua destilada y luego se tiñó con safranina durante 1 min. Finalmente se enjuagó y se dejó secar (*ibidem*).

### **4.2.3 Tinción negativa de cápsula**

Para confirmar la presencia de cápsula, se realizó la tinción negativa en fresco con tinta china. Para ello se mezcló una asada del cultivo microbiano con una pequeña cantidad de tinta china. La suspensión se colocó en un cubreobjetos y se observó con el objetivo de inmersión 100X (Woeste & Demchick, 1991).

### **4.2.4 Tinción de McFaydean para cápsula**

La tinción de McFaydean o tinción de azul de metileno policrómico. es una tinción que permite la identificación presuntiva de *B. anthracis* capsulado, en muestras biológicas y ambientales. El colorante presenta afinidad por el PGA, el cual constituye casi el 90% del peso

seco de la cápsula. La tinción se realizó en un solo paso, fijando la muestra previamente con metanol sobre un portaobjetos, y luego se tiñó con azul de metileno policrómico el cual colorea el soma celular de azul, mientras que el material capsular adopta una coloración roja o rosa (Turnbull 2008). En el apéndice de colorantes se describen los pasos para la preparación del colorante.

#### **4.2.5 Tinción de cristales paraesporales**

Se fijaron frotis al calor y se tiñeron con una solución de azul de Coomassie al 0.133% en ácido acético al 50% (Rampersad & Ammons 2002). Después se lavó y se secó la muestra con agua corriente. La preparación se observó con el objetivo de inmersión 100X. En la preparación se observaron los cristales proteicos intracelulares, también llamados cuerpos paraesporales teñidos de color azul oscuro.

#### **4.2.6 Tinción diferencial de cristales paraesporales con amido negro y fucsina básica**

Con colorante amido negro se tiñó una preparación fija de un cultivo autolisado de Bt-EM14. A través de esta tinción es posible distinguir en una misma preparación entre los cuerpos paraesporales (tinción azul oscuro), los cuerpos bacterianos, (tinción rojiza) y las esporas (altamente refringentes con borde azul rojizo).

#### **4.2.7 Tinción flagelar**

La tinción flagelar permitió observar la presencia y disposición de los flagelos de Bt-EM14. Para ello se empleó la tinción de Ryu en fresco, para la observación rápida de los flagelos. (Heimbrook *et al.* 1989). Primero el microorganismo se cultivó en agar soya tripticaseína por 24 h a 28 °C. Luego se inundó la caja Petri con solución salina por 5 min, para que las células bacterianas pasaran al medio acuoso. Enseguida se tomó una asada y se colocó entre porta y cubre. Posteriormente, se añadió por uno de los lados del cubreobjetos una gota del colorante y se dejó que penetrara por difusión. Después de 15 min la preparación se observó en el microscopio. La preparación del colorante de Ryu se detalla en el apéndice de colorantes.

### 4.3 Pruebas bioquímicas

Los ensayos bioquímicos desarrollados fueron los sugeridos para la identificación del género *Bacillus*, contenidos en el Manual of Clinical Microbiology de la American Society for Microbiology (Logan *et al.* 2007), los cuales consistieron en las siguientes pruebas: arginina descarboxilasa, producción de indol, catalasa, movilidad en medio SIM, reducción de nitratos, licuefacción de gelatina y tolerancia a la salinidad. Los microorganismos utilizados en esta serie fueron Bt-EM14, *B. cereus* ATCC 11778, *B. anthracis* Sterne y *B. thuringiensis* HD-1.

#### 4.3.1 Prueba de movilidad y producción de indol

La prueba de movilidad se realizó inoculando por picadura un tubo con medio SIM (Sulfuro, Indol, Movilidad). La prueba se consideró positiva si el microorganismo crecía más allá del área de la picadura. La producción de sulfuro, como producto de la degradación de aminoácidos azufrados, se observó como un precipitado negro de FeS. Para la lectura de la producción de indol, se empleó el reactivo de Kovacs (p-dimetilaminobenzaldehído, disuelto en alcohol isoamílico acidificado). La prueba se consideró positiva si se observaba la formación de un complejo rojo, producto de la reacción del p-dimetilaminobenzaldehído con el indol, un producto de la degradación enzimática del triptófano (McFaddin 1984).

#### 4.3.2 Prueba de catalasa

Las cepas a estudiar se sembraron por estría cruzada y se incubaron por 24 h en agar nutritivo. Al final del periodo de incubación se añadieron unas gotas de agua oxigenada y se observó la formación de burbujas de O<sub>2</sub> como producto de la actividad enzimática (*ibidem*).

#### 4.3.3 Reducción de nitratos

Cada uno de los microorganismos fue sembrado en caldo nitratos y se incubó por 48 h. La reducción de nitratos a nitritos se observó a través de la adición del reactivo de Griess. La reducción positiva genera un complejo azóico de color rojo (Fiddler 1977).

#### 4.3.4 Licuefacción de gelatina

Los microorganismos probados fueron inoculados por picadura en tubos que contenían gelatina bacteriológica, y se incubaron por 24 h. Posteriormente se refrigeraron por 10 min. La prueba se considera positiva en los tubos donde después de la refrigeración, la gelatina se mantiene líquida (McFaddin 1984).

#### 4.3.5 Arginina descarboxilasa

Los microorganismos se inocularon por picadura en el medio inclinado arginina descarboxilasa, en donde el indicador púrpura de bromocresol permitió observar la alcalinización del medio, derivada de la conversión enzimática de la arginina en putrescina (Manual Bioxon 1992).

#### 4.3.6 Crecimiento en medios con alta salinidad

La capacidad de *Bacillus* para crecer en medios con altas concentraciones de sal, ha sido una característica que permite diferenciar en forma preliminar las especies *B. subtilis*, *B. anthracis* y *B. cereus* de *B. thuringiensis*, ya que esta última no crece en medios con NaCl a concentraciones superiores al 7%, mientras que *B. subtilis*, algunas cepas de *B. cereus* y *B. anthracis* pueden tolerar concentraciones hasta de 8%, debido a que expresan polímeros extracelulares que incrementan su resistencia a ambientes salinos o con altas concentraciones de metales pesados (McLean *et al.* 1990; Candela & Fouet 2006). La tolerancia a la salinidad se probó cultivando los microorganismos en matraces de 125 mL con 25 mL de medio líquido (8 g/L de peptona de carne; 1% de extracto de levadura y 4g/L de peptona de gelatina),

incubando a 28 °C por 72 h, a 180 rpm. Los medios contenían concentraciones desde 5 hasta 10% de NaCl.

#### **4.4 Perfil exoenzimático de Bt-EM14**

La finalidad de esta evaluación fue obtener información sobre la capacidad de Bt-EM14 para secretar las enzimas necesarias para la degradación de diferentes macromoléculas. Dicho perfil puede ser característico de cada cepa, y tiene importancia en la búsqueda de microorganismos productores de enzimas con aplicación biotecnológica. Los ensayos se realizaron en medio sólido compuesto por NaCl, 0.25 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.375 g/L; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.375 g/L; MgSO<sub>4</sub>, 0.275 g/L; extracto de levadura, 1 g/L; casaminoácidos, 1 g/L y agar bacteriológico 15 g/L. El pH final se ajustó a 6.5 (Mendoza-Gamboa 2007).

Para la detección de las diferentes exoenzimas se agregó el inductor apropiado. La inoculación de los microorganismos en las diferentes placas se realizó por picadura, empleando palillos de madera estériles. Las placas fueron luego incubadas a 28 °C, y observadas a diferentes periodos de tiempo.

Para las pruebas de queratinasa, colagenasa, quitinasa y celulasa, se emplearon matraces Erlenmeyer de 25 mL, conteniendo 5 mL de medio basal líquido, adicionado de sustratos-inductores previamente teñidos. Los matraces se incubaron a 28 °C a 180 rpm durante diferentes periodos de tiempo. Las actividades enzimáticas se expresaron en función de la solubilización de los sustratos teñidos con la consecuente y la liberación del colorante, que se leyó a 595 nm en un espectrofotómetro (Ventura-Suárez 2007).

##### **4.4.1 Actividad amilolítica**

Se emplearon placas con medio sólido-almidón al 1%, los cuales se inocularon y luego se incubaron durante 48 h a 28 °C. Posteriormente se adicionaron 2 mL de lugol (revelador de yodo-yoduro). La prueba se consideró positiva cuando se observaron halos transparentes de

hidrólisis del almidón alrededor de las colonias, sobre un fondo azul intenso debido a la unión del yodo con el almidón residual (Dhawale *et al.* 1982).

#### **4.4.2 Actividad de pectinasa**

Se emplearon placas de medio basal sólido adicionadas con pectina al 1%, las cuales se inocularon y después se incubaron durante 120 h a 28 °C. Posteriormente se adicionó 1 mL de de cetrimida (bromuro de cetiltrimetil-amonio) al 5%, para provocar la precipitación de la pectina residual, poniendo de manifiesto halos claros de hidrólisis alrededor de las colonias positivas (Hubbell *et al.* 1978).

#### **4.4.3 Actividad de quitinasa**

Se emplearon placas conteniendo quitina coloidal al 10% (peso húmedo/volumen), y se observaron las placas cada 24 h, hasta la aparición de halos claros de hidrólisis alrededor de las colonias (Rojas-Avelizapa *et al.* 1999).

#### **4.4.4 Actividad de quitosanasa**

Se emplearon placas con el medio basal sólido adicionado con quitosana coloidal al 2%, incubando a 28 °C, observando las placas cada 24 h hasta la aparición de halos claros de hidrólisis (Cruz-Camarillo *et al.* 2004).

#### **4.4.5 Actividad de celulasa**

Se emplearon matraces de 25 mL conteniendo 5 mL de medio basal, suplementados con 40 mg de papel Whatman teñido con azul brillante de Remazol (Poincelot & Day 1972). Se incubaron durante 96 h a 28 °C con agitación a 180 rpm.

Al término de la incubación se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 7,000 rpm durante 10 min, y se leyó su absorbancia a 595 nm. El espectrofotómetro se ajustó utilizando como blanco el sobrenadante de un matraz sin inocular.

#### **4.4.6 Actividad de estearasa**

Para este ensayo, se emplearon placas conteniendo Tween 80 al 1%, suplementadas de CaCl<sub>2</sub> 0.5%. Después de inocular se incubó durante 48 h a 28 °C. Esta prueba se basa en la liberación de oleato o estereato, el cual en presencia de iones calcio forma un precipitado (oleato o estearato de calcio), dando lugar a la formación de halos opacos y granulosos alrededor de la colonia (O'Brien & Davis 1982).

#### **4.4.7 Actividad de fosfolipasa**

Se emplearon placas suplementadas con yema de huevo al 3%, que una vez inoculadas se incubaron de 24 a 48 h a 28 °C. La prueba se consideró positiva cuando se observaron halos opacos, debido a la formación de digliceridos insolubles en agua (fosfolipasas C), o de halos transparentes debido a la acción de fosfolipasas tipo A (Crisope *et al.* 1976).

#### **4.4.8 Actividad de lipasas**

Se emplearon placas con el medio basal adicionado de mantequilla al 5% como sustrato, y de resazurina al 0.02% como indicador. La prueba se consideró positiva cuando se observaron halos de color rosa debidos a la liberación de ácidos grasos, lo que origina una disminución del pH, lo cual se pone de manifiesto con el vire del indicador (Nava-Fonseca 1995).

#### **4.4.9 Actividad de caseinasa**

Se emplearon placas de medio basal suplementadas con caseína al 2%. Las placas se inocularon y posteriormente se incubaron durante 24 h a 28 °C. La prueba se consideró positiva cuando se apreciaron halos opacos alrededor de las colonias, ocasionados por la precipitación del paracaseinato de calcio (hidrólisis parcial) o halos claros (hidrólisis completa de la proteína). Para una mejor apreciación de los halos, se adicionó 1 mL de HCl 1 N, para precipitar la caseína residual (Ventura-Suárez 2007).

#### **4.4.10 Actividad de elastasa**

Se emplearon placas con medio basal suplementado con elastina al 0.5%, que fueron inoculadas e incubadas durante 72 h a 28 °C. La prueba se consideró positiva cuando se apreciaron halos transparentes de hidrólisis, alrededor de las colonias positivas (Kaur *et al.* 1988).

#### **4.4.11 Actividad de queratinasa**

Se emplearon matraces de 25 mL, conteniendo 5 mL de medio basal líquido, suplementados con 40 mg de lana teñida con azul brillante de remazol G-250. Los matraces se incubaron durante 24-48 h a 28 °C y a 180 rpm. Terminado el tiempo de incubación se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 7,000 rpm durante 10 min y se leyó su absorbancia a 595 nm. El espectrofotómetro se ajustó utilizando como blanco el sobrenadante de un matraz sin inocular (Cedillo-Robles 2000).

#### **4.4.12 Actividad de collagenasa**

Se emplearon matraces de 25 mL, conteniendo 5 mL de medio basal (líquido), suplementado con 15 mg de Colagena ligada a azul brillante de Remazol (Hide Powder Azure) de Sigma.

Después se incubaron durante 24 a 48 h a 28 °C y 180 rpm. Luego se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 min y se leyó su absorbancia a 595 nm. El espectrofotómetro se ajustó utilizando como blanco el sobrenadante de un matraz sin inocular (Ventura-Suárez 2007).

#### **4.4.13 Actividad de DNAsa**

Se emplearon placas con medio sólido para la prueba de DNasa (Difco), suplementadas con azul de orto-toluidina al 0.0012% como indicador. Las placas se incubaron a 28 °C durante 48 h. La prueba se basa en la formación de un complejo azul entre el DNA y el azul de toluidina, que al ser hidrolizado por las DNAsas extracelulares, cambia a un nuevo complejo de color rosa cuando interactúa con los oligonucleótidos libres (Lachica *et al.* 1971). Otro método probado fue el de omitir el indicador, y precipitar el DNA no digerido con HCl 1 N, en donde se observan halos translúcidos de digestión alrededor de las colonias.

#### **4.5 Perfil de asimilación de fuentes de carbono**

Las especies del grupo *B. cereus* son capaces de asimilar diversas fuentes de carbono. Esta característica apoya a la identificación de diferentes cepas. Para este ensayo se emplearon 13 fuentes de carbono al 1% en caldo base rojo de fenol. Las fuentes de carbono fueron las siguientes: sacarosa, dulcitol, glicerol, manosa, celobiosa, fructosa, lactosa, galactosa, maltosa,  $\alpha$ -metil-D-glucósido,  $\alpha$ -metil-D-manósido, sorbitol y salicina. En esta prueba se empleó como testigo positivo *Klebsiella pneumoniae*. La asimilación se consideró positiva tomando en cuenta el crecimiento del inóculo y el vire del indicador rojo de fenol a un color amarillo por la producción de ácidos.

#### 4.6 Sistemas comerciales para la identificación de Bt-EM14

Para la identificación de Bt-EM14, se emplearon también los sistemas de pruebas bioquímicas API 50CHB ® de BioMérieux, y el sistema BBL-Crystal ® para Gram-positivos de Becton Dickinson, siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

#### 4.7 Actividad hemolítica

De las especies del grupo *B. cereus*, solamente *B. anthracis* no expresa hemolisinas (hemólisis  $\gamma$  de los eritrocitos de mamífero). Esta característica permite el diagnóstico presuntivo en muestras de origen ambiental e infeccioso (Turnbull 2008). Para esta prueba Bt-EM14, *B. cereus* ATCC 11778, *B. thuringiensis* HD-1, Bt-132, LIBT-418, *B. anthracis* Sterne y *B. subtilis* DAF-1 se inocularon por picadura en placas de agar suplementada con eritrocitos de carnero. Las placas se incubaron a 28 °C durante 24 h, para observar posteriormente las zonas de hemólisis alrededor de las colonias.

#### 4.8 Sensibilidad a los antibióticos $\beta$ -lactámicos

La sensibilidad de *B. anthracis* ante los  $\beta$ -lactámicos, es una de las pruebas que permite distinguirlo de los otros miembros del grupo *B. cereus*. Se estima que menos del 5% de las cepas de *B. anthracis* identificadas por biología molecular son resistentes (*in Vitro*) a la penicilina (Turnbull 2008). El ensayo se realizó en placas con medio Müller-Hinton, en donde el microorganismo se sembró masivamente con un hisopo estéril y se colocaron discos de papel filtro impregnados con 10 U de bencilpenicilina (Bayer Pharmaceuticals). Las placas fueron incubadas por 24 h a 28 °C. Se realizó el ensayo por triplicado con las cepas Bt-EM14, *B. cereus* ATCC 11778 (resistente a la penicilina), *B. anthracis* Sterne, *B. thuringiensis* LIBT-418 y *B. thuringiensis* 132.

#### 4.9 Bioensayo de patogenicidad en ratón

El protocolo de este bioensayo se basa en los trabajos de Hoffmaster y col. (2004), y Ebrahimi y col. (2009). Bt-EM14 y *B. thuringiensis* HD-1 (éste último empleado como control de inocuidad), se cultivaron en caldo nutritivo y se incubaron en agitación a 200 rpm por 72 h a 28 °C. Se observó la presencia mayoritaria de esporas y el medio de cultivo se centrifugó a 6500 rpm/10 min para la recuperación de las mismas, las cuales se lavaron dos veces con solución salina estéril. Las esporas se resuspendieron en agua destilada y se calentaron a 65 °C para la destrucción de las células vegetativas restantes. Las suspensiones se centrifugaron y resuspendieron finalmente en solución salina estéril 0.85% y se guardaron a 4 °C.

Para la obtención de esporas de *B. anthracis* Sterne, se cultivó el microorganismo por estría cruzada en agar soya triptocaseína por 24 h a 37 °C. Después se tomó una colonia, y se inoculó un matraz con 25 mL de medio TSI (caldo soya triptocaseína), adicionado ZnCl<sub>2</sub> 0.01 M y MgCl<sub>2</sub> 0.05 M. El medio se incubó por 72 h a 200 rpm a 37 °C. Se tomó una muestra del cultivo y se realizó un frotis teñido con cristal violeta para observar el cultivo esporulado. El medio de cultivo se centrifugó a 6500 rpm/10 min y se recuperó el paquete de esporas, el cual se lavó dos veces con solución salina. Luego se dio tratamiento térmico a 65 °C para eliminar las células vegetativas, y las esporas se resuspendieron en solución salina y se guardaron a 4 °C un día antes de la inoculación.

La concentración de esporas se determinó por cuenta viable empleando placas de agar soya tripticaseína para *B. anthracis* y de agar nutritivo para Bt-EM14 y *B. thuringiensis* HD-1. Incubando a 37 °C y 28 °C por 24 h, respectivamente. Ya establecido el número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de cada una de las suspensiones de esporas, se realizaron las diluciones necesarias con solución salina estéril, para ajustar cada dosis a  $4 \times 10^4$  UFC en un volumen final de 1 mL, el mismo día de la inoculación de los animales.

Para el ensayo se contó con 4 grupos de cinco ratones hembra de la cepa CD-1, de 8 semanas de vida, donados amablemente por el bioterio del Departamento de Bioquímica de la ENCB, los cuales se inocularon por vía intraperitoneal y se mantuvieron en observación por 140 h.

#### **4.10 Ensayo de Bt-EM14 contra hongos fitopatógenos**

Se probaron 5 hongos filamentosos de importancia agrícola: *Fusarium* sp., *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Helminthosporium* sp. y *Curvularia* sp. Cada uno de los hongos se sembró por picadura en el centro de placas de agar extracto de papa (PDA) con un pH ajustado a 6.5. Los cultivos se incubaron a 28 °C hasta la obtención de colonias de 4 cm de diámetro. Posteriormente se hicieron cuatro inoculaciones por picadura en forma simétrica de Bt-EM14 y de *B. subtilis* DAF-1, (éste último se empleó como control positivo en la prueba), alrededor de la colonia fúngica. Se continuó la incubación de las placas en las mismas condiciones durante 72 h. La acción antifúngica se observó como halos de inhibición del crecimiento del hongo alrededor de las colonias bacterianas (Mendoza-Gamboa 2007).

#### **4.11 Obtención y purificación de la cápsula de Bt-EM14**

La obtención y purificación del polímero capsular de Bt-EM14 y de *B. subtilis* DAF-1 (usando éste último como testigo positivo productor de PGA), se basó en el protocolo de Shih y Van (2001), empleado en la purificación de ácido poliglutámico (PGA). Para esto se inocularon matraces Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 25 mL de medio de cultivo, el cual contenía 1 % de extracto de levadura; 0.5 g/L de MgSO<sub>4</sub>; 5 g/L de glutamato monosódico; 50 g/L de digerido enzimático de caseína y 0.5 g/L de glucosa, con un pH final de 6.5. El cultivo se mantuvo a 28 °C por 48 h en agitación (200 rpm). Al término, el medio se acidificó con HCl 1N hasta obtener pH 2. Este paso permitió la disociación del polímero que envuelve las células y favoreció su solubilización. A continuación, el medio se centrifugó a 6500 rpm a 4 °C por 15 min, se descartó el paquete celular y se recuperó el sobrenadante. Luego se filtró empleando una membrana Millipore® con poros de 0.22 µm de diámetro, y posteriormente se

adicionaron 2 volúmenes de etanol frío a -20 °C; se agitó suavemente por algunos minutos y se guardó en congelación a -20 °C por toda la noche para favorecer la precipitación del polímero. Posteriormente para recuperarlo se alcalinizó el medio con NaOH 1N hasta un pH de 6.0, y luego se centrifugó a 6500 rpm /15 min a 4 °C. El precipitado obtenido se lavó con etanol frío, el cual se eliminó por evaporación a baja presión en una liofilizadora marca LABCONCO modelo 4451-F. El material obtenido se guardó en congelación a -20 °C hasta su uso.

#### **4.12 Cromatografía en capa fina del hidrolizado capsular**

El material capsular fue solubilizado en 5 mL de agua destilada. Posteriormente se hidrolizó con HCl 2N dentro de una autoclave a 121 °C por 2 h. El hidrolizado se neutralizó con NaOH 2N. Los componentes del hidrolizado capsular fueron analizados por cromatografía en capa fina, colocando 25 µL de diluciones decimales seriadas de la muestra. Como fase móvil se empleó una mezcla de etanol:metanol:agua:urea (en proporciones de 45:45:10:0.5 v/v/v/g). La cromatografía se desarrolló hasta que el frente de la fase móvil recorrió cuatro quintas partes del cromatograma, el cual se dejó secar a temperatura ambiente para su posterior revelado por aspersion, usando una solución de ninhidrina al 0.05% en etanol, con 5% de collidina. El cromatograma se colocó en el horno para cromatografía a 80 °C, hasta que se observaron las manchas de las muestras separadas (Kambourova *et al.* 2001).

#### **4.13 Ensayo para determinar la unión covalente o laxa de la cápsula a la pared celular.**

Para determinar si la cápsula del microorganismo se encuentra unida a la pared celular de forma covalente o laxa, se sembró a Bt-EM14 en tubos con agar nutritivo inclinado, y se incubó por 48 h a 28 C. Posteriormente, se agregó 1 mL de solución salina a cada tubo y se incubaron a 65 °C por 30 min. Posteriormente se tomó una muestra y se observó mediante tinción negativa con tinta china. El ensayo se realizó por duplicado. Si la cápsula está unida covalentemente a la pared celular, el tratamiento térmico no dispersa el polímero (Candela *et al.* 2005).

#### 4.14 Electroforesis de la cápsula de Bt-EM14

Para determinar el peso molecular y la naturaleza del polímero capsular de Bt-EM14, éste se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Primero se preparó un gel separador de poliacrilamida al 8%, y un gel empacador al 4%. Enseguida se cargaron en cada pozo 15  $\mu$ L de muestra en regulador de carga 2X (Tris-HCl 25 mM pH 6.8;  $\beta$ -mercaptoetanol 1.28 M; azul de bromofenol 2.9 mM; SDS 10%; glicerol 10%), con una concentración final de 6 mg/  $\mu$ L de PGA. Se empleó un regulador de corrimiento a base de Tris-glicina y SDS (Tris-Base 0.25 M, glicina 0.2 M, SDS 0.1%, pH 8.3). La electroforesis se realizó a 45 V para empaquetamiento de la muestra y 95 V para la separación de proteínas. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó por toda la noche con una solución al 7% de ácido acético y 0.5% de azul de metileno. Después, el gel se destiñó realizando varios lavados con agua destilada. El gel una vez desteñido, se secó para su preservación colocándose entre dos pliegues de papel celofán a una temperatura de 37 °C. La metodología se basa en el trabajo de Kambourova y colaboradores (2001).

#### 4.15 Espectrometría IR de la cápsula de Bt-EM14

Los materiales capsulares de *B. subtilis* DAF-1 y Bt-EM14 obtenidos como se indicó en el punto 5.11, fueron analizados mediante espectrometría infrarroja para confirmar su identidad química. Para ello se pesaron 20 mg de cada una de las muestras, las cuales se incluyeron en pastillas de KBr. Ambas muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro IR modelo Spectrum 2000 marca Perkin Elmer, situado en la Central de Espectrofotometría situada en el edificio de Bioquímica de la ENCB. Los perfiles de absorción fueron analizados mediante el software Spectrum 3.0.

#### 4.16 Separación de los cristales paraesporales de Bt-EM14

Para obtener los cristales de Bt-EM14 y *B. thuringiensis* 33 (los cristales de Bt-33 se emplearon como control de peso molecular conocido), ambas cepas se inocularon masivamente en cajas de Petri con medio sólido para esporulación, el cual fue diseñado expresamente para la rápida esporulación del microorganismo con la menor producción de cápsula, tomando en cuenta los trabajos de Keshavarzi y colaboradores (2005), el cual se componía de 3.5 g/L de casaminoácidos; agar bacteriológico 15 g/L; NaCl 2.5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.375 g/L;  $\text{FeCl}_3$  0.0625 M;  $\text{ZnCl}_2$  0.0074 M y  $\text{MgCl}_2$  0.001M). Las cajas se incubaron por 5 días a 28 °C hasta la autólisis de las células bacterianas. Las esporas fueron colectadas después con una solución de NaCl 1 M. La mezcla de esporas y cristales se centrifugó a 6,500 rpm durante 10 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El sedimento se lavó dos veces más con el mismo regulador. El sedimento de Bt-EM14 se lavó posteriormente dos veces con etanol al 70% a -20 °C, para eliminar los restos de la cápsula microbiana. Luego se calentó por 20 min en baño de agua en ebullición. Finalmente la mezcla de cristales y esporas de ambos microorganismos se lavó con agua destilada. Los cristales de ambos se guardaron en congelación a -20 °C.

##### 4.16.1 Purificación de los cristales mediante sistema bifásico.

Se emplearon dos estrategias para la purificación de los cristales, la primera fue el empleo de un sistema bifásico, y la segunda fue mediante ultracentrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa.

Primero los cristales de Bt-EM14 y Bt-33 se purificaron en un sistema bifásico de polietilenglicol 3350 (PG, Sigma) y fosfatos. El sistema se preparó con 5.6 g de PG 3350 y 17.1 mL de la solución de fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1M cada uno); éstos se agregaron a un tubo Falcon de 30 mL y luego se agitó vigorosamente para solubilizar el PG. Cuando se formaron las dos fases, se mezclaron 5 mL de suspensión de spora y cristal y se centrifugó a 1000 rpm durante 3 min. Los cristales de la interfase del sistema fueron cosechados con una pipeta Pasteur. Para verificar la pureza de los cristales, se tomó una muestra y se tiñó con azul

de Coomasie al 0.133% para realizar observaciones con el microscopio óptico. El proceso se repitió una vez más para eliminar en lo posible las esporas contaminantes. Por último, los cristales fueron lavados con agua destilada estéril y separados por centrifugación a 10,000 rpm por 10 min. Los cristales obtenidos fueron resuspendidos en 5 mL de agua destilada estéril y luego fueron liofilizados y congelados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El método se basa en los trabajos de Goodman y col. (1967), y Güereca y col. (1994).

#### **4.16.2 Recuperación de los cristales de Bt-EM14 mediante ultracentrifugación**

El protocolo para recuperar los cristales está basado en la metodología de López-Meza & Ibarra (1996). Primero se preparó un gradiente de sacarosa en tubos de ultracentrífuga. Las concentraciones empleadas de abajo hacia arriba fueron 79, 76, 72, 69 y 63 %. Después los cristales paraesporales liofilizados, obtenidos en el punto 5.16 se resuspendieron en alícuotas de 1.5 mL de agua destilada estéril y se colocaron en la parte superior del gradiente. Los tubos se centrifugaron a 20,000 rpm durante 1 h en una ultracentrífuga Beckman L-80, empleando un rotor de columpio modelo Sw 40 Ti. Después de la centrifugación, cada una de las bandas formadas fue recolectada con una pipeta Pasteur para observar en que banda se encontraban los cristales. Los cristales se lavaron y se centrifugaron 3 veces con agua destilada. Después se guardaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **4.17 Determinación del peso molecular de las proteínas del cristal**

Esta determinación, se hizo por corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), tomando como referencia la técnica de Laemmli (1970), modificada por Carmona (2002). Primero se solubilizaron los cristales de Bt-EM14 y de Bt-33 en regulador alcalino de Trizma base 64 mM, SDS 1%, pH 10. Posteriormente los cristales solubilizados se mezclaron con amortiguador de carga (Tris-HCl 25 mM pH 6.8;  $\beta$ -mercaptoetanol 0.05%; azul de bromofenol 2.9 mM; SDS 10%; glicerol 10%) en proporción 1:1. Después las muestras fueron hervidas por 10 min para su desnaturización y se centrifugaron 5 min a 10,000 rpm. Luego se preparó un gel concentrador al 4% y un

separador de 8%. Se colocaron 15  $\mu\text{L}$  de muestra en los pozos del gel. En uno de los pozos se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de una mezcla de marcadores de peso molecular conocido. Se empleó como control positivo una muestra de los cristales purificados de Bt-33 previamente solubilizados y mezclados con regulador de carga.

La electroforesis se realizó a 45 V para el empaquetamiento de la muestra y a 95 V para la separación de proteínas, empleado un amortiguador de corrimiento a base de Tris-glicina y SDS (Tris-Base 0.05 M, glicina 0.38 M, SDS 0.1%, pH 8.3). Finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron durante toda noche con azul brillante de Coomasie al 0.1%, disuelto en una solución de etanol al 45% y ácido acético al 9%. Posteriormente el gel se destiñó con una solución de etanol al 5% y ácido acético al 7.5%. Los geles una vez desteñidos, se secaron para su preservación colocándolos entre dos pliegues de papel celofán dentro de un horno de secado a 37 °C.

#### **4.18 Microscopía electrónica de barrido de los cristales de Bt-EM14**

Se tomó una muestra de aproximadamente 1 mg de los cristales de Bt-EM14 purificados en el punto 5.16.2, y se fijaron durante 1 h con glutaraldehído al 3% en regulador de fosfatos de Sörensen pH 7.0. Posteriormente se lavaron dos veces con solución lavadora (regulador de fosfatos 0.1 M pH 7.0, 10% de sacarosa y 0.004 % de  $\text{CaCl}_2$ ). Luego se procedió a deshidratar la muestra en etanol empleando concentraciones crecientes de 10%, desde 40 a 100%, dejando 20 min en cada cambio. Después del último cambio de etanol, la muestra se puso en un papel filtro para introducirla en la cámara del secador de punto crítico marca EMS. Luego que la muestra se hubo secado, se montó en un porta-muestras cilíndrico de aluminio. La muestra se sometió a un baño de oro por *sputter coating* en una ionizadora de metales modelo Desk II, por 300 segundos. Posteriormente se procedió a observar en el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5800 LV, ubicado en la Central de Microscopía de la ENCB.

#### **4.19 Estudio de la ultraestructura y del ciclo de esporulación de Bt-EM14 mediante microscopía electrónica de transmisión**

Bt-EM14 fue cultivado durante 72 h en un medio líquido agitado a 180 rpm a 28 °C. Dicho medio estaba compuesto por 3.5 g/L de casaminoácidos (DIFCO-BD); NaCl 2.5 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.375 g/L; FeCl<sub>3</sub> 62.5 mM; ZnCl<sub>2</sub> 7.4 mM y MgCl<sub>2</sub> 1 mM. Se tomaron muestras cada 3 h, separando el paquete celular por centrifugación a 6500 rpm/ 3 min. El pellet resultante fue fijado por 2 h con glutaraldehído al 3% en regulador de fosfatos de Sörensen (pH 7.0). Después de la fijación, las muestras se lavaron 3 veces con una solución lavadora compuesta por regulador de fosfatos 0.1 M pH 7.0, 10% de sacarosa y 0.004 % de CaCl<sub>2</sub>. Posteriormente la muestra se postfijo por 2 h con OsO<sub>4</sub> al 1%. La muestra se lavó en tres ocasiones con solución lavadora y se deshidrató empleando concentraciones crecientes de etanol de 40 al 100%, en intervalos de 10%, dejando la muestra 20 min en cada solución de etanol y realizando al final tres cambios de etanol al 100%. Después se hicieron cambios con mezclas de etanol-óxido de propileno en proporciones 2:1, 1:1, 1:2, y óxido de propileno puro cada uno por 30 min. Posteriormente la muestra se preincluyó por 24 h en cada una de las mezclas de óxido de propileno-resina EMBED-812®, en proporciones 3:1, 1:1 y 1:3. Después las muestras se incluyeron en resina pura y se polimerizaron a 60 °C durante al menos 24 h. Una vez polimerizadas las muestras, se realizaron cortes semifinos de 300 nm con cuchillas de vidrio, los cuales fueron posteriormente teñidos con azul de toluidina para la observar la integridad de la muestra. Luego se obtuvieron cortes ultrafinos de 70 nm con cuchilla de diamante, los cuales se colocaron en rejillas de cobre y fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo de Reynolds por 10 y 5 min cada uno. Finalmente las muestras se observaron en el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1010, situado en la Central de Microscopía de la ENCB, empleando una aceleración de 60 kV para tomar las electromicrografías.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Aspectos morfológicos

Bt-EM14 fue sembrado en agar nutritivo por el método de estría cruzada e incubado por 24 h a 28 °C. La morfología colonial antes de las 36 h de incubación se asemeja a la de *B. cereus* o *B. thuringiensis*, al presentar colonias de 1 a 3 mm de diámetro, con aspecto de “vidrio molido”, bordes irregulares que recuerdan la textura de plumas, consistencia cremosa y aspecto seco. Después de 24 h se presenta un cambio radical, al observarse mucosidad sobre la colonia (Figura 5A). Muestras de las colonias mucoides fueron observadas al microscopio a través de la tinción negativa de tinta china, observándose una zona clara definida alrededor de las células, evidencia de la presencia de un polímero capsular (Figura 5B). Lo distintivo del material capsular de este microorganismo es que a diferencia de las cepas de *B. anthracis*, no fue necesaria la inducción de cápsula al cultivar el microorganismo en medio alcalino adicionado con bicarbonato pH 8, suero sanguíneo y atmósfera capnéica (rica en CO<sub>2</sub>). Bt-EM14 produce de forma constitutiva el polímero en condiciones atmosféricas normales, a una temperatura de 28 °C. Sin embargo, Bt-EM14 también puede crecer en medio alcalino (pH 8.0, con bicarbonato y enriquecido con extracto de cerebro y corazón o con suero sanguíneo), en donde también produce una considerable cantidad de material capsular al cultivarlo tanto a 28 como a 37 °C.

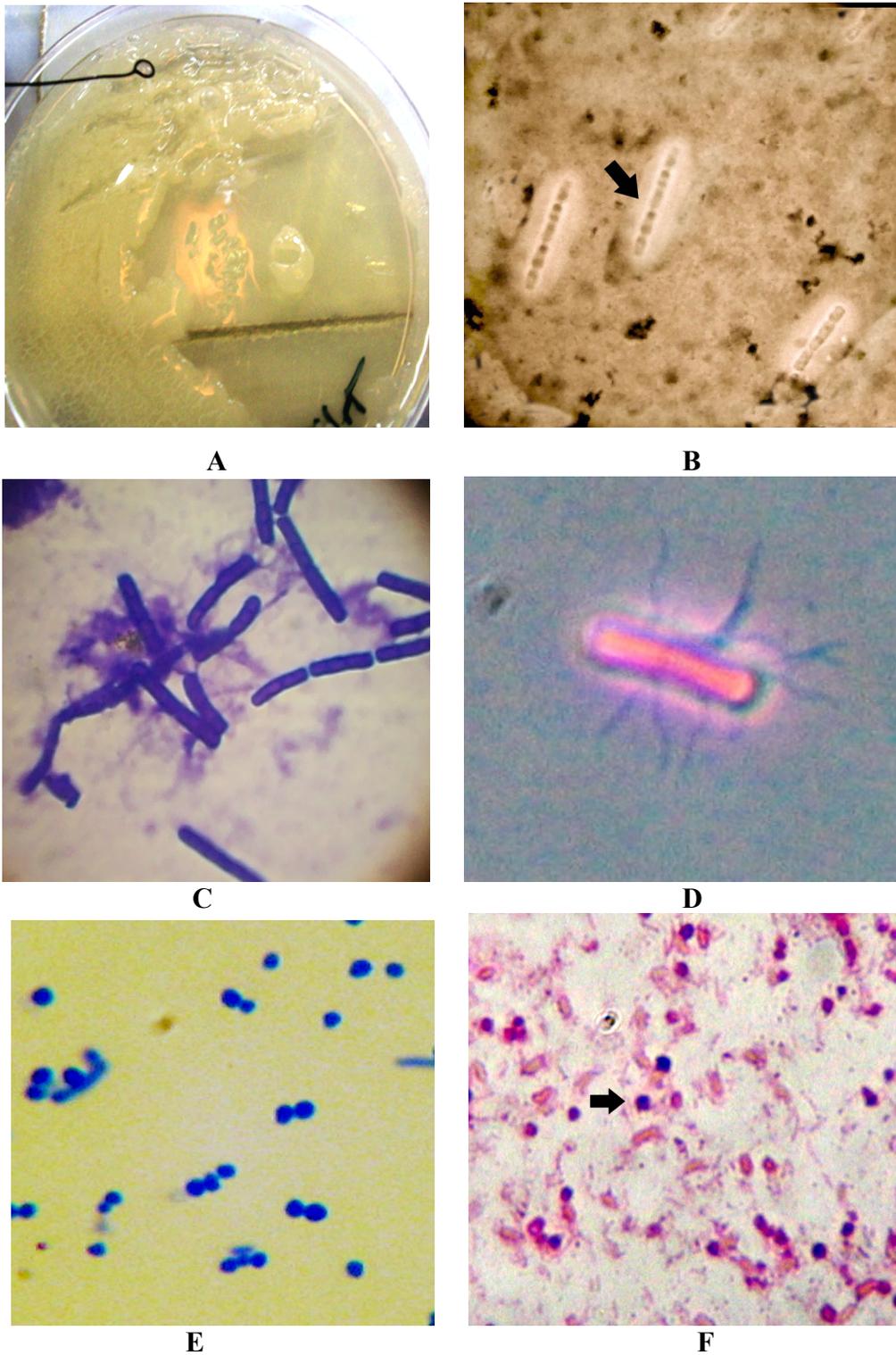
La morfología microscópica de Bt-EM14 corresponde a bacilos largos Gram positivos, de 2 a 3 µm de largo por 0.5 µm de ancho, con extremos romos. Los microorganismos se agrupan formando largas cadenas o en formación de empalizada (Figura 5C). La observación en fresco de los flagelos empleando el colorante de Ryu mostró la presencia de numerosos flagelos peritricos, característicos de *B. thuringiensis* y *B. cereus* (Figura 5D). Siguiendo el desarrollo de este microorganismo a lo largo de 5 días, se pudo observar que la esporulación comienza en torno a las 36 h, si se emplean medios complejos como TSI o BHI. Las esporas son elipsoidales, refringentes, sin afinidad a los colorantes (Figura 5E). Al tiempo que se desarrolla la esporulación, también se presenta la síntesis de cristales irregulares de diversos

tamaños, los cuales son liberados por autólisis de la célula vegetativa. La naturaleza de los cristales es proteica, como se puso de manifiesto al teñirlos con azul brillante de Coomassie (Figura 5E) y con amido negro. También se realizó la tinción diferencial que permite observar los cristales y las células vegetativas en la misma preparación (Figura 5F).

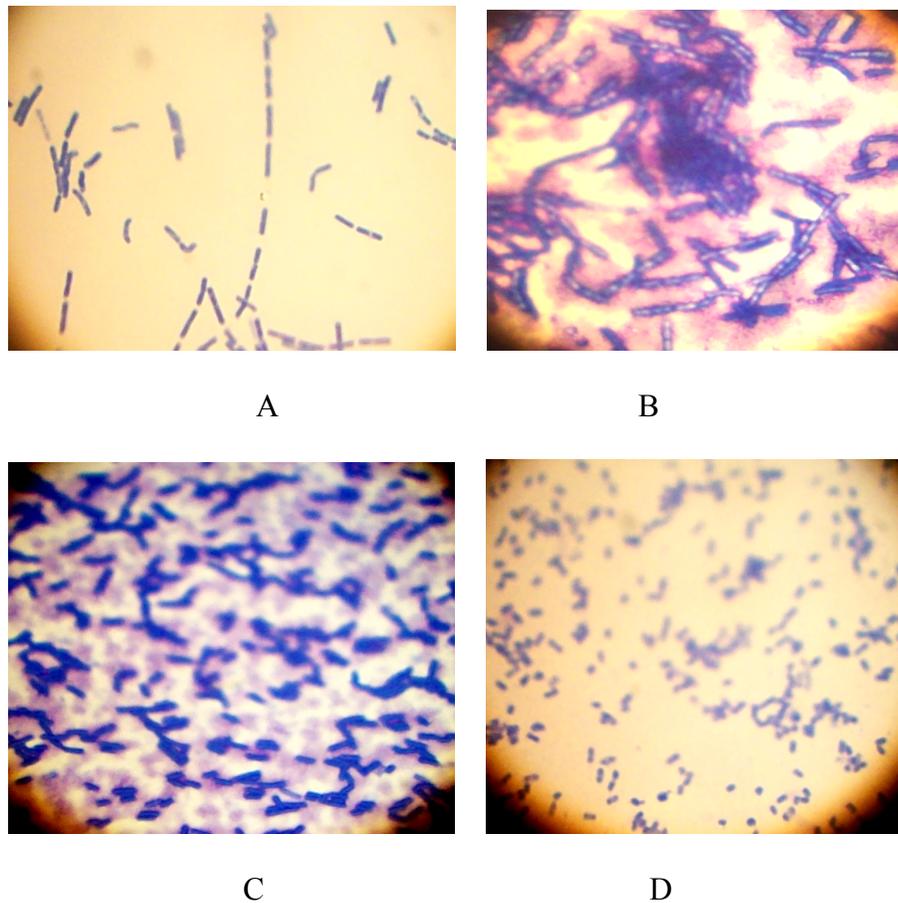
## 5.2 Tinción de McFaydean para cápsula de PGA

La tinción de McFaydean se desarrolló probando como cepa testigo productora de PGA a *B. subtilis* DAF-1. La elección de este microorganismo se debió a que la cepa de *B. anthracis* Sterne es una cepa vacunal que no posee el plásmido pXO2, que codifica los genes para la síntesis de la cápsula. *B. subtilis* es un microorganismo no patógeno que ha sido empleado junto con *B. licheniformis* para la producción industrial de PGA, ya que este polímero tiene un gran potencial en la industria farmoquímica, alimenticia y cosmética (Shih & Van 2001). La diferencia principal con respecto a *B. anthracis*, es que *B. subtilis* produce PGA con enantiómeros D y L de ácido glutámico intercalados, mientras que la cápsula de *B. anthracis* sólo esta conformada por el enantiómero D. Además *B. subtilis* no lo ancla a su pared celular, lo que permite formar una biopelícula que protege a las células de la desecación y salinidad, así como el secuestro de metales pesados (Candela & Fouet 2006).

La tinción de McFaydean se realizó a frotis fijados con metanol de Bt-EM14 y *B. cereus*. Al mismo tiempo se empleó a *K. pneumoniae*, cuya cápsula está compuesta principalmente de polisacáridos. La tinción reveló la presencia de material amorfo, de color rojizo, el cual se observó entorno a las células de Bt-EM14 y *B. subtilis* DAF-1. El material capsular de *K. pneumoniae* no presentó afinidad alguna por el colorante (Figura 6). La afinidad de la cápsula de PGA por el colorante, se explica debido a la atracción del azul de metileno por las cargas negativas del PGA, ya que el PGA es un polianión con gran cantidad de grupos carboxilo expuestos (Yamaguchi *et al.* 1996).

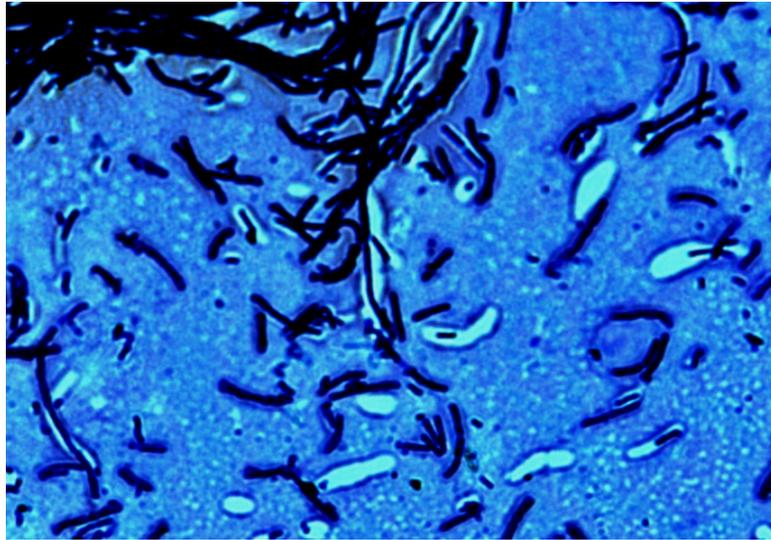


**Figura 5.** Aspectos morfológicos de Bt-EM14. A) Colonias mucoides en agar nutritivo; B) Tinción negativa de los bacilos con tinta china, en donde la zona clara alrededor de los bacilos corresponde a la cápsula ; C) Tinción de Gram; D) Flagelos peritricos observados mediante microscopia de contraste de fases; E) Tinción de cristales irregulares con azul de Coomasie, en donde se aprecian los cristales, esporas y algunas células vegetativas; F) Tinción diferencial que permite discriminar entre los cristales y las esporas elipsoidales, las cuales no se tiñen de color azul con amido negro. Todas las micrografías se tomaron empleando el objetivo de inmersión 100X.



**Figura 6.** Resultados de la tinción de McFaydean. A) *B. cereus* ATCC 11778; el microorganismo no sintetiza cápsula. B) Células de Bt-EM14 mostrando gran cantidad de polímero capsular. C) Células de *B. subtilis* DAF-1, rodeadas de material capsular. D) células capsuladas de *K. pneumoniae*, en donde la cápsula no presenta afinidad por el azul de metileno policrómico. Todas las observaciones se realizaron mediante objetivo de inmersión 100X.

*B. cereus* ATCC 11778 no presentó material capsular, por lo cual no hay tinción de material extracelular como se observa en la Figura 6. La importancia de la tinción de McFaydean es fundamental, ya que la Organización Mundial de la Salud la considera como tinción diagnóstica, cuando se recupera material biológico contaminado con células vegetativas de *B. anthracis* (véase Figura 1), y no se dispone de medios de cultivo para el aislamiento (Turnbull 2008). En la Figura 7 se puede observar una preparación de Bt-EM14 de más de 48 h de edad en medio sólido, en donde se realizó la misma tinción, con la diferencia de que se fijó primero con calor y posteriormente con formalina (formol al 10%) antes de la tinción. En esta imagen se puede apreciar la gran cantidad de material capsular la cual forma una matriz que envuelve a las células bacterianas.



**Figura 7.** Tinción de Bt-EM14 mediante la técnica de McFaydean, en donde el frotis se fijó con calor y formalina. Obsérvese que el material capsular envuelve a las células bacterianas en una matriz confluyente. Los espacios claros son sitios en donde las células se desprendieron por acción mecánica. Observación con el objetivo de inmersión.

### 5.3 Pruebas bioquímicas

Los resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos del género *Bacillus* recomendadas por la American Society for Microbiology se muestran en la Tabla 2. Éstos permiten observar que Bt-EM14 presenta características similares a las de los otros miembros del grupo *B. cereus*, y que permiten segregar a *B. anthracis*, el cual no presenta movilidad. Esta característica se debe a que los genes que codifican las proteínas del flagelo de *B. anthracis* no se expresan, aunque cabe aclarar que se han aislado cepas carentes de cápsula con flagelos funcionales los cuales podían actuar como fimbrias de adhesión (Liang & Yu 1999).

Tabla 2. Pruebas bioquímicas primarias para la identificación de *Bacillus*

Prueba *	Bt-EM14	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>B. thuringiensis</i> HD-1	<i>B. anthracis</i> Sterne
Catalasa	+	+	+	+
Movilidad	+	+	+	-
Formación de indol	-	-	-	-
Producción de H <sub>2</sub> S	-	-	-	-
Reducción de nitratos a nitritos	+	+	+	+
Licuefacción (hidrólisis) de gelatina	+	+	+	+
Arginina descarboxilasa	+	+	+	+
Crecimiento en altas concentraciones de NaCl ∇	7%	7%	5%	5%

\* Las pruebas de movilidad, formación de indol y producción de H<sub>2</sub>S se realizaron en medio SIM, empleando como testigo a *K. pneumoniae*.

∇ Junto con las cepas probadas, se cultivó *B. subtilis* DAF-1, el cual pudo crecer hasta en concentraciones de 8% de NaCl.

La prueba de la arginina descarboxilasa es empleada en la identificación del grupo *B. cereus*. Otros microorganismos como *B. subtilis* o *B. pumilus* no expresan la enzima (Logan *et al.* 2007). La reacción permite observar la conversión enzimática de arginina en putrescina, con la liberación de CO<sub>2</sub> gaseoso. Sin embargo, la putrescina puede ser asimilada, por lo que la lectura de la prueba debe realizarse antes de las 36 h posteriores a la inoculación.

Los resultados positivos en las pruebas de reducción de nitratos y licuefacción de gelatina, así como la incapacidad de producir indol y H<sub>2</sub>S, junto con sus características morfológicas, permiten clasificar a Bt-EM14 como parte del grupo *B. cereus*.

La capacidad de crecer en medios con altas concentraciones de NaCl, es otra característica que permite distinguir de forma presuntiva a las especies del grupo *B. cereus*, ya que *B. anthracis* es capaz de crecer en medios con 7% de NaCl (Turnbull 2008). *B. anthracis* Sterne, es una cepa acapsulada que no creció en medios con más de 5% de NaCl. Este fenómeno sólo se observa en cepas capsuladas empleando condiciones que permiten la expresión de la misma (medio alcalino), lo cual pone de manifiesto que la cápsula de PGA juega un importante papel en la resistencia al estrés ambiental, tal como ocurre con *B. subtilis* DAF-1, el cual es capaz de

crecer en medios que superan el 8% de NaCl. Bt-EM14 se desarrolló en medios con 7% de NaCl.

#### **5.4 Perfil exoenzimático y perfil de asimilación de fuentes de carbono**

Los resultados del perfil exoenzimático se muestran en la Tabla 3. *S. marcescens* WF, cepa apigmentada, fue empleada como testigo positivo en la mayoría de las pruebas.

Bt-EM14 produce una gran variedad de enzimas extracelulares. Las que se producen en mayor cantidad son proteasas (caseinasa, elastasa y queratinasa), amilasas, fosfolipasas, quitosanasa y quitinasa. Las enzimas que se producen en cantidad moderada son lipasas, estererasas y colagenasa. Hay una producción indetectable o nula en Bt-EM14 de celulasas y de DNAsa. Es claro que el microorganismo es capaz de aprovechar una gran variedad de fuentes de carbono y nitrógeno.

Bt-EM14 mostró un perfil exoenzimático idéntico a las tres cepas de *B. thuringiensis* ensayadas (Bt-132, Bt LIBT-418, Bt HD-1), y es claramente diferente a *B. subtilis* DAF-1, esta última destaca por su capacidad de hidrolizar carbohidratos complejos como pectina y celulosa. El perfil enzimático de *B. anthracis* destaca por la producción de colagenasa, elastasa y DNAsa, los cuales son factores de virulencia. La producción de DNAsa es única dentro de las especies del grupo *B. cereus*, pues destaca como factor de virulencia al promover la destrucción de los macrófagos hospederos durante la primera fase de invasión de *B. anthracis* (Helgason *et al.* 2000; Turnbull 2008).

Tabla 3. Perfiles enzimáticos comparativos entre Bt-EM14 y microorganismos del grupo *B. cereus*

Enzima Cepa	Bt- EM14	<i>B.</i> <i>thuringiensis</i> 132	<i>B.</i> <i>thuringiensis</i> LIBT-418	<i>B.</i> <i>thuringiensis</i> HD-1	<i>B.</i> <i>cereus</i> ATCC 11778	<i>B.</i> <i>anthracis</i> Sterne	<i>B.</i> <i>subtilis</i> DAF-1	<i>S.</i> <i>marcescens</i> WF (referencia)
Celulasa *	0.033	0.026	0.039	0.059	0.080	0.038	0.108	0.004
Colagenasa*	0.181	0.153	0.470	0.181	0.369	0.210	0.917	0.687
Queratinasa*	0.241	0.197	0.339	0.308	0.220	0.106	0.543	0.218
Quitinasa	+	+	+	+	-	-	-	+
Quitosanasa	+	+	+	+	+	+	+	-
Esterasa	+	+	+	+	+	+	-	+
Pectinasa **	-	-	-	-	-	-	+	-
Elastasa	+	+	+	+	+	+	+	-
Lipasa	+	+	+	+	+	+	+	+
Fosfolipasa	+	+	+	+	+	+	+	+
Amilasa	+	+	+	+	+	+	+	-
DNAsa ***	-	-	-	-	-	+	+	+
Caseinasa	+	+	+	+	+	+	+	+

\* Los valores son medidas espectrofotométricas a 595 nm. En el caso de la celulasa, la única lectura positiva corresponde a *B. subtilis* DAF-1

\*\* El control positivo empleado en esta prueba fue *Erwinia carotovora*.

\*\*\* Se empleó a *Staphylococcus aureus* ATCC 2593 como control positivo.

La asimilación de fuentes de carbono permite comparar la capacidad degradativa de los microorganismos del grupo *B. cereus* (Tabla 4), la cual depende de la información genética que porta el microorganismo, ya sea por intercambio genético, o como adaptación al ambiente. *B. anthracis* es incapaz de degradar un gran número de carbohidratos, sin embargo presenta entre 50 y 60 proteasas distintas que le permiten invadir, matar y degradar los tejidos del hospedero, con la finalidad de dejar en libertad a sus esporas en el suelo (Han *et al.* 2006). Bt-EM14 sólo pudo degradar 2 de las 13 fuentes de carbono probadas (fructosa y maltosa). *B. anthracis* tiene un perfil similar, ya que sólo pudo degradar 3 de las 13 fuentes (sacarosa, fructosa y maltosa). Como contraparte, *B. subtilis* DAF-1 degradó 10 de las 13 fuentes de carbono, lo cual refleja su potencial como cepa productora de enzimas microbianas.

Las 3 cepas de *B. thuringiensis* probadas y *B. cereus* presentaron un perfil similar, al degradar todas ellas 4 de los 13 sustratos (sacarosa, glicerol, fructosa y maltosa). Todas las cepas del grupo *B. cereus* no fueron capaces de degradar galactosa ni lactosa, aunque se han reportado cepas como *B. cereus* E33L, capaces de degradar estos carbohidratos, al poseer genes de origen foráneo presentes en uno o varios plásmidos (Rasko *et al.* 2005; Han *et al.* 2006). En esta prueba se empleó *K. pneumoniae* como control positivo, ya que es capaz de asimilar las 13 fuentes de carbono probadas.

**Tabla 4. Asimilación de diferentes fuentes de carbono por las cepas microbianas probadas**

Fuente de Carbono / Cepa	Bt-EM14	<i>B. thuringiensis</i> HD-1	<i>B. thuringiensis</i> Bt-132	<i>B. thuringiensis</i> LBIT-418	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>B. anthracis</i> Sterne	<i>B. subtilis</i> DAF-1	<i>S. marscencens</i> WF	<i>K. Pneumoniae</i> (control)
Sacarosa	-	+	+	+	+	(+)W	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Glicerol	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Manosa	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Celobiosa	-	+	-	-	-	-	+	+	+
Fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-	(+)W	+	+
Galactosa	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MDG *	-	-	-	-	-	-	+	-	+
MDM +	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Salicina	-	-	-	-	-	-	+	+	+

\* MDG= Metil-D-glucósido MDM+ = Metil-D-Manósido W= Reacción débil

### 5.5 Identificación de Bt-EM14 utilizando el sistema API50 CHB y BBL-Crystal

El sistema API50 CHB no permitió clasificar de forma definitiva a Bt-EM14 como una cepa típica de *B. thuringiensis*. El perfil fenotípico mostrado en la Tabla 5, muestra que Bt-EM14 es capaz de emplear 9 de los 49 sustratos probados (N-acetil glucosamina, esculina, fructosa, glucosa, glucógeno, maltosa, ribosa, almidón y trehalosa). Aunque la degradación de N-acetil-glucosamina y almidón son características de *B. thuringiensis*, el perfil no concuerda con los reportados para cepas tipo como *B. thuringiensis* 107 (Ventura-Suárez 2007).

Bt-EM14, a diferencia de la gran mayoría de las cepas del grupo *B. cereus*, es incapaz de emplear la sacarosa como fuente de carbono.

**Tabla 5. Resultados del sistema API 50CHB para la identificación de Bt-EM14**

Carbohidrato	Cepa				Carbohidrato	Cepa			
	<i>B. cereus</i> 11778	Bt-107	<u>Bt-EM14</u>	<i>B. anthracis</i> *		<i>B. cereus</i> 11778	Bt.-107	<u>Bt-EM14</u>	<i>B. anthracis</i> *
<b>NAG</b>	+	+	+	+	<b>Octogluconato</b>	-	-	-	-
<b>Adonitol</b>	-	-	-	-	<b>Lactosa</b>	-	-	-	-
<b>Amigdalina</b>	-	+	-	-	<b>D-Xilosa</b>	-	-	-	-
<b>D-Arabinosa</b>	-	-	-	-	<b>Maltosa</b>	+	+	+	+
<b>L-Arabinosa</b>	-	-	-	-	<b>Manitol</b>	-	-	-	-
<b>D-Arabitól</b>	-	-	-	-	<b>D-Manosa</b>	-	-	-	-
<b>L-Arabitól</b>	-	-	-	-	<b>Melobiosa</b>	-	-	-	-
<b>Arbutina</b>	+	+	-	+	<b>Melezitosa</b>	-	-	-	-
<b>Celobiosa</b>	+	+	-	+	<b>MDG</b>	-	-	-	-
<b>Dulcitol</b>	-	-	-	-	<b>MDM</b>	-	-	-	-
<b>Eritritol</b>	-	+	-	-	<b>D-Rafinosa</b>	-	-	-	-
<b>Esculina</b>	+	+	+	+	<b>Rhamnosa</b>	-	-	-	-
<b>D-Fructosa</b>	+	+	+	+	<b>Ribosa</b>	+	+	+	+
<b>D-Fucosa</b>	-	-	-	-	<b>Salicina</b>	+	+	-	-
<b>L- Fucosa</b>	-	-	-	-	<b>Sorbitol</b>	-	-	-	-
<b>Galactosa</b>	-	-	-	-	<b>L-Sorbosa</b>	-	-	-	-
<b>D- Gentobiosa</b>	-	-	-	-	<b>Almidón</b>	+	+	+	+
<b>Gluconato</b>	W	W	-	+	<b>Sacarosa</b>	+	+	-	W
<b>D-Glucosa</b>	+	+	+	+	<b>D-Tagatosa</b>	-	-	-	-
<b>Glicerol</b>	W	-	-	-	<b>Trehalosa</b>	+	+	+	W
<b>Glucógeno</b>	-	+	+	+	<b>D-Turanosa</b>	-	-	-	-
<b>Inositol</b>	-	-	-	-	<b>Xilotol</b>	-	-	-	-
<b>Inulina</b>	-	-	-	-	<b>D-Xilosa</b>	-	-	-	-
<b>Cetoglutarato</b>	-	-	-	-	<b>L-Xilosa</b>	-	-	-	-

W = Reacción débil, NAG= N-acetil glucosamina, MDG = Metil- $\alpha$ -manósido, MDM = Metil- $\alpha$ -glucósido.

\* Resultados obtenidos de la base de datos del sistema API 50CHB

Un resultado similar ocurre con el sistema BBL-Crystal, el cual se repitió por triplicado sin lograr una plena identificación de Bt-EM14. Esto se debió a que la base de datos electrónica del sistema no incluye el perfil de *B. thuringiensis*, además de que varios sustratos fueron degradados débilmente. Sin embargo, dentro de las pruebas positivas de Bt-EM14 que demuestran su filiación con el grupo *B. cereus* destacan la degradación de la esculina, la N-acetil-glucosamina y la producción de arginasa. Los resultados se muestran en la tabla 6.

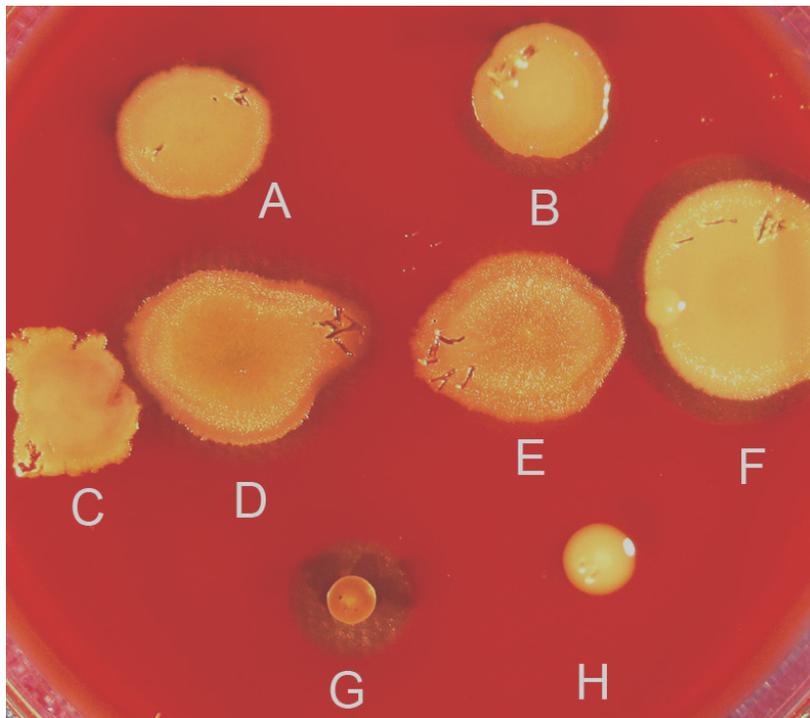
Tabla 6. Resultados del sistema BBL-Crystal para Bt-EM14.

Sustrato	Resultado	Sustrato	Resultado
Glicerol	-	Urea	-
L- Arabinosa	-	Sacarosa	-
Fructosa	+	Mu- $\alpha$ -D-glucosido	-
Manitol	-	Mu- $\beta$ -D-glucosido	-
Metil- $\alpha$ -D-glucosa	-	AMC-arginina	+
N-Acetil-glucosamina	+	Gluconato	-
Esculina	+	Celobiosa	-
Lactosa	-	Maltosa	V
Threhalosa	+	Valina	-
Almidón	+	Ácido piroglutámico	+
Fenilalanina	W	Isoleucina	-
Indol	-	Maltotriosa	+
MU-Fosfato	+	ONPG (prueba Galactosidasa)	-
p- nitrofenil- $\beta$ -D-glucósido	+	Arginina hidrolasa	+
p-nitrofenil fosfato	+	Control negativo de fluorescencia	-

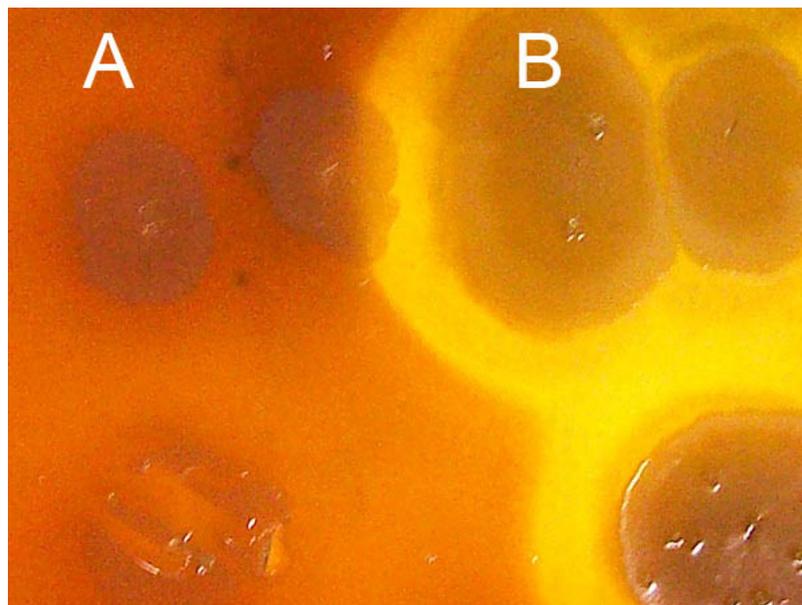
V: Reacción variable. W= Reacción débil

## 5.6 Prueba de actividad hemolítica

La incapacidad de lisar eritrocitos de mamífero es una de las pruebas básicas para discriminar a *B. anthracis* del resto de las especies del grupo *B. cereus*, debido a que el gen que codifica el factor transcripcional PlcR de *B. anthracis* presenta una mutación y no es funcional. En *B. thuringiensis* y *B. cereus* permite la expresión de hemolisinas y enterotoxinas (Agaisse *et al.* 1999; Han *et al.* 2006). Bt-EM14 es capaz de lisar los eritrocitos de carnero produciendo un gran halo de hemólisis, al igual que las cepas de *B. thuringiensis* Bt 132, Bt LIBT-418. Bt HD-1 y *B. cereus* ATCC 11778. Por su parte *B. anthracis* Sterne no produjo hemólisis. Esto se observa en la Figura 8. En la Figura 9 se muestran los halos de hemólisis producidos por Bt-EM14 después de 72 h de incubación.



**Figura 8.** Halos de hemólisis en agar suplementado con sangre de carnero, fotografiados después de 24 h de incubación. A) Bt-EM14; B) Bt 132; C) Colonia no hemolítica de *B. anthracis* Sterne; D) Bt LIBT-418; E) Bt HD-1; F) *B. cereus* ATCC; G) *B. subtilis* DAF-1; H) *S. marcescens* WF (control negativo no hemolítico).

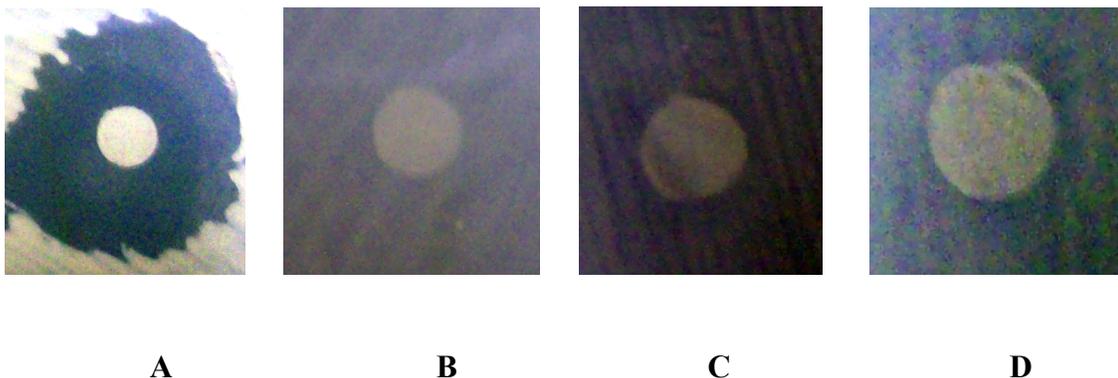


**Figura 9.** Halos de hemólisis en agar suplementado con sangre de carnero, fotografiados después de 72 h de incubación. A) Colonias no hemolíticas de *B. anthracis* Sterne; B) Colonias hemolíticas de Bt-EM14.

### 5.7 Sensibilidad a antibióticos $\beta$ -lactámicos

La resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos es una de las pruebas que permite segregar a *B. anthracis* del resto de los miembros del grupo *B. cereus*. Aunque *B. anthracis* presenta genes cromosómicos que codifican para betalactamasas (genes *bla*), éstos presentan sin embargo un bajo nivel de expresión, lo que hace al microorganismo susceptible a la acción de los antibióticos (Chen *et al.* 2003).

Las cepas de *B. thuringiensis* Bt-132, Bt LIBT-418, así como *B. cereus* ATCC 11778, y Bt-EM14 presentaron resistencia a la bencilpenicilina (penicilina G), caso contrario al de *B. anthracis* Sterne, el cual resultó sensible al presentar un halo de inhibición mayor a los 2.6 cm de diámetro, tal como se observa en la Figura 10 (Tunrull, 2008). La resistencia de Bt-EM14 junto con el cúmulo de pruebas bioquímicas realizadas, permiten agruparlo como parte del subgrupo *B. cereus/ B. thuringiensis*. No obstante lo anterior, resulta notable que los antibióticos  $\beta$ -lactámicos tengan una limitada utilidad en el tratamiento del ántrax, ya que no pueden penetrar dentro de los macrófagos infectados, además de que la cápsula reduce la permeabilidad de estos antibióticos sobre la célula bacteriana. Por ello, para el tratamiento del ántrax cutáneo o respiratorio, el CDC de los Estados Unidos recomienda un tratamiento con ciprofloxacina, doxiciclina y penicilina G (Chen *et al.* 2004).



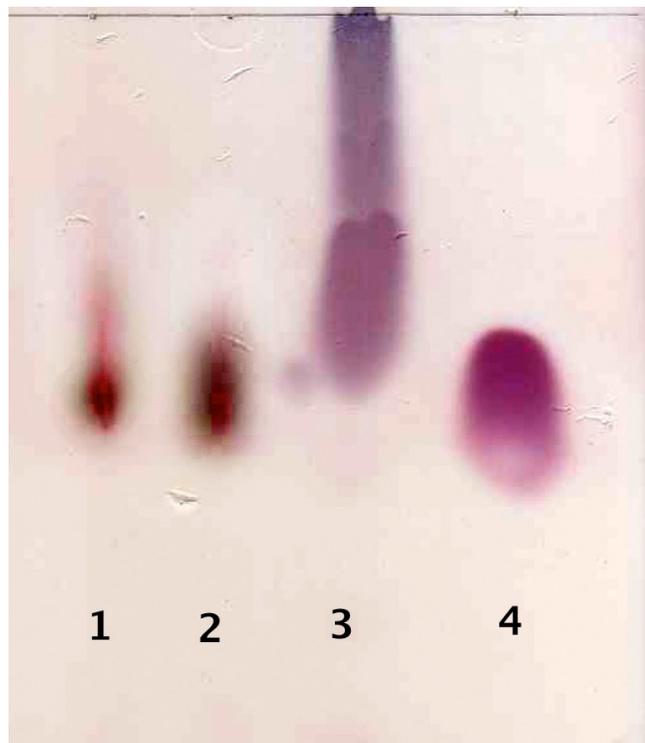
**Figura 10.** Prueba de sensibilidad a la penicilina G. En el centro de cada imagen se encuentra un disco impregnado de antibiótico. A) *B. anthracis* Sterne es un microorganismo sensible al antibiótico; B) Bt 132; C) Bt-EM14; D) Bt LIBT-418.

## **5.8 Análisis del material capsular por cromatografía en capa fina**

El método empleado para recuperar la cápsula de Bt-EM14 se basó en la premisa de que su composición era ácido poliglutámico (PGA), debido a que este polímero constituye las cápsulas de *B. anthracis* y de *B. licheniformis*. El método utilizado permitió recuperar un promedio 1.25 g (peso húmedo) de PGA por litro de medio de cultivo. Cabe destacar que la metodología fue aplicada también en la separación del PGA de *B. subtilis* DAF-1, el cual funcionó como control positivo en las pruebas de cromatografía, electroforésis y espectroscopía IR.

El aislamiento del material capsular se basó en la precipitación del mismo mediante un tratamiento con etanol ácido, el cual disminuye el grado de hidratación de la cápsula, de forma que ésta se torna menos soluble (Shih & Van 2001). En cultivo líquido, parte del material capsular fue liberado al medio, debido a que el cultivo se realizó en condiciones de agitación. Aunque se han reportado novedosos métodos para la obtención de PGA con un mayor rendimiento y pureza, como la precipitación con CuSO<sub>4</sub> (Manocha & Margaritis 2010), existe el inconveniente de que se requiere un largo proceso de diálisis y el uso de agentes quelantes que permitan obtener un producto libre de iones metálicos. Por lo tanto, se recurrió a la precipitación con etanol frío.

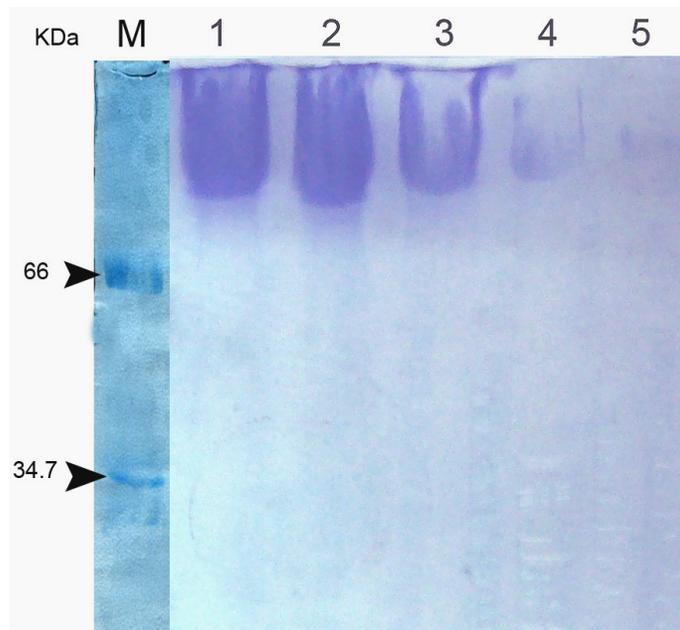
La cromatografía en capa fina del hidrolizado permitió observar que la mayoría del producto precipitado corresponde a un polímero de ácido glutámico (Figura 11), lo que permitió deducir que la cápsula de Bt-EM14 está constituida de PGA.



**Figura 11.** Cromatograma realizado en placa de silica gel. La placa se reveló con ninhidrina y se calentó hasta la aparición de las manchas de migración. 1) Hidrolizado del PGA de Bt-EM14 sin diluir, 2) Hidrolizado del PGA de *B. subtilis* DAF-1 sin diluir, 3) Estándar de clorhidrato de ácido glutámico 0.02 M, 4) Estándar de ácido glutámico como sal monosódica 0.02 M.

### 5.9 Patrón electroforético de la cápsula

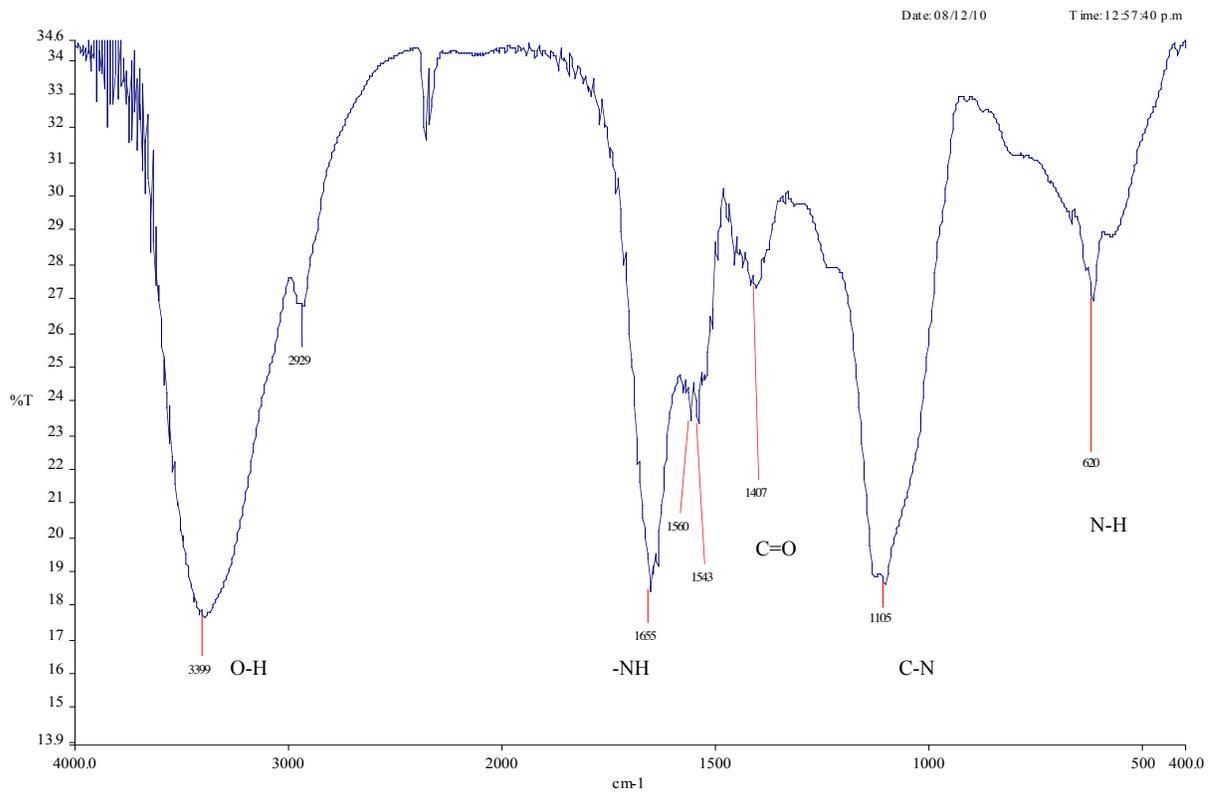
El electroferograma obtenido mostró que el peso molecular del polímero PGA es muy alto, superior a los 100 KDa, esto se infiere por la escasa migración que presentó la muestra en el gel de poliacrilamida (Figura 12). El peso molecular del PGA depende del microorganismo que lo produce. Para *B. subtilis* se han reportado tamaños situados entre 160 a 1500 KDa. (Candela & Fouet 2006). Este procedimiento también comprueba de forma cualitativa que el polímero es PGA, debido a la afinidad que tiene éste con el azul de metileno, el cual se empleó como revelador; ya que previamente un gel anterior se reveló con azul Coomasie, el cual no se unió a las muestras de PGA (Kambourova *et al.* 2001). Cabe mencionar que este polímero tiene grandes aplicaciones en el tratamiento de aguas como agente floculante de partículas en suspensión, y quelante de metales pesados, así como en la industria farmacéutica, cosmética, y alimenticia (Ho *et al.* 2006).



**Figura 12.** Electroferograma de las muestras de PGA de *B. subtilis* DAF-1 y Bt-EM14. Carril 1: PGA de *B. subtilis* DAF-1 (20 µg de muestra). Carriles 1 a 5: PGA de Bt-EM14 en concentraciones decrecientes de 20, 15, 10, 5 y 1 µg de muestra. Se muestra en el extremo izquierdo de la figura el marcador de peso molecular (M), revelado por separado con azul Coomassie.

### 5.10 Espectroscopía IR

Los espectros de absorción en la región del infrarrojo del PGA de Bt-EM14 y *B. subtilis* DAF-1 (Figuras 13 y 14), muestran bandas de absorción específicas que confirman su identidad como PGA. Una de las regiones más importantes en ambos espectros son las bandas de absorción situadas en  $1655\text{ cm}^{-1}$ , las cuales son características del grupo amida del enlace peptídico. Los picos de absorción situados en  $1407$  y  $1458\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a la absorción de radiación IR por el doble enlace covalente del grupo carboxilo. Destaca en ambos espectros una amplia banda de absorción con máximos situados en  $3399$  y  $3394\text{ cm}^{-1}$ , cuya identidad química corresponde al grupo hidroxilo (-OH). Por otra parte, los picos situados en  $2934$  y  $2929\text{ cm}^{-1}$  son característicos del enlace covalente entre el hidrógeno y el nitrógeno del enlace peptídico (N-H). Este enlace químico asimétrico presenta una absorción adicional producida por la oscilación interenlace o “bending”, la cual se sitúa entre  $619$  y  $620\text{ cm}^{-1}$ . Por último, los picos situados en  $1129$  y  $1105\text{ cm}^{-1}$  corresponden al enlace covalente entre C-N del grupo amino. Estos valores de absorción se comparan con los obtenidos por Ho y colaboradores (2006), los cuales se resumen en la tabla 7.



**Figura 13.** Espectro de absorción en la región del infrarrojo que corresponde al PGA de Bt-EM14 en pastilla de KBr.

En la figura 15 se muestran los espectros de absorción traslapados de ambas muestras, (así como la estructura del PGA), los cuales presentan una gran similitud con los espectros de absorción del PGA producido por *B. subtilis*, reportados por los equipos de Shih & Vahn (2001) y Ho (2006).

La caracterización del PGA podría continuar a través de metodologías como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), y el HPLC para determinar el número de residuos de aminoácidos, así como el tipo de estereoisómeros de ácido glutámico presentes en el PGA (Ho *et al.* 2006). Esto es importante, ya que permitiría determinar de forma indirecta la ruta metabólica presente en Bt-EM14 responsable de la síntesis y exportación del PGA hacia el exterior de la célula microbiana, ya que en la naturaleza prevalece el L-glutámico, mientras que por post-procesamiento mediado por isomerasas, en *B. subtilis* y *B. anthracis* cambia a la forma D, produciendo poli-D-glutámico (Candela & Fouet 2006).

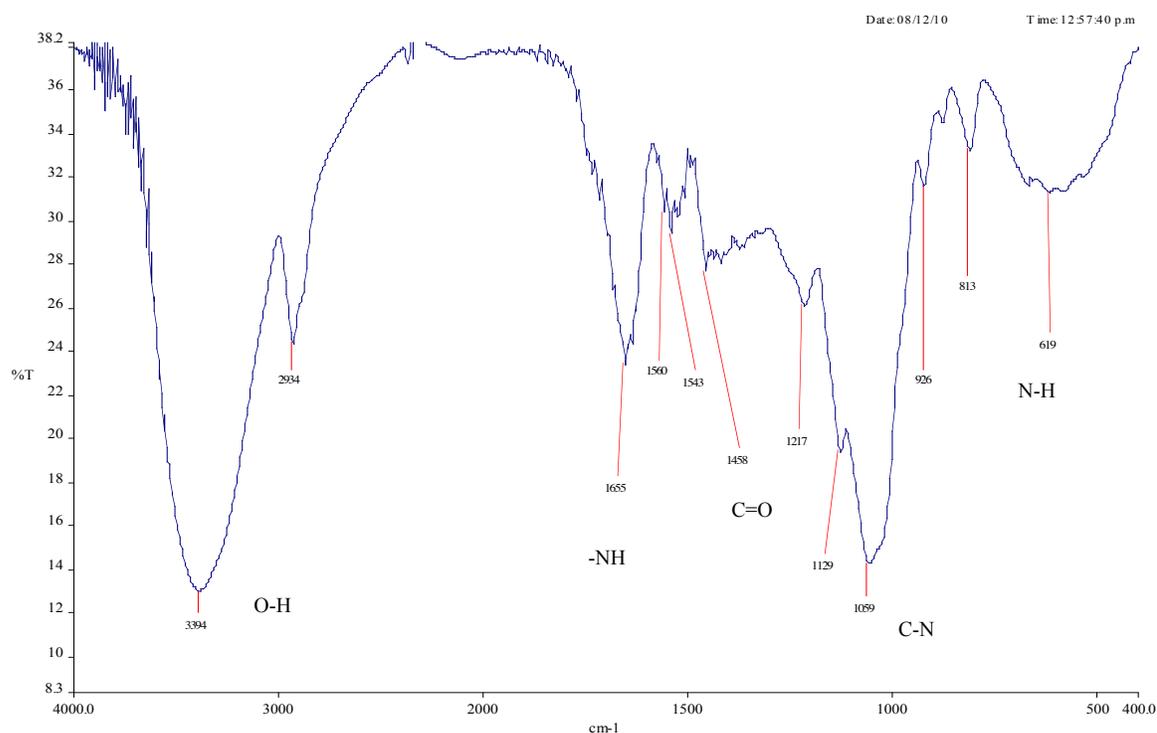
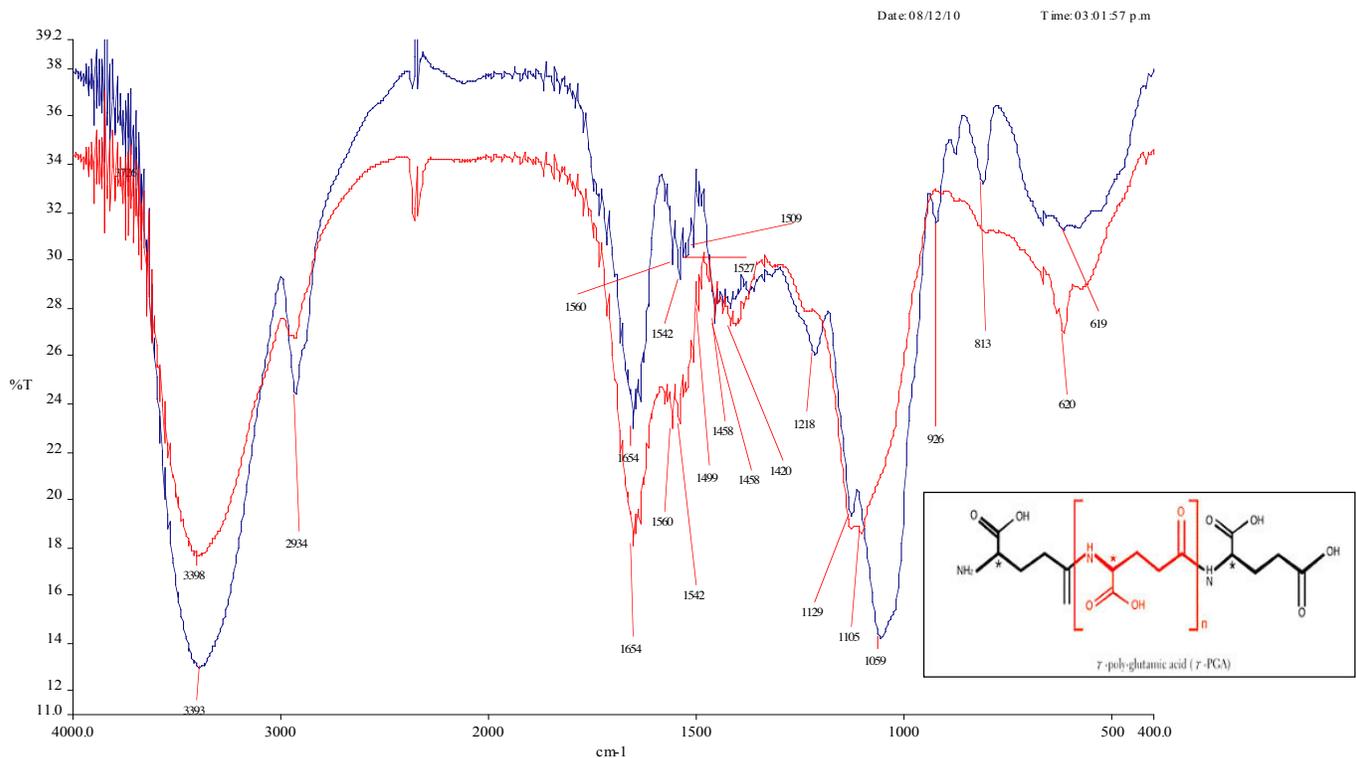


Figura 14. Espectro de absorción en la región del infrarrojo que corresponde al PGA de *B. subtilis* DAF-1 en pastilla de KBr.

Tabla 7. Picos de absorción en el espectro IR de los enlaces covalentes de las muestras de PGA incluidas en pastillas de KBr

Enlaces covalentes	Absorción de PGA de Bt-EM14 (cm <sup>-1</sup> )	Absorción de PGA de <i>B. subtilis</i> DAF-1 (cm <sup>-1</sup> )	Absorción de PGA de <i>B. subtilis natto</i> * (cm <sup>-1</sup> )
Enlace C=O del grupo carboxilo	1407	1458	1402
Enlace -NH del grupo amino	1655	1655	1643
Enlace N-H por oscilación o "bending"	620	619	698
Enlace C-N del grupo amino	1105	1059	1162
Enlace O-H del grupo carboxilo	3399	3394	3436

\* Datos reportados por Ho *et al.* 2006.



**Figura 15.** Comparativa de los perfiles de absorción del PGA de Bt-EM14 (en azul), y *B. subtilis* DAF-1 (rojo). En el recuadro de la derecha se muestra la estructura del PGA.

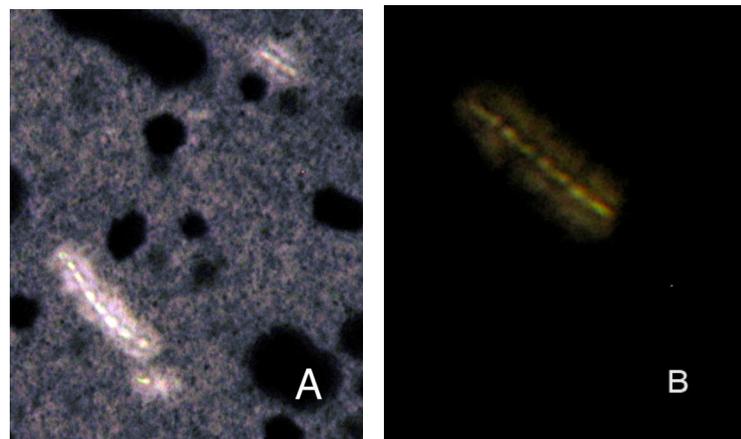
### 5.11 Unión de la cápsula a la pared celular

Las observaciones mediante tinción negativa, muestran que Bt-EM14 presenta una cápsula unida a la pared celular, ya que no se dispersó después del tratamiento térmico, tal como se puede observar en la figura 16. En este aspecto, Bt-E1M4 presenta una cápsula semejante a las de *B. anthracis* y *B. licheniformis*.

El calentamiento a 65 °C por 30 min fue descrito por Candela y colaboradores (2005), como un método rápido para determinar la unión de la cápsula de PGA a la pared celular de *B. anthracis*. La metodología se basa en que a esta temperatura, las células vegetativas mueren debido a la inactivación enzimática y por cambios en la fluidez de la membrana. Al mismo tiempo, si la cápsula no está unida a la pared celular en forma covalente, ésta se separa de la célula microbiana, dispersándose en el medio circundante.

Conocer si la cápsula de un microorganismo está anclada a su pared celular o si ésta solamente rodea el cuerpo celular tiene grandes implicaciones, ya que puede determinar su patogenicidad y/o resistencia a un ambiente hostil. *Staphylococcus epidermidis* y *B. anthracis*, son microorganismos patógenos para el ser humano, y poseen una cápsula de PGA unida covalentemente a sus pared celular. Esto les permite evitar la opsonización por parte de los anticuerpos del hospedero y al mismo tiempo escapar de la fagocitosis (Candela & Fouet 2006). Aunque Bt-EM14 posee una cápsula unida covalentemente a la pared celular, no es por fortuna un microorganismo patógeno primario, como posteriormente se referirá.

Por otro lado, *B. licheniformis* es un microorganismo que habita suelos alcalinos, y puede sobrevivir en presencia de altas concentraciones de sales y metales pesados. Su cápsula de PGA está anclada covalentemente a su pared celular, y le provee protección ante la desecación y la toxicidad de los metales presentes en suelos contaminados (McLean *et al.* 1990). Por otro lado, *B. subtilis* también produce PGA pero no se encuentra unido de forma covalente a la pared celular. Esto en principio sería desventaja para enfrentarse al ambiente hostil, sin embargo, en este caso el PGA juega un papel diferente, al formar parte de biopelículas que permiten mantener unidas a las células de una colonia, mientras se favorece la comunicación y la diferenciación de las células *B. subtilis*. Así, mientras unas células esporulan, otras producen antibióticos que inhiben el crecimiento de microorganismos competidores, manteniendo la colonia activa y protegida en el suelo (López *et al.* 2009).



**Figura 16.** Tinción negativa con tinta china de Bt-EM14 para determinar la unión de la cápsula a la pared celular. A) observación antes del tratamiento térmico B) observación después del tratamiento a 65 °C.

## 5.12 Bioensayo en ratones

Bt-EM14 es un aislado ambiental, sin embargo, la presencia de cápsula permitía la posibilidad de que ésta le otorgara algún grado de patogenicidad, en conjunto con el juego de enzimas líticas que expresa. Otro escenario era que Bt-EM14 fuera inocuo para los mamíferos, tal como ocurre con las cepas típicas de *B. thuringiensis* y *B. subtilis*, éste último es un microorganismo capaz de sintetizar PGA, (Osera *et al.* 2009). Sin embargo, es calificado como microorganismo GRAS (*Generally Regarded As Safe* o generalmente inocuo) y por ello es empleado ampliamente con fines biotecnológicos (Boer *et al.* 1991).

El bioensayo con animales ha sido un método empleado para caracterizar cepas patógenas de *Bacillus*. En 1998, Hernández y colaboradores estudiaron a *B. thuringiensis* H-34 97-27, cepa de origen clínico. El bioensayo para determinar la patogenicidad del microorganismo se realizó con ratones de la cepa BALB/c, los cuales se caracterizan por ser ratones altamente sensibles a diversas toxinas bacterianas. (Hernández *et al.* 1998). Posteriormente, se ensayó la inoculación vía nasal, con resultados igualmente letales (Hernández *et al.* 1999).

Por otro lado está el caso de *B. cereus* G9241, el cual provocó la muerte de varios trabajadores de una siderúrgica en los Estados Unidos. (Hoffmaster *et al.* 2004), debido a la síntesis de la toxina antrácica, junto con una cápsula de polisacáridos. El bioensayo permitió confirmar la patogenicidad del microorganismo. Se emplearon ratones de la cepa A/J, la cual es altamente sensible a la toxina antrácica, y por ello se emplea para probar la potencia de la cepa vancunal *B. anthracis* Sterne (Welkos *et al.* 1989). En el bioensayo se emplearon grupos de 6 ratones a los cuales se les inoculó la dosis letal 100% de *B. anthracis* Sterne, que para el caso de la cepa A/J es de  $10^4$  esporas por individuo. La inoculación fue por vía intraperitoneal. Una dosis equivalente se empleó para inocular *B. cereus* G9241 por la misma vía. En ambos casos se incluyó un testigo negativo, al cual sólo se inoculó solución salina. La letalidad para *B. anthracis* Sterne y *B. cereus* G9241 fue del 100%, ya que los ratones de ambos experimentos murieron a las 72 h posteriores a la inoculación. En ambos casos se recuperaron los microorganismos inoculados en diversos órganos internos.

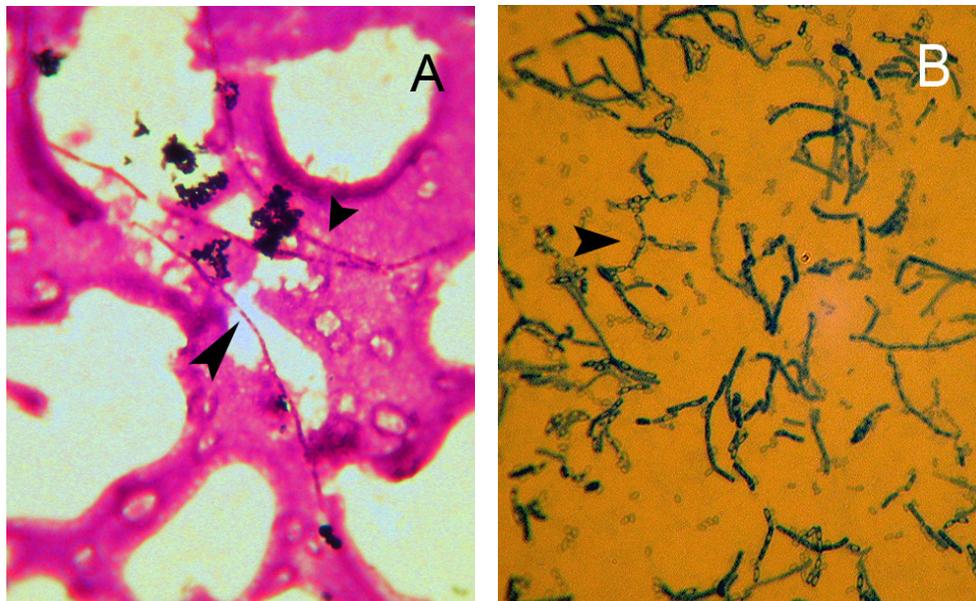
Para determinar la patogenicidad de Bt-EM14, en el presente estudio se planeó un protocolo experimental similar, tomando como referencia los trabajos antes mencionados de Hernández (1998), Hoffmaster y col. (2004), y el de Ebrahimi y col. (2009), en donde en este último trabajo se emplearon ratones hembra de la cepa CD-1, de 8 semanas de edad, los cuales fueron empleados en estudios de invasividad de *B. anthracis* Sterne en meninges y encéfalo.

En el presente caso, se procedió de la siguiente forma: a un grupo de 5 animales se les inoculó por vía intraperitoneal la dosis letal reportada para la cepa Sterne ( $4 \times 10^4$  UFC por animal). Otro grupo de 5 ratones fue inoculado con una misma dosis de esporas de Bt-EM14. Al mismo tiempo, otro conjunto fue inoculado con esporas de *B. thuringiensis* HD-1, cepa prototípica de *B. thuringiensis*, y considerada como inocua para los mamíferos. En el mismo experimento se incluyó un grupo de control negativo, al que sólo se les inoculó la solución salina con que se realizaron las suspensiones de las diferentes esporas.

La razón por la cual la inoculación fue por vía intraperitoneal es que por esta vía de inoculación el desarrollo de la infección es más rápido, ya que los macrófagos del peritoneo rápidamente fagocitan las esporas y éstas germinan iniciando la infección (Ebrahimi *et al.* 2009). Además, este tipo de inoculación no es un procedimiento complicado, como lo sería el tratar de infectar los animales mediante aerosoles. El inconveniente de la inoculación intraperitoneal es que no se trata de una vía de infección natural.

Los resultados obtenidos mostraron que sólo murieron los animales que fueron inoculados con *B. anthracis* Sterne. Dos de ellos murieron después de las 60 h posteriores a la inoculación. Los otros tres presentaron signos de agonía (dificultad para respirar, convulsiones y pelo erizado), y debieron ser sacrificados con vapores de cloroformo 70 h después de la inoculación. Se tomaron muestras de sangre de los animales, las cuales fueron teñirlas con azul de metileno policrómico (tinción de McFaydean), y con Giemsa. Se observaron bacterias formando largas cadenas (Figura 17A). Al realizar la necropsia de esos cinco animales se observó edema en hígado y bazo. Cuando se tomaron trozos de dichos órganos para inocular por impronta cajas de agar TSI, se recuperó la cepa de *B. anthracis* inoculada. (Figura 17B), la cual fue identificada a través de su morfología microscópica y colonial.

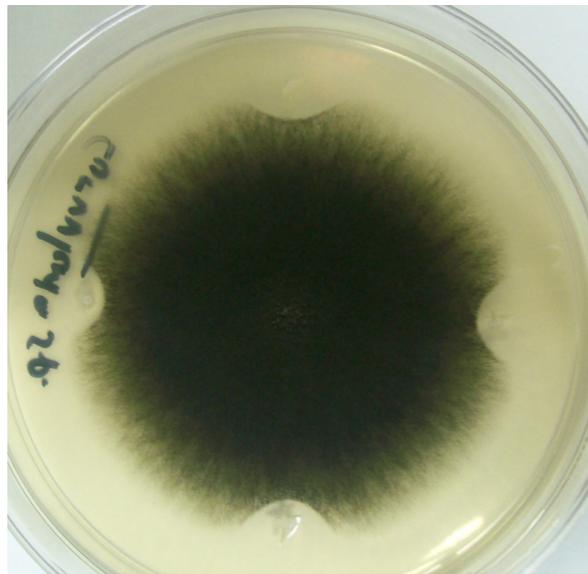
En cambio los animales que fueron inoculados con Bt-EM14 y *B. thuringiensis* HD-1 fueron sangrados para realizar frotis, pero no se observó bacteriemia. Con este ensayo no se descarta por completo que Bt-EM14 sea totalmente inocuo, y sería conveniente repetirlo tomando en cuenta las variables relativas al estado de salud de los animales, cambiando las vías de inoculación, dosis empleadas, y sobre todo el empleo de animales inmunosuprimidos, para determinar si Bt-EM14 se comporta como un patógeno oportunista. Otros ensayos propuestos son la búsqueda de la expresión y secreción de toxinas, a través de bioensayos con cultivos celulares (Beattie & Williams 1999); métodos inmunológicos como ELISA y Western-Blot, así como la implementación de PCR para la detección de toxinas de tipo emético y hemolítico, presentes en diversas especies de *Bacillus*, como *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, entre otras (Ankolekar *et al.* 2009).



**Figura 17.** Micrografías de *B. anthracis* obtenidas mediante microscopía óptica. A) frotis de sangre de uno de los ratones. Las flechas indican cadenas de bacilos. La matriz de fondo incluye algunos eritrocitos. Tinción con Giemsa. B) microorganismos recuperados a partir de la inoculación por impronta de hígado en medio TSI sólido. La flecha indica a los bacilos esporulados formando cadenas. Tinción con azul Coomasie. Ambas imágenes se tomaron con el objetivo de inmersión.

### 5.13 Bioensayo en placa contra hongos filamentosos

Se conocen diversos géneros de bacilos Gram positivos (*Bacillus*, *Paenibacillus*, *Geobacillus*) que producen moléculas con actividad antibiótica y antifúngica. Además, se tiene el antecedente de que *B. subtilis* DAF-1, produce antifúngicos y antimicrobianos de naturaleza peptídica (Mendoza-Gamboa 2007). Por otra parte, la producción de antimicrobianos por parte de *B. thuringiensis* ha sido pobremente estudiada. Por este motivo, se decidió evaluar la acción antimicrobiana de Bt-EM14 en contra de 5 hongos fitopatógenos que infectan cultivos (Finch & Finch 1985), y que en condiciones de inmunosupresión pueden comportarse como patógenos oportunistas. Los hongos probados fueron *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Curvularia* sp., *Fusarium* sp. y *Helminthosporium* sp. Bt-EM14 sólo inhibió levemente el crecimiento de *Curvularia* sp. (figura 18). Sería interesante realizar el mismo ensayo con otros hongos filamentosos para establecer el espectro de inhibición producido por Bt-EM14, así como determinar la naturaleza química de los compuestos con actividad antimicótica.



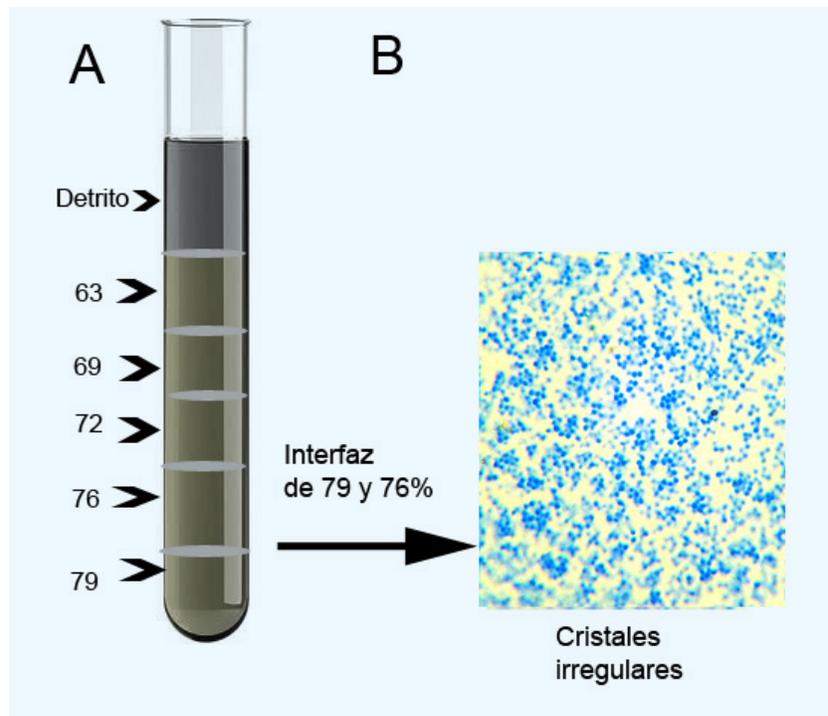
**Figura 18.** Fotografía que muestra los halos de inhibición del crecimiento de *Curvularia* sp. producido por el antagonismo de Bt-EM14.

#### 5.14 Recuperación de cristales y perfil electroforético

El perfil de migración de las proteínas Cry que conforman los cristales determinado mediante SDS-PAGE, es uno de los ensayos básicos para caracterizar los cristales de nuevas cepas de *B. thuringiensis*. La purificación de los cristales de Bt-EM14 fue complicada, debido a su peculiar tamaño y forma, así como a la presencia de PGA, el cual perdura aún después de la autólisis de las células, lo cual favorece la formación de cúmulos de esporas y cristales. La estrategia para la recuperación de los cristales a partir un cultivo en medio sólido incluyó calentamiento a ebullición de la mezcla de esporas y cristales, seguidos de lavados con etanol para así eliminar el PGA.

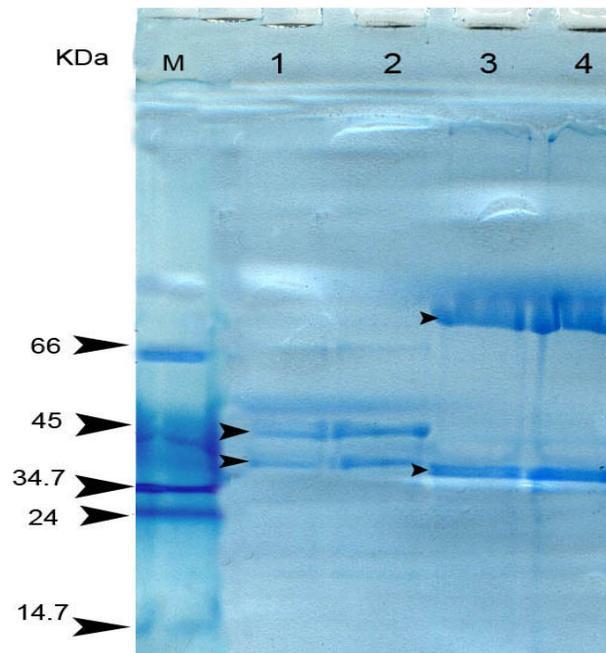
La primer estrategia que se ensayó para la separación de los cristales fue mediante un sistema bifásico de polietilenglicol y fosfatos. Con este método se recuperaron los cristales a partir de cultivos en medio sólido. Sin embargo, el grado de pureza no fue el requerido para realizar el perfil electroforético ya que los geles mostraron numerosas bandas de un tamaño inferior a los 14 KDa, atribuibles a la presencia de restos celulares mezclados en la muestra. (resultados no mostrados). No obstante, la metodología referida permitió el aislamiento de cristales de *B. thuringiensis* 33, cuyas proteínas se emplearon como patrones de peso molecular conocido (45 43 KDa).

Para recuperar los cristales de Bt-EM14, que se emplearon finalmente para definir el patrón electroforético y para determinar su morfología a través de microscopía electrónica de barrido, se empleó la purificación mediante ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa (López-Meza & Ibarra 1996). Las concentraciones de sacarosa fueron modificándose hasta obtener el gradiente requerido para el aislamiento de los cristales, el cual comprendió las concentraciones de 63, 69, 72 76 y 79% de sacarosa, en donde los cristales de Bt-EM14 se concentraron en la interfase de 76 y 79% de sacarosa (Figura 19).



**Figura 19.** En A) se muestra una representación del tubo de ultracentrifuga en donde se indican las capas del gradiente con las diferentes concentraciones de sacarosa. B) Fotomicrografía de los cristales de Bt-EM14 teñidos con azul de Coomassie.

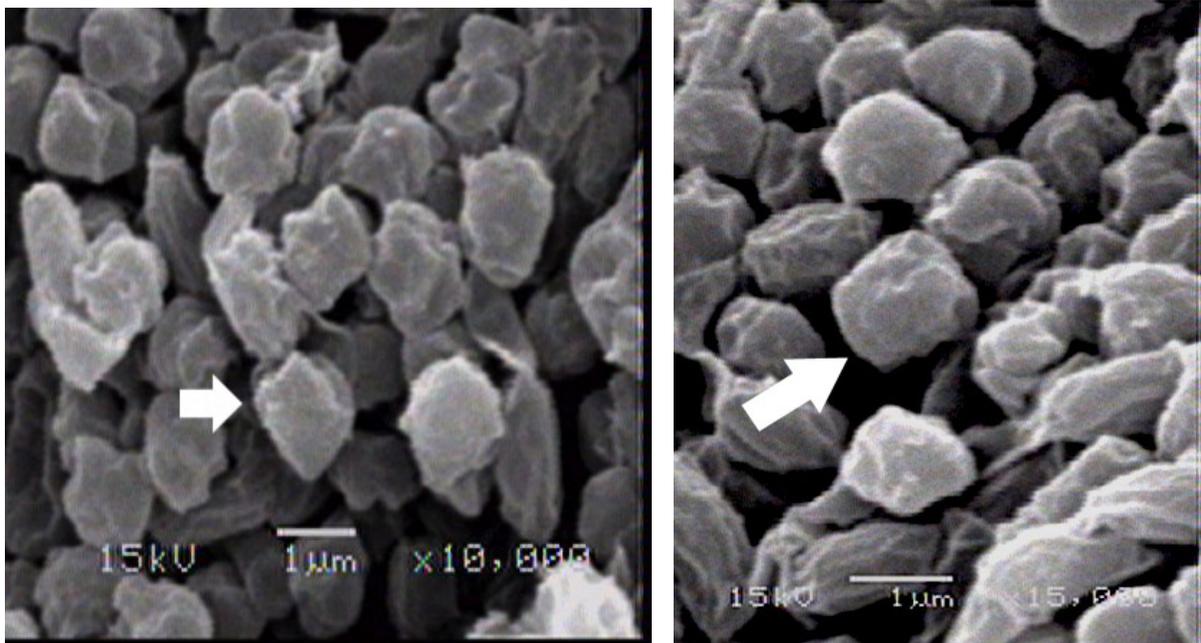
El perfil electroforético de la figura 20 muestra que los cristales de Bt-EM14, solubilizados en condiciones alcalinas, están constituidos por al menos dos proteínas; Una de ellas de aproximadamente 43 KDa, mientras que la otra tiene un tamaño superior a los 66 KDa. Por su parte, los cristales de Bt-33 empleados como marcadores presentan dos proteínas cuyos pesos moleculares conocidos son 45 y 43 KDa. Desafortunadamente el perfil por si solo, no permite determinar si las proteínas del cristal de Bt-EM14 están relacionadas con algunas de las proteínas Cry reportadas previamente. Hasta el 2008, se tenían enlistados cerca de 376 proteínas Cry distintas, divididas en 54 grupos, las cuales tienen pesos moleculares que van desde los 35 hasta 138 KDa. (Sauka & Benintende 2008). Para determinar la clase de proteínas Cry presentes se podrían emplear varias metodologías, entre las que destacan la secuenciación de péptidos, el empleo de anticuerpos contra proteínas Cry, y la PCR para la amplificación y secuenciación de genes que codifican para las proteínas Cry. (López-Meza & Ibarra 1996).



**Figura 20.** Electroferograma en gel de poliacrilamida al 8%, de las proteínas del cristal de Bt-33 y Bt-EM14. Carril M: Marcadores de peso molecular. Carril 1: 10 µL de proteínas de los cristales de Bt-33. Carril 2: 15 µL de proteínas del cristal de Bt-33. Carril 3: 10 µL de las proteínas de los cristales de Bt-EM14. Carril 4: 15 µL de proteínas del cristal de Bt-EM14.

### 5.15 Ultraestructura de los cristales de Bt-EM14 mediante Microscopía Electrónica de Barrido

La microscopía electrónica de barrido mostró que los cristales de Bt-EM14 tienen una forma indefinida con múltiples caras de superficie irregular. El tamaño de los cristales es de aproximadamente un 1 µm de largo (Figura 20). Estos cristales contrastan con los producidos por la cepa capsulada de *B. thuringiensis* BGSC 4AJ1, la cual produce cristales bipiramidales (Cachat *et al.* 2008). Los cristales de Bt-EM14 tienen cierta semejanza con los producidos por cepas silvestres mexicanas reportadas por Rosas-García y colaboradores, en el 2009, los cuales estaban constituidos por nuevas proteínas Cry.

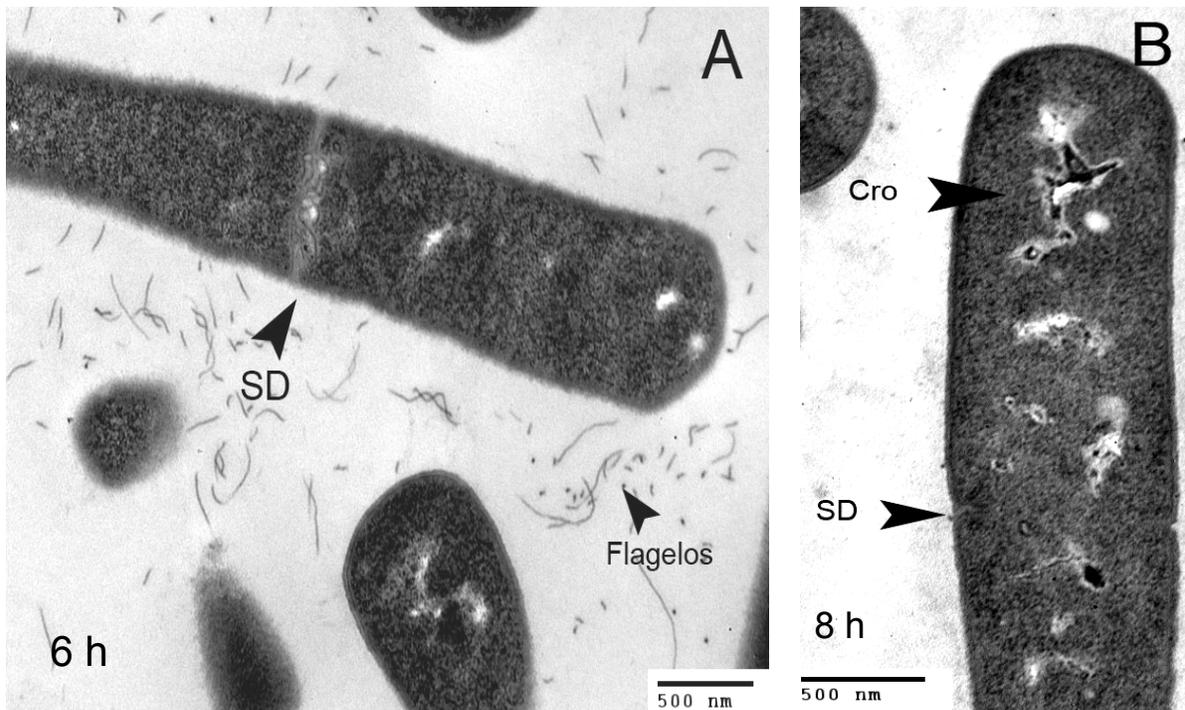


**Figura 21.** Electromicrografías de barrido de los cristales irregulares de Bt-EM14. A la izquierda se observan empleando una magnificación de 10,000X. A la derecha se muestra un acercamiento a 15,000X.

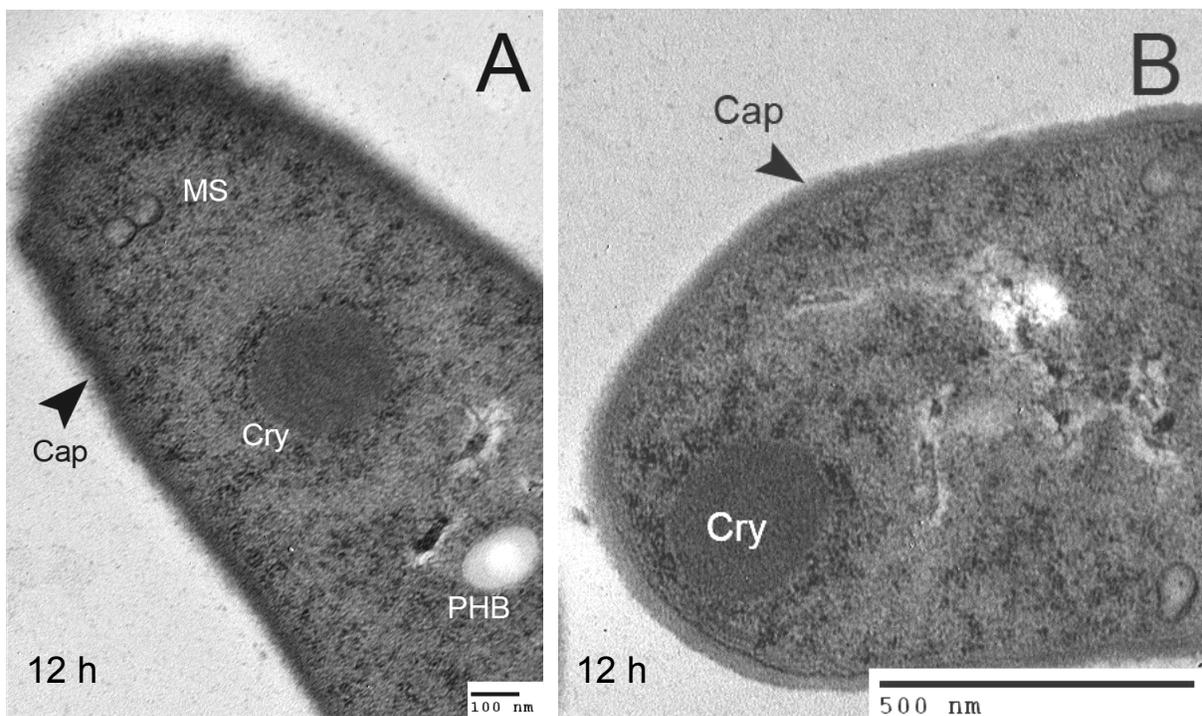
### 5.16 Observación del proceso de esporulación de Bt-EM14 mediante Microscopía Electrónica de Transmisión

La finalidad de la microscopía electrónica de transmisión fue la de observar el ciclo de esporulación de Bt-EM14. Al hacerlo se observó el desarrollo de la espora y del cristal paraesporal, así como la ultraestructura de la cápsula microbiana. La esporulación ocurre cuando los microorganismos sufren estrés nutricional. En *Bacillus* la esporulación se desarrolla en 7 etapas diferenciadas las cuales van desde la célula vegetativa hasta la maduración de la espora con sus capas exteriores y, en el caso de *B. thuringiensis*, se incluye además la formación del cristal paraesporal. La formación del cristal paraesporal fue descrito por primera vez por Bechtel & Bulla (1976).

La etapa I se muestra en la figura 22A, en donde se muestra la célula vegetativa de Bt-EM14 después de 6 h de incubación, donde se aprecia la formación de septos de división celular. Pueden observarse también flagelos peritricos cortados en diferentes niveles, y no se observan cambios en la densidad del citoplasma bacteriano.



**Figura 22.** Micrografía electrónica de transmisión de Bt-EM14, mostrando los estadios iniciales del crecimiento de Bt-EM14. La figura 22A corresponde a una célula vegetativa a punto de dividirse, después de 6 h de incubación. En la figura 22B se muestra una célula vegetativa a las 8 h de crecimiento, en donde se observa el inicio de la división celular, así como cromatina densa. SD, septo divisional; Cro, cromatina formando el filamento axial a lo largo de la célula.

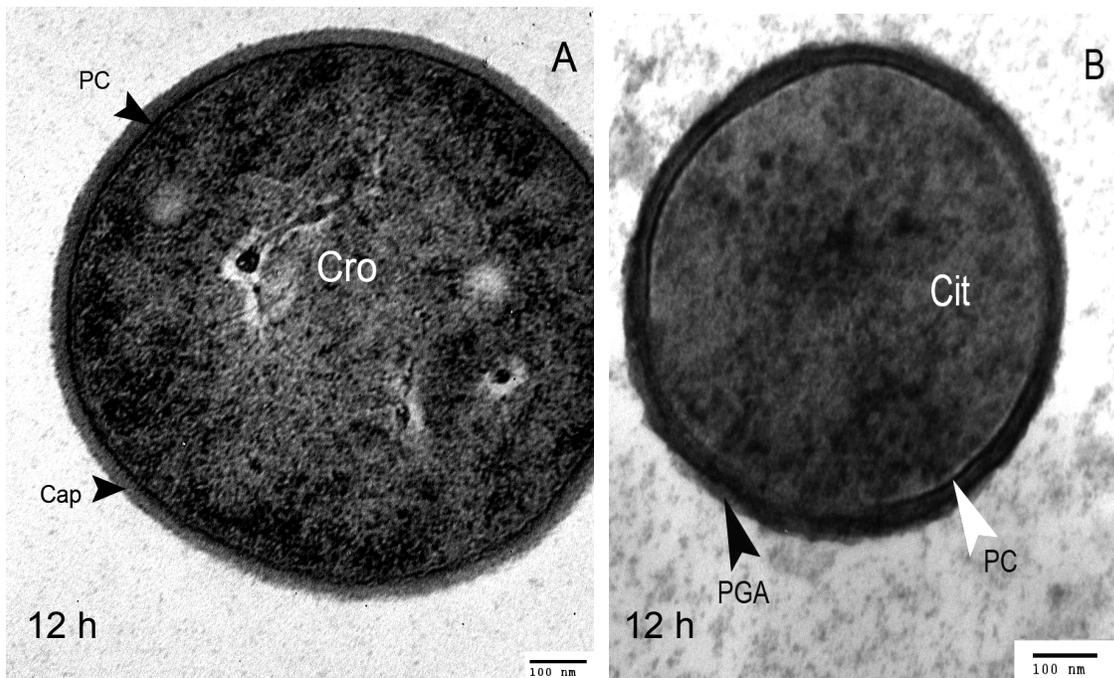


**Figura 23.** Micrografías electrónicas de transmisión de Bt-EM14, en las que se observa la etapa II del ciclo de esporulación. En A se observan los filamentos de la cápsula. Cap, cápsula del microorganismo; MS, mesosomas; Cry, cristal incipiente.

En la figura 22B se muestra una célula vegetativa después de 8 h de crecimiento. En este estadio la reproducción se desarrolla por bipartición y se aprecia la condensación del DNA cromosomal y de sus proteínas asociadas a lo largo del cuerpo celular. Esta condensación se denomina filamento axial, lo cual va acompañado de la replicación del cromosoma bacteriano.

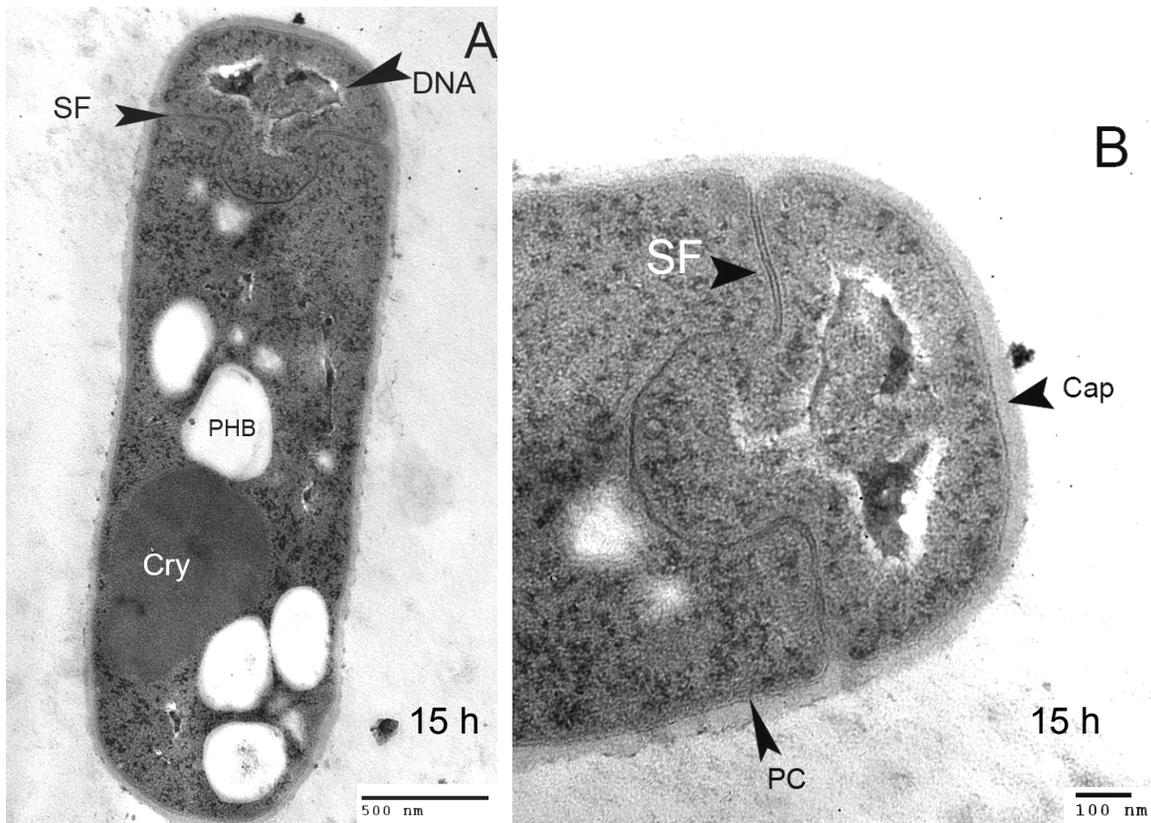
En la figura 23 se muestra el microorganismo en la etapa II del ciclo, después de 12 h de incubación, en donde en el interior del citoplasma se aprecian inclusiones esféricas electrodensas, que corresponden a la formación del incipiente cristal paraesporal. En este aspecto, Bt-EM14 difiere respecto a *B. thuringiensis* HD-1, ya que el cristal paraesporal de éste último comienza a formarse en la etapa III del ciclo de esporulación (Bechtel & Bulla 1976), mientras que en Bt-EM14 comienza su formación desde la etapa II. En la figura 23A, en el extremo de la célula se observa la formación incipiente de mesosomas, que son estructuras invaginadas que darán origen a la forospora o espora primigenia. En las figuras 23A y 23B se señalan filamentos que envuelven a la célula, y que corresponden a la cápsula del microorganismo.

En la figura 24A se muestra un corte transversal del microorganismo, después de 12 h de incubación, en donde se señala la presencia de la cápsula envolviendo la pared celular. En la figura 24B se muestra un corte transversal de una célula de *B. subtilis* DAF-1 después de 12 h de incubación, en donde se aprecia que su cápsula tiene una estructura filamentosa similar. En cultivos de más de 36 h de edad de *B. subtilis* el PGA forma una biopelícula que une a todos los microorganismos de la colonia (Morikawa *et al.* 2006). Estructuras filamentosas similares se observan cuando se expresa la cápsula de *B. anthracis*, aunque en este caso, la cápsula está asociada a la capa S, una capa de proteínas o glicoproteínas ancladas a la pared celular, cuya función podría ser la de evitar la unión de los anticuerpos del hospedero a la bacteria (Mesnage *et al.* 1998).

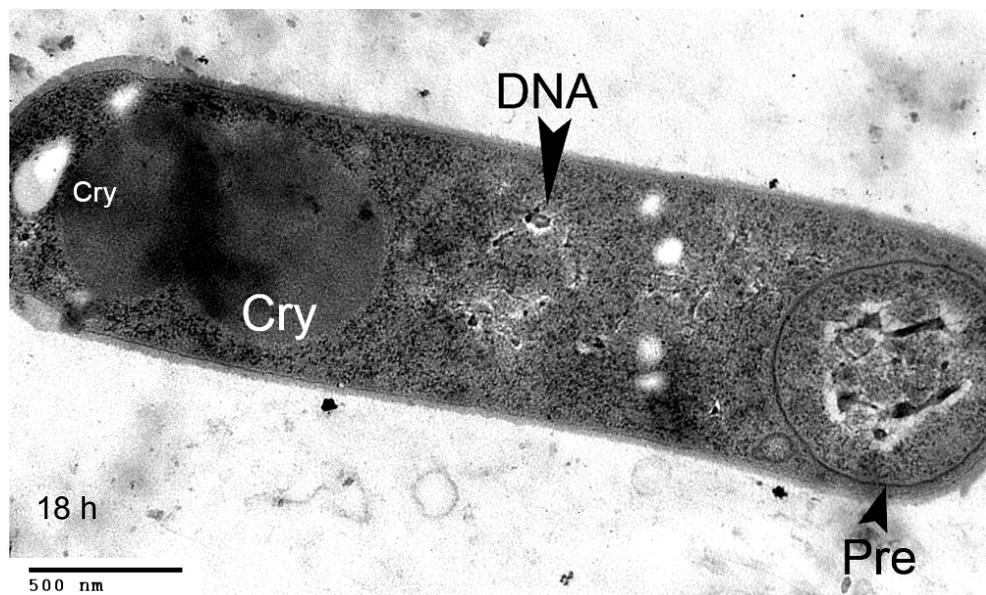


**Figura 24.** A) Micrografía electrónica de transmisión de Bt-EM14, en la que se observa un corte transversal del microorganismo después de 12 h. Se observa cromatina condensada dentro del citoplasma y filamentos envolviendo la pared celular del microorganismo. B) Micrografía electrónica de transmisión de *B. subtilis* DAF-1, después de 12 h, en donde se observa una estructura filamentososa similar de PGA alrededor de la célula. PC, pared celular; Cap, cápsula; Cro, cromatina; Cit, citoplasma; PGA, cápsula de ácido poliglutámico.

La figura 25A corresponde a la etapa III del ciclo, la cual ocurre después de 15 h de incubación. En esta etapa el espacio delimitado por el septo foresporal, situado en uno de los polos del microorganismo posee en su interior una copia del cromosoma bacteriano. Al mismo tiempo, se observa cerca del polo opuesto un cristal proteico en formación de unas 500 nm de largo. También hay numerosos nucleoides o gránulos de polihidroxibutirato (PHB), los cuales son inclusiones utilizadas como reserva de energía por el microorganismo, cuando es sometido a estrés nutricional. Se observan a su vez cambios discretos en la densidad del citoplasma. En la figura 25B se muestra un acercamiento al polo de una célula vegetativa, donde se observa una invaginación del septo foresporal, que dará al final de la etapa III, la formación de la preespora.



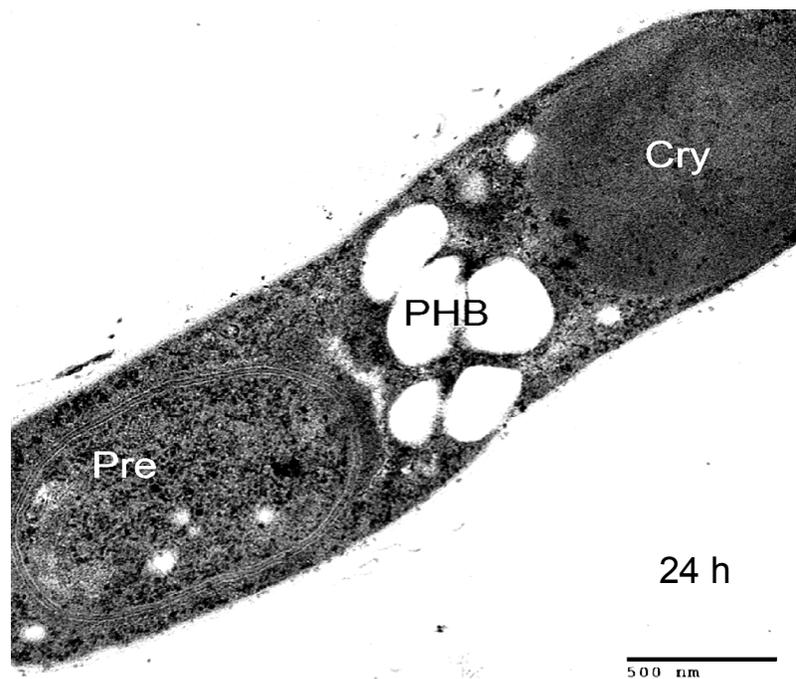
**Figura 25.** Micrografías electrónicas de transmisión de Bt-EM14, en las que se observan la etapa III del ciclo de esporulación. A) Corte longitudinal en donde se aprecia la formación del septo foresporal. B) Acercamiento al polo de la célula en donde se desarrolla la futura espora. Se aprecia DNA condensado y asociado a proteínas. SF, septo foresporal; PHB, polihidroxibutirato; Cry, cristal; Cap, cápsula.



**Figura 26.** Micrografía electrónica de transmisión de Bt-EM14, correspondiente al final de la etapa III del ciclo de esporulación. Pre, preespora completamente delimitada; Cry, cristales paraesporales; DNA, cromosoma de la célula madre.

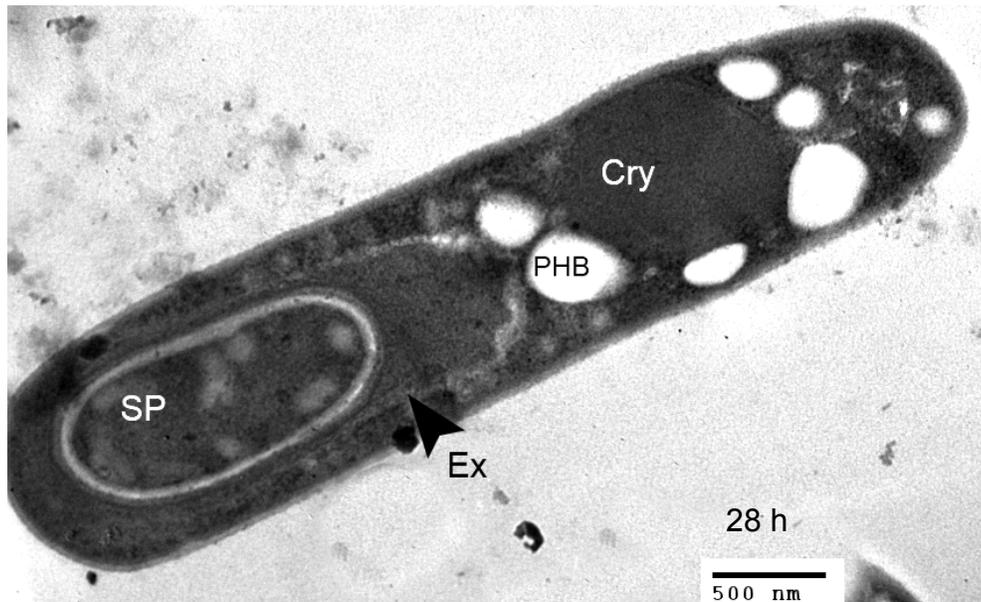
En la figura 26 se aprecia el final de la etapa III. Después de 18 h de incubación, la preespora está delimitada y situada en uno de los polos de la célula madre. El DNA se encuentra condensado y asociado a proteínas dentro de la preespora. En esta etapa, el crecimiento del cristal continua, y en algunas células se forman dos cristales como se aprecia en las figuras 26 y 30. En este aspecto, Bt-EM14 se asemeja a *B. thuringiensis* serovar, *finitimus* el cual también sintetiza dos inclusiones proteicas irregulares, aunque una de ellas se forma libre en el citoplasma, y la otra dentro del exosporio (Debro *et al.* 1986). Este fenómeno no se observa en Bt-EM14.

En figura 27 se observa la etapa IV del ciclo de esporulación, después de 24 h de incubación, en donde comienza la formación del exosporio y otras cubiertas protectoras de la espora. La preespora se encuentra en proceso de maduración, y dentro de ella se han acumulado proteínas y sales minerales. El cristal paraesporal ha alcanzado casi 1000 nm de largo, y se observan grandes inclusiones de PHB en la región media de la célula vegetativa.

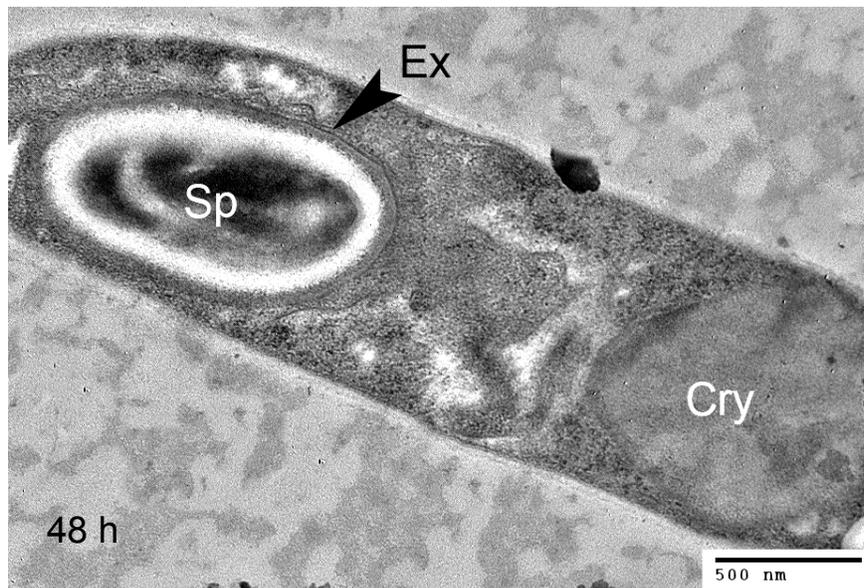


**Figura 27.** Micrografía electrónica de transmisión de Bt-EM14, en las que se observan la etapa IV del ciclo de esporulación. Pre, preespora en proceso de maduración, con cubiertas en formación; PHB, inclusiones de polihidroxibutirato; Cry, cristal.

La figura 28 corresponde a las etapas V y VI de la esporulación, después de 28 h de incubación. En esta etapa la espora está completamente formada y en su interior se observa la aparición de estructuras con diferente electrodensidad que corresponden a la condensación del cromosoma y proteínas en asociación con ácido dipicolínico, iones de calcio y otros iones metálicos que le confieren a la espora una alta resistencia al calor y a la desecación. En el exterior de la espora se aprecia la formación del cortex o corteza, así como del exosporio, el cual es un saco membranoso que envuelve la espora y que facilita la adherencia de la espora a superficies, una vez que ésta queda libre (Redmon *et al.* 2004). El cristal proteico permanece en el polo opuesto de la célula. También se aprecian numerosos gránulos de PHB.

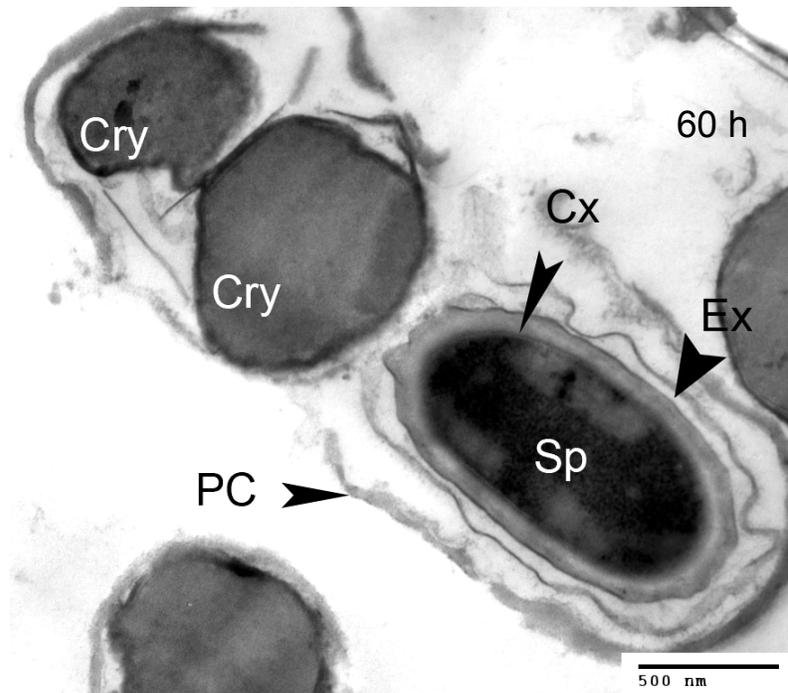


**Figura 28.** Micrografía electrónica de transmisión de Bt-EM14, en la que se observan las etapas V y VI del ciclo de esporulación. Sp, espora; Ex, exosporio extendido y rodeando la espora; PHB, inclusiones de polihidroxibutirato; Cry, cristal.



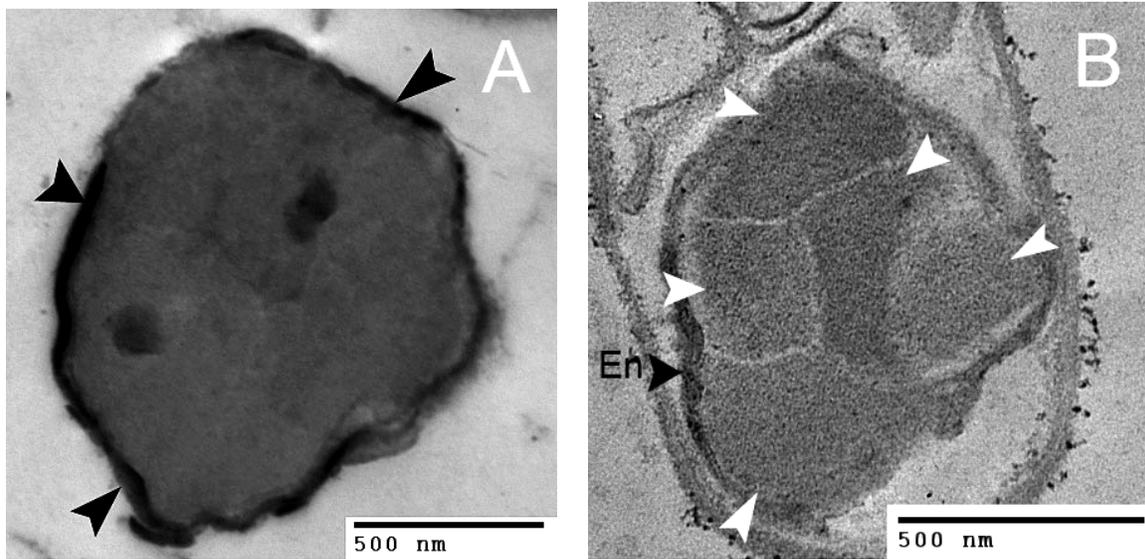
**Figura 29.** Micrografía electrónica de transmisión de Bt-EM14, en la que se observan la etapa VII del ciclo de esporulación. Sp, espora madura; Ex, exosporio plegado y rodeando la espora; Cry, cristal.

La figura 29 corresponde a la etapa VII de la esporulación; la micrografía se tomó después 48 h de incubación. La espora permanece dentro de la célula madre y se observa un prominente exosporio plegado alrededor de la espora, lo cual es un indicador de que el ciclo de esporulación ha terminado y la célula vegetativa está deshidratándose. En esta etapa la célula madre se encuentra en estado de senescencia y tal vez su metabolismo depende del aprovechamiento de su cápsula, ya que en este estadio no se observan restos de la misma alrededor de la célula. Un fenómeno similar se ha observado en *B subtilis*, el cual es capaz de aprovechar como fuente de carbono y energía el PGA extracelular, una vez que los nutrientes del medio se han agotado, permitiéndole a la célula madre un mayor tiempo de vida (Kimura *et al.* 2004). Tal vez está sea la razón por la cual la lisis de las células vegetativas de Bt-EM14 se desarrolle después de 60 h.



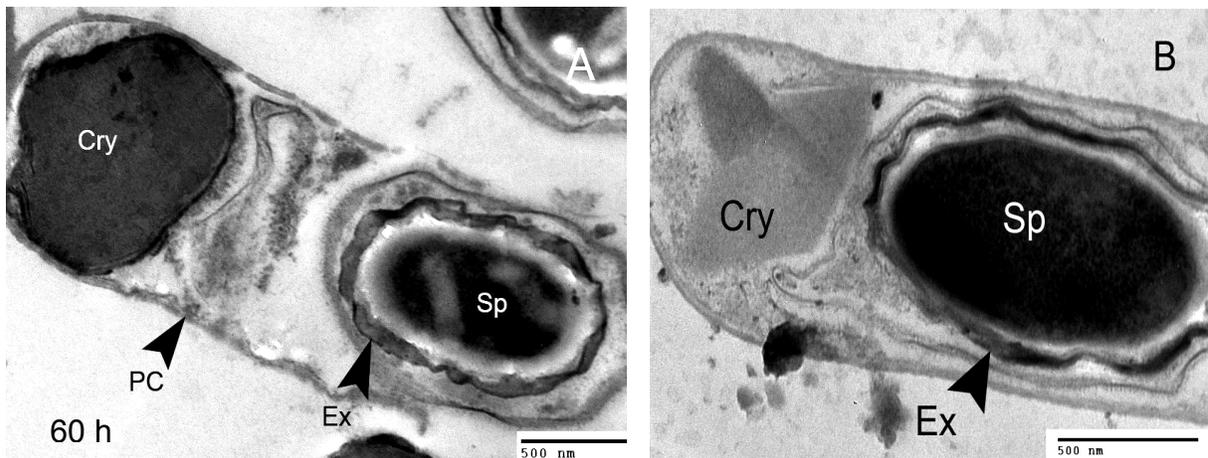
**Figura 30.** Micrografía electrónica de transmisión de Bt-EM14, en la que se observa la lisis de la célula madre después de 60 h. PC, restos de la pared celular; Sp, espora madura; Ex, exosporio membranoso rodeando la espora; Cx, corteza; Cry, cristal.

La lisis de la célula madre ocurre después de 60 h. En esta etapa, la espora y los cristales paraesporales quedan libres (figura 30), y las esporas presentan un gran exosporio. Destaca que alrededor de la mayoría de los cristales libres, exista una cubierta electrodensa de naturaleza desconocida (figura 31A), similar a la que presentaba *B. thuringiensis* serovar *kyushuensis* (Held *et al.* 1990), cuya cubierta estaba constituida por proteínas Cry. Otra posibilidad es que estas estructuras electrodensas correspondan a fibras de proteína que agrupan o envuelven a las diferentes inclusiones irregulares que conforman al cristal paraesporal, tal como se observó en *B. thuringiensis* serovar *israelensis* (Ibarra & Federici 1986). En la figura 31B, se muestra un cristal proteico rodeado por una envoltura electrodensa, en cuyo interior se encuentran agregadas al menos 5 inclusiones irregulares, las cuales conforman el cristal de Bt-EM14.



**Figura 31.** Micrografías electrónicas de transmisión de cristales libres de Bt-EM14. A) Cristal libre con cubiertas electrodensas señaladas por las flechas. B) Inclusiones irregulares cuya agregación conforma un cristal paraesporal, las cuales están señaladas por las flechas blancas. Junto con el cristal se observan todavía de los restos de la pared de la célula madre. La micrografía se tomó después de 66 h de incubación. En, Envoltura de especto fibroso que rodea el cristal paraesporal.

En la figura 32 se muestran micrografías que permiten contrastar la morfología de los cristales y esporas de Bt-EM14 y las de *B. thuringiensis* HD-1, cepa prototípica empleada por Bechtel & Bulla para su estudio del ciclo de esporulación. Bt-EM14 produce una o dos inclusiones de forma irregular, con caras redondeadas (Figuras 30 y 32A), mientras que, *B. thuringiensis* HD-1 produce un cristal bipiramidal o en forma de diamante (Figura 32B), aunque cabe mencionar que en la literatura existen reportes de subcultivos de HD-1 capaces de producir una segunda inclusión unida al cristal bipiramidal (Rojas-Avelizapa *et al.* 1999; Feng *et al.* 2001). Sin embargo, Bt-EM14 y *B. thuringiensis* HD-1 tienen esporas ovoidales, así como también un prominente exosporio.



**Figura 32.** A) Micrografía electrónica de transmisión del cristal irregular y de la espora madura de Bt-EM14 después de 60 h de incubación. B) Micrografía electrónica de transmisión del cristal bipiramidal y de la espora madura de *B. thuringiensis* HD-1 después de 36 h de incubación en medio líquido. PC, pared celular; Ex, Exosporium; Sp, espora madura; Cry, cristal parasporal.

### 5.17 Discusión General

Los datos recabados en la presente investigación sugieren que Bt-EM14 es una cepa de *B. thuringiensis*, debido a la síntesis de cristales proteicos parasporales, aunque de formas irregulares. La presencia de un cristal parasporal, junto con la observación de las etapas típicas de ciclo de esporulación vistas a través de microscopía electrónica de transmisión sustentan esta afirmación. Algunos autores, como Chen & Tsen (2002), consideran que el cristal parasporal es un criterio suficiente para clasificar nuevos aislados bacterianos como *B. thuringiensis*.

Por otra parte, Bt-EM14 presentó perfiles enzimáticos extracelulares y de asimilación de fuentes de carbono, similares a los encontrados en las cepas de *B. thuringiensis* usadas como referencia. En efecto, los resultados obtenidos descartan que se trate de una cepa de *B. anthracis*, ya que Bt-EM14 sintetiza hemolisinas, es móvil, resistente a la penicilina G, y no produjo mortandad en los ratones empleados en el ensayo de patogenicidad. No obstante, habría que agregar en éste último punto que sería necesario efectuar nuevas pruebas encaminadas a determinar si Bt-EM14 puede producir daño empleando otras condiciones de prueba. Se podrían emplear animales inmunosuprimidos, también habría que modificar la vía

de inoculación para determinar si ocurre algún daño tisular, tal como se observó en *B. thuringiensis* 97-27 (Hernández *et al.* 1998). Otros análisis recomendados serían la búsqueda de efecto citopático en extractos libres de células bacterianas, así como la detección de toxinas enterotóxicas por métodos inmunológicos y moleculares.

Es relevante mencionar que la presencia de una cápsula de PGA en Bt-EM14 sigue siendo un hecho intrigante, ya que esta estructura es típica pero no exclusiva de *B. anthracis*, ya que otras especies como *B. subtilis* y *B. licheniformis* también sintetizan éste polímero. Es posible que el origen de los genes responsables de la síntesis de la cápsula sea foráneo, tal como se sugirió en la cepa de *B. thuringiensis* serovar Monterrey BGSC 4AJI, en donde se encontraron genes similares a los portados en el plásmido pXO2 de *B. anthracis* (Cachat *et al.* 2008). Sin embargo, para comprobar tal hipótesis sería necesario el diseño de cebadores o *primers* adecuados, para efectuar la amplificación de tales genes a través de PCR.

Otro aspecto a averiguar sería la función de la cápsula en el ambiente original del microorganismo conocido como Pitch Lake, en Trinidad y Tobago. Dicho lago de brea es un ambiente propicio para el desarrollo de extremófilos, debido a las confluencia de altas concentraciones de hidrocarburos pesados y con presencia de lagunas cuya salinidad supera muchas veces el 7% de NaCl. En estas condiciones, la cápsula de Bt-EM14 podría permitirle a dicho microorganismo desarrollarse en estas condiciones de alta salinidad, presencia de hidrocarburos pesados y un ambiente bajo en nutrientes orgánicos (Schulze-Makuch *et al.* 2010). Cabe mencionar que Bt-EM14 no es la única cepa de *B. thuringiensis* encontrada en ambientes extremos, puesto que también se han aislado nuevas cepas en aguas y lodos termales a más de 60 °C en los Himalayas ( Alam *et al.* 2010).

Con respecto a la formación y desarrollo de la espora y el cristal de Bt-EM14, en el presente trabajo se realizó un estudio mediante microscopía electrónica, comparando cada uno de los estadios con el trabajo de Bechtel & Bulla (1976), quienes estudiaron la esporulación de *B. thuringiensis* HD-1, cepa de *B. thuringiensis* ampliamente estudiada. De éste modo se pudo observar que Bt-EM14 presenta los 7 estadios típicos del ciclo de esporulación, en donde la diferencia principal consiste en que el cristal paraesporal de Bt-EM14 comienza a sintetizarse

desde la etapa II, mientras que en *B. thuringiensis* HD-1 comienza a sintetizarse en la etapa III de su ciclo de esporulación.

Otro aspecto importante a destacar en Bt-EM14, es su potencial biotecnológico debido a las múltiples aplicaciones que tiene el PGA como agente quelante de metales pesados, emulsificante y floculante no tóxico, en las industrias alimenticias y farmacéutica (Ho *et al.* 2006). También es importante mencionar que Bt-EM14 presentó actividad contra el crecimiento de hongos fitopatógenos, y que sería interesante determinar en primera instancia el espectro de inhibición ante otros hongos; posteriormente podría determinarse el tipo de moléculas inhibitorias que produce.

En conclusión, los datos del presente trabajo sostienen que Bt-EM14 es una cepa capsulada de *B. thuringiensis*, con características más parecidas a las de *B. subtilis* que a las de *B. anthracis*.

## 6. CONCLUSIONES

- Tomando en cuenta la evidencia que proporciona la morfología colonial y microscópica, así como las pruebas bioquímicas, Bt-EM14 pertenece al grupo *B. cereus*.
- Bt-EM14 sintetiza una gran variedad de enzimas hidrolíticas extracelulares, cuyo perfil es similar a las de las cepas patrón de *B. thuringiensis* probadas en este trabajo. Tales enzimas podrían tener un aprovechamiento biotecnológico.
- La similitud fenotípica de Bt-EM14 con *B. anthracis*, se limita a la presencia de una cápsula de PGA. Por otra parte, Bt-EM14 se diferencia de las cepas típicas de *B. anthracis* por presentar movilidad, producir hemolisinas y ser resistente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.
- Bt-EM14 no parece ser un microorganismo patógeno primario, aunque para aclarar este punto deberían realizarse otras pruebas, para determinar si produce alguna toxina. También debería aclararse si se comporta como un patógeno oportunista.
- Bt-EM14 mostró un leve antagonismo contra el hongo filamentoso *Curvularia* sp.
- La cápsula de Bt-EM14 está constituida por un polímero de ácido glutámico (PGA).
- La cápsula de Bt-EM14 está unida de manera covalente a la pared celular. El PGA de la misma está altamente polimerizado y posee un alto peso molecular, dicho biopolímero forma filamentos que envuelven la pared celular del microorganismo.

- Los cristales proteicos de Bt-EM14 tienen un tamaño de alrededor de 1  $\mu\text{m}$  de largo, y su forma es irregular. La esporulación de esta bacteria se lleva a cabo antes de las 28 h, pero se autolisa hasta las 60 h.
- Debido a la presencia de cristales proteicos paraesporales y de una cápsula de PGA, Bt-EM14 es una inusual cepa de *B. thuringiensis*.

## **7. PERSPECTIVAS**

Como parte del seguimiento de este proyecto, se proponen los siguientes puntos.

- Realizar una tipificación serológica para determinar la serovariedad de Bt-EM14.
- Determinar la presencia de los genes cry responsables de la síntesis del cristal proteico paraesporal.
- Determinar la secuencia de aminoácidos de las proteínas que conforman el cristal paraesporal.
- Realizar la amplificación y secuenciación de la totalidad del gen completo 16S del rRNA para emprender estudios de filogenia molecular.
- Determinar a través la amplificación por PCR, la presencia de genes encargados de la síntesis de la cápsula, así como determinar si tales genes están presentes en plásmidos o en el cromosoma bacteriano.
- Determinar la presencia de posibles toxinas sintetizadas por Bt-EM14, a través de técnicas inmunológicas, moleculares y en cultivos de tejidos.
- Determinar la toxicidad de los cristales de Bt-EM14 en insectos de importancia fitosanitaria y biomédica.

## 8. BIBLIOGRAFIA

Agaisse, H., M. Gominet, O. A. Økstad, N. Gilois, V. Sanchis, A. B. Kolstø, & D. Lereclus. (1999). PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* **32**: 1043-1053.

Alam, S. I., S. Bansod, A. K. Goel & L. Singh. (2010). Characterization of an environmental strain of *Bacillus thuringiensis* from a hot spring in western Himalayas. *Curr. Microbiol.* **62**: 547-556.

Ankolekar, C., T. Rahmati & R. G. Labbé. (2009). Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice. *Int. J. Food. Microbiol.* **128**: 460-466.

Aronson, A. I., D. Wu & C. Zhang. (1995). Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. *J. Bacteriol.* **177**: 4059-4065.

Atlas, R. (2002). Responding to the threat of bioterrorism: a microbial ecology perspective – the case of anthrax. *Int. Microbiol.* **5**: 161-167.

Baumann, L., K. Okamoto, B. M. Unterman, M. J. Lynch & P. Baumann (1984). Phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus*. *J. Invertebr. Pathol.* **44**: 329-341.

Bavykin, S. G., Y. P. Lysov, V. Zakhariev, J. J. Kelly, J. Jackman, D. A. Stahl & A. Cherni. (2004). Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 3711-3730.

Beattie, S. H. & A. G. Williams. (1999). Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. With an improved cytotoxicity assay. *Lett. App. Microbiol.* **28**: 221-225.

Bechtel, B. D. & A. L. Bulla Jr. (1976). Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **127**: 1472-1481.

Black, G. E., A. P. Snyder & K. S. Heroux. (1997). Chemotaxonomic differentiation between *Bacillus cereus* group and *Bacillus subtilis* by phospholipid extracts analyzed with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods.* **28**: 187-199.

Boer, D., A. Sietske & D. Borge. (1991). On the safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* - a review. *App. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 1-4.

Bravo, A., A. Lorence & R. Quintero. (1992). Perspectivas en la utilización de *Bacillus thuringiensis* como bioinsecticida. *Biotecnología.* **2**: 139-153.

Cachat, E., M. Barker, T. D. Read and F. G. Priest. (2008). A *Bacillus thuringiensis* strain producing a polyglutamate capsule resembling that of *Bacillus anthracis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **285**: 220-226.

Candela, T. & A. Fouet. (2006). Poly-gamma-glutamate in bacteria. *Mol. Microbiol.* **60**: 1091-1098.

Candela, T., M. Mock & A. Fouet. (2005) CapE, a 47-amino-acid peptide, is necessary for *Bacillus anthracis* polyglutamate capsule synthesis. *J. Bacteriol.* **187**: 7765-7772.

Carmona, A. (2002). Aislamiento y caracterización parcial de una cepa de *Bacillus thuringiensis* tóxica a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae). *Bioagro.* **14**: 3-10.

Carrera, M., R. O. Zandomeni, J. Fitzgibbon & J. L. Sagripanti. (2006). Difference between the spore sizes of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species. *J. Appl. Microbiol.* **102**: 303-312.

Cedillo-Robles, M. S. (2000). Implementación de un método espectrofotométrico para la evaluación de queratinasa. Tesis profesional. ENCB-IPN.

Chen, M. L. & H. Y. Tsen. (2002). Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *J. Appl. Microbiol.* **92**: 912-919.

Chen, Y., F. C. Tenover, & T. M. Koehler. (2003).  $\beta$ -lactamase genes of penicillin-susceptible *Bacillus anthracis* strain. *J. Bacteriol.* **185**: 823-830.

Chen, Y., F. C. Tenover, & T. M. Koehler. (2004).  $\beta$ -lactamase gene expression in a penicillin-resistant *Bacillus anthracis* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 4873-4877.

Crisope, G. L., C. W. Fox & R. T. Marshall. (1976). Lecithin agar for detection of microbial phospholipases. *Appl. Environ. Microbiol.* **5**: 784-786.

Cruz-Camarillo, R., O. Sánchez-Pérez, N. G. Rojas-Avelizapa, M. Gómez-Ramírez & L. I. Rojas-Avelizapa. (2004). Chitosanase activity in *Bacillus thuringiensis*. *Folia Microbiol.* **49**: 94-96.

Daffonchio, D., A. Cheriff & S. Borin. (2000). Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S-23S internal transcribed spacers describe genetic relationships in the "Bacillus cereus group". *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5450-5468.

Debro, L. J., P. C. Fitz-James & A. Aronson. (1986). Two different parasporal inclusions are produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *finitimus*. *J. Bacteriol.* **165** : 258-268.

Dhawale, M. R., J. J. Whilson & G. G. Khachatourians (1982). Improved method for detection of starch hydrolysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 747-750.

Drobniewski, F.A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**: 324-338.

Ebrahimi, C., M. J. W. Kern, T. R. Sheen, M. A. Ebrahimi-Fardooee, N. M. van Sorge, O. Schneewind & K. S. Doran. (2009). Penetration of the blood-brain barrier by *Bacillus anthracis* requires the pXO1-encoded BsIA protein. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.00903-09.

Fedhila, S., P. Nel & D. Lereclus. (2002). The InhA2 metalloprotease of *Bacillus thuringiensis* strain 407 is required for pathogenicity in insects infected via oral route. *J. Bacteriol.* **184**: 3296-3304.

Felder, K. M., K. Hoelzle, M. M. Wittenbrink, M. Zeder, R. Ehricht & L. E. Hoelzle. (2009). A DNA microarray facilitates the diagnosis of *Bacillus anthracis* in environmental samples. *Let. Appl. Microbiol.* **11** :1-8.

Feng, K.- C., B.-L. Liu, H.-S. Chan & Y.-M. Tzeng. (2001). Morphology of a spectrum of parasporal edotoxin crystals from cultures of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* isolate A3-4. *World J. Microbiol. & Biotechnol.* **17**: 119-123.

Fiddler, R.M. (1977). Collaborative study of modified AOAC method of analysis for nitrite in meat and meat products. *J. AOAC* **60**: 594–599.

Finch, H. C. & A. N. Finch. (1985). Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina. 3ra edición. Editorial Trillas, México.

Ghelardi, E., F. Celandroni, S. Salvetti, E. Fiscarelli & S. Senesi. (2007). *Bacillus thuringiensis* pulmonary infection: critical role for bacterial membrane-damaging toxins and hosts neutrophils. *Microbes Infect.* **9**: 591-598.

Goodman, S. N., R. J. Gottfried & H. Rogoff. (1967). Biphasic system for separation of spores and crystal of *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **94**: 485.

Green, B. D., L. Battisti, T. M. Koehler, C. B. Thorne & B. E. Ivins. (1985). Demonstration of a capsule plasmid in *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* **49**: 291-297.

Güereca, A., A. Bravo & R. Quintero.(1994). Design of an aqueous two-phase system for the purification of ICP from *Bacillus thuringiensis*. *J. Process Biochem.* **29**:181-185.

Han, C. S., G. Xie, J. F. Challacombe, M. R. Alter, S. S. Botica, N. Brown, D. Bruce, C. S. Campbell, M. L. Campbell, J. Chen, O. Chertkov, C. Cleland, M. Dimitrijevic, N. A. Doggett, J. J. Fawcett, T. Glavina, L. A. Goodwin, L. D. Green, K. K. Hill, P. Hitchcock, P. J. Jackson, P. Keim, A. R. Kewalramani, J. Longmire, S. Lucas, S. Malfatti, K. McMurry, L. J. Meincke, M. Misra, B. L. Moseman, M. Mundt, A. C. Punk, R. T. Okinawa, B. Parson-Quintana, L. P. Reilly, P. Richardson, D. L. Robinson, E. Rubin, E. Saunders, R. Tapia, J. G. Tesmer, N. Thayer, L. S. Thompson, H. Tice, L. O. Ticknor, P. L. Wills, T. S. Brettin & P. Gilna. (2006). Pathogenomic sequense analysis of *Bacillus. cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **188**: 3382-3390.

Harley & Prescott. (2002). Laboratory exercises in microbiology. 5<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill Companies.

Heimbrook, M. E., W. L. L. Wang & G. Campbell. (1989). Staining bacterial flagella easy. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 2612-2615.

Held, G. A., C. Y. Kawanishi & Y.-S. Huang. (1990). Characterization of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*. *J. Microbiol.* **172**: 481-483.

Helgason, E., O. A. Okstad, D. A. Caugant, H. A. Johansen, A. Fouet, M. Mock, I. Hegna & A. B. Kolsto. (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* - One species on the basis of genetic evidence- *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2627-2630.

Hernández, E., F. Ramisse, T. Cruel, R. le Vagueresse & J. D. Cavallo. (1999). *Bacillus thuringiensis* serotype H34 isolated from human and insecticidal strains serotypes 3a3b and H14 can lead to death of immunocompetent mice after pulmonary infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **24**: 34-37.

Hernández, E., F. Ramisse, J. P. Ducoureau, T. Cruel & J. D. Cavallo. (1998). *Bacillus thuringiensis* subsp. *konkukian* (Serotype H34) superinfection: Case report and experimental evidence of pathogenicity in immunosuppressed mice. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2138-2139.

Ho, G.- H., T.- I. Ho, K. - H. Hsieh, Y.- C. Su, P.-Y. Lin, J. Yang, K.-H. Yang & S.- C. Yang. (2006).  $\gamma$ -Polyglutamic acid produced by *Bacillus subtilis* (natto): Structural characteristics, chemical properties and biological functionalities. *J. Chinese Chemical Society.* **53**: 1363-1384.

Höfte, H. & H. Whiteley. (1989). Insecticidal crystals proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**: 242-255.

Hoffmaster, A. R., J. Ravel, D. A. Rasko, G. D. Chapman, M. D. Chute, C. K. Marston, B. K. De, C. T. Sacchi, C. Fitzgerald, L. W. Mayer, M. C. J. Miaden, F. G. Priest, M. Barker, L. X. Jiang, R. Z. Cer, J. Rilstone, S. N. Peterson, R. S. Weyant, D. R. Galloway, T. D. Read, T. Popovic, & C. M. Fraser. (2004). Identification of anthrax toxin genes in *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**: 8449-8454.

Hubbel, D. H., V. M. Morales & M. Umali-García. (1978). Pectinolytic enzymes in *Rhizobium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 210-213.

Ibarra, J. E. & B. A. Federici. (1986). Isolation of a relatively nontoxic 65-kilodalton protein inclusion from parasporal body of *Bacillus thuringiensis* susp. *israelensis*. *J. Bacteriol.* **165**: 527-533.

Kambourova, M., M. Tangney & F. G. Priest. (2001). Regulation of polyglutamic acid synthesis by glutamate in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1004-1007

Kaur, M., K. K. Tripathi, M. Gupta, P. K. Jain, M. R. Bansai & K. G. Gupta. (1988). Production and partial characterization of elastase of *Bacillus subtilis*, isolated from the cervixes of human females. *Can. J. Microbiol.* **34**: 855-859.

Keshavarzi, M., H. Salimi & F. Mirzananadi. (2005). Biochemical and physical requirements of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* for high biomass yield production. *J. Agric. Sci. Technol.* **7**: 41-47.

Kimura, K., L. S. P. Tran, I. Uchida & Y. Itoh. (2004). Characterization of *Bacillus subtilis*  $\gamma$ -glutamyltransferase and its involvement in the degradation of capsule poly- $\gamma$ -glutamate. *Microbiology.* **150**: 4115-4123.

Klee, S. R., M. Özel, B. Appel, C. Boesch, H. Ellerbrok, D. Jacob, G. Holland, F. H. Leendertz, G. Pauli, R. Grunow & H. Nattermann. (2006). Characterization of *Bacillus anthracis*-like bacteria isolated from wild great apes from Côte d'Ivoire and Cameroon. *J. Bacteriol.* **188**: 5333-5344.

Klee, R. S., E. B. Brzuszkiewicz, H. Nattermann, H. Brüggemann, S. Dupke, A. Wolherr, T. Franz, G. Pauli, B. Appel, W. Liebl, E. Couacy-Hymann, C. Boesch, F. D. Meyer, F. H. Leendertz, H. Ellerbrok, G. Gottschalk, R. Grunow & H. Liesegang. (2010). The genome of *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. *PLoS ONE* **5**: e10986.

Knowles, B. (1994). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxin. *Adv. Insect. Physiol.* **24**: 275-308.

Lachica, R. V. F., C. Genigiogis & N. Hoeprich (1971). Metachromatic agar-diffusion method for detection staphylococcal nuclease activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **12**: 1367-1380.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Lechner, S., R. Mayr, K. P. Francis, B M. Pruss, T. Kaplan, E. Wiebner-Gunkel, G. S. Stewart & S. Scherer. (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. Is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *J. Syst. Bacteriol.* **48**: 1373-1362.

Liang, X. & D. Yu. (1999) Identification of *Bacillus anthracis* strains in China. *J. Appl. Microbiol.* **87**: 200-203.

Logan N. A., T. Popovic & A. Hoffmaster. (2007). *Bacillus* and other aerobic endospore-forming bacteria. In Manual of Clinical Microbiology. 9<sup>th</sup> ed. ASM-Press. 455-473.

López, D., H. Vlamakis & R. Kolter. (2009). Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**: 152-163.

López-Meza J., & J. Ibarra (1996). Characterization of a Novel Strain of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1306-1310.

Manocha, B., & A. Margaritis. (2010). A novel Method for selective recovery and purification of  $\gamma$ -polyglutamic acid from *Bacillus licheniformis* fermentation broth. *Biotechnol. Prog.* **26**: 734-742.

Margulis, L., J. Z. Jorgensen, S. Dolan, R. Kolchinsky, F. A. Rainey & S.C. Lo. (1998). The *Arthromitus* stage of *Bacillus cereus*: Intestinal symbionts of animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**: 1236-1241.

Mc Faddin, J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana 1984. México D.F.

McLean. R. J., D. Beauchemin, L. Chapham, & T. J. Beveridge (1990). Metal-binding characteristics of the gamma-glutamyl capsular polymer of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3671-3677.

Mendoza-Gamboa, E. K. (2007). Estudio del aislado *Bacillus subtilis* DAF-1. Su perfil exoenzimático y su acción antibiótica. Tesis de Maestría. ENCB-IPN

Mesnager, S., E. Tosi-Couture, P. Gounon, M. Mock & A. Fouet. (1998). The capsule and S-layer: Two independent and yet compatible macromolecular structures in *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **180** : 52-58.

Mock, M. & A. Fouet. (2001). Anthrax. *Ann. Rev. Microbiol.* **55**: 647-671.

Morikawa, M., S. Kagihiro, M. Haruki, K. Takano, S. Branda, R. Kolter & S. Kanaya. (2006). Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces  $\gamma$ -polyglutamate. *Microbiol.* **152**: 2801-2807.

Nakamura, L. K. (1998). *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *J. Syst. Bacteriol.* **48**: 1031-1035.

Nava-Fonseca, M. R. (1995). El perfil de enzimas extracelulares como criterio coadyuvante en la identificación de cepas de *Serratia marcescens*. Tesis profesional. ENCB-IPN.

Niskanen, A., T. Kiutumo, S. Raisen & S. Raevouri (1978). Determination of fatty acid compositions of *Bacillus cereus* and related bacteria: a rapid gas chromatographic method using a glass capillary column. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 453-455.

O'Brien, M., & G. H. Davis. (1982). Enzymatic profile of "*Pseudomonas maltophilia*" *J. Clin. Microbiol.* **16**: 417-421.

Økstad, O. A., M. Gominet, B. Purnelle, M. Rose, D. Lereclus & A. B. Kolsto. (1999). Sequence analysis of three *Bacillus cereus* loci carrying PlcR-regulated genes encoding degradative enzymes and enterotoxin. *Microbiology* **145**: 3129-3138.

Osera, C., G. Amati, C. Calvio & A. Galizzi. (2009). SwrAA activates poly- $\gamma$ -glutamate synthesis in addition to swarming in *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol.* **155**: 2282-2287.

Poincelot, R. P. & P. R. Day. (1972) Simple dye release assay for determining cellulolytic activity of fungi. *Appl. Microbiol.* **23**: 875-879.

Raddadi, N., A. Cherif, D. Mora, L. Brusetti, S. Borin, A. Boudabous & D. Daffoncio. (2005). The autolytic phenotype of the *Bacillus cereus* group. *J. Appl. Microbiol.* **99**: 1070-1081.

Rampersad, J. & D. Amons (2002). Usefulness of staining paraesporal bodies when screening for *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **79**: 203-204.

Rampersad, J. & D. R. Ammons. (2005). A *Bacillus thuringiensis* isolation method utilizing a novel stain, low selection and high throughput produced atypical results. *BMC Microbiol.* **5**: 1-11.

Rasko, D. A., M. R. Alter, C. S. Han, & J. Ravel. (2005). Genomics of the *Bacillus* group of organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 303-329.

Redmond, C., L. W. J. Baillie, S. Hibbs, A. J. G. Moir & A. Moir. (2004). Identification of proteins in the exosporium of *Bacillus anthracis*. *Microbiology*. **150**: 355-363.

Rojas-Avelizapa, L. I., R. Cruz Camarillo, M. I. Guerrero, R. Rodríguez Vázquez, y J. E. Ibarra. (1999). Selection and characterization of a proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**: 261-268.

Rosas-García, N. M., A. Sánchez-Varela & J. M. Villegas- Mendoza. (2009). Biochemical and molecular characterization of  $\delta$ -endotoxins in *Bacillus thuringiensis*. *Folia Microbiol.* **54**: 487-492.

Sacchi, C. T., A. M. Whitney, L. W. Mayer, R. Morey, A. Steigerwalt, A. Boras, R. S. Weyant & T. Popovic. (2002). Sequencing of 16S rRNA Gene: A rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 117-1123.

Saile, E. & T. M. Koehler. (2006). *Bacillus anthracis* Multiplication, persistence, and genetic exchange in the rhizosphere of grass plants. *App. Environ. Microbiol.* **72**: 3168-3174.

Sauka, D. H. & G. B. Benintende. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Rev. Argent. Microbiol.* **40**: 124-140.

Schnepf, H. E. & H. R. Whiteley (1985). Protein toxins of Bacilli. En J. A. Hoch & P. Setlow (ed), *Molecular biology of microbial differentiation*. American Society for Microbiology, Washington, D. C. pp. 209-216.

Schulze-Makuch, D., S. Haque, M. R. de Sousa-Antonio, D. Ali, R. Hosein, Y. C. Song, J. Yang, E. Zaikova, D. M. Beckles, E. Guinan, H. J. Lehto & S. J. Hallam. (2010). Microbial life in a liquid asphalt desert. Cornell University Library, U. S. A.

Sevapandiyan, A., N. Arora, R. Rajagopal, S. K. Jalali, S. P. Singh & R. K. Bhatnaga. (2001). Toxicity analysis of N- and C- terminus-deleted vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5855-5858.

Shih, I. L., & Y.T. Van (2001). The production of poly-(gamma-glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresour. Technol.* **79**: 207-225.

Soberón, M. & A. Bravo (2003). *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas. Instituto de Biotecnología. UNAM.

Sue, D., A. R. Hoffmaster, T. Popovic & P. P. Wilkins. (2006). Capsule production in *Bacillus cereus* strains associated with severe pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 3426-3428.

Tamez-G., P., M. M. Iracheta, B. Pereyra A., L. J. Galán-W., R. Gómez-F., R. S. Tamez-G. & C. Rodríguez-P. (2007). Caracterización de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para larvas de lepidópteros y coleópteros. *Ciencia UANL.* **8**: 477-482.

Turnbull, P. C. B. (1999). Definitive identification of *Bacillus anthracis*. A review. *J. Appl. Microbiol.* **87**: 237-240.

Turnbull, P. Ed. Chief. (2008). Anthrax in humans and animals. 4<sup>th</sup> ed. WHO. U.K.

Ventura-Suárez, A. (2007). Caracterización morfológica y genética de la cepa Bt1-88. Tesis de Maestría. ENCB-IPN.

Ventura-Suárez, A., R. Cruz-Camarillo, J. Rampersad, D. R. Ammons, E. O. López-Villegas, J. E. Ibarra, L. I. Rojas-Avelizapa. (2011). Characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* phenotype possessing multiple appendages attached to a parasporal body. *Curr. Microbiol.* **62**: 307- 312.

Vila-Bôas, G. T., A. P. S. Peruca, & O. M. N. Arantes. (2007). Taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can. J. Microbiol.* **53**: 673-687.

Welkos S. L., R.W. Trotter, D. M. Becker, & G. O. Nelson (1989). Resistance to the Sterne strain of *Bacillus anthracis*: phagocytic cell responses of resistant and susceptible mice. *Microb. Pathog.* **7**: 15-35.

Woeste, S. & P. Demchick. (1991). New versión of negative stain. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1958-1859.

Yamaguhi, F., Y. Ogawa, M. Kikuchi, K. Yuasa & H. Motai. (1996). Detection of  $\gamma$ -polyglutamic acid ( $\gamma$ -PGA) by SDS-PAGE. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**: 255-258.

Zhang, M. Y., A. Lövgren, M. G. Low & R. Landén (1993). Characterization of an avirulent pleiotropic mutant of the insect pathogen *Bacillus thuringiensis*: reduced expression of flagellin and phospholipases. *Infect. Immun.* **61**: 4947-4954.

## 8.1 Manuales y páginas electrónicas

Manual Bioxon de Medios de Cultivo. (1982) Publicado por Beckton Dickinson de México.

Todar, K. Online Textbook of Bacteriology developed by University of Wisconsin.

En <http://www.textbookofbacteriology.net/> Revisado el 7 de Abril del 2011.

United States of America Environmental Protection Agency. *Bacillus mycoides* isolate J (006516) Fact Sheet.

[http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet\\_006516.htm](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006516.htm).

Revisado el 4 de Julio del 2009.

## **9. APENDICE DE COLORANTES**

### **1) Tinción de Ryu para la observación de flagelos**

#### Solución I

Preparar 10 mL de solución acuosa de fenol al 5%. Posteriormente agregar 2 g de ácido tánico y 10 mL de una solución saturada de  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$  dodecahidratado, preparada al momento.

#### Solución II

Cristal violeta al 12% en etanol al 96%.

#### **Solución final**

Para preparar la solución final se mezcla un 1 mL de la solución II con 10 mL de la solución I. Posteriormente se recomienda filtrar la mezcla mediante una membrana Millipore. El colorante se guarda en frasco ámbar, y es estable por 2 meses a temperatura ambiente.

Tomado de: Heimbrook *et al.* 1989

### **2) Azul de metileno policrómico para la tinción de cápsulas de PGA (Reacción de MacFaydean).**

Disolver 0.2 g de azul de metileno en 10 mL de etanol absoluto. Después la solución alcohólica se mezcla con 90 mL de una solución acuosa al 1% de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . Posteriormente el colorante se filtra a con una membrana Millipore. El colorante se guarda en frasco ámbar, es estable por 2 meses a temperatura ambiente y 6 meses en condiciones de refrigeración.

Tomado de: Turnbull, 2008.

### **3) Preparación del colorante azul de Toluidina para la observación de cortes semifinos**

Se disuelva 1 g de bórax (tetraborato de sodio), en 100 mL de agua caliente. Después se enfría un poco y se agrega poco a poco 0.5 g de colorante azul de Toluidina sin dejar de agitar hasta deshacer los grumos. Una vez disuelta, la mezcla se filtra con una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  o con papel filtro. El colorante se guarda a temperatura ambiente.