

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas



**Aislamiento, purificación y  
caracterización de la estructura proteica  
paraesporal asociada a apéndices  
presentes en la cepa Bt1-88**

**T E S I S**

**QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS**

**P R E S E N T A**

**M. en C. ANTONIO VENTURA SUAREZ**

**DIRECTORES**

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

Julio de 2011



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 11:00 horas del día 20 del mes de Junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la 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:

### **Aislamiento, purificación y caracterización de la estructura proteica paraesporal asociada a apéndices presentes en la cepa Bt1-88**

Presentada por el alumno:

**Ventura**

Apellido paterno

**Suarez**

Apellido materno

**Antonio**

Nombre(s)

Con registro:

B	0	7	1	0	5	7
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Ciencias Quimicobiológicas

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

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

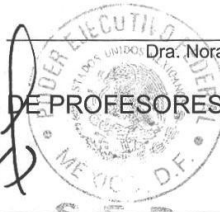
Dra. Luz Irene Rojas Avelizapa

Dr. Ramón Cruz Camarillo

Dr. Cutberto José Juvencio Galindez Mayer

Dr. Edgar Oliver López Villegas

Dra. Enriqueta Feliciano Amora Lazcano

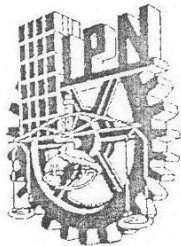


Dra. Nora Ruiz Ordaz

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Manuel Jesús Piñón López

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas  
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación





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

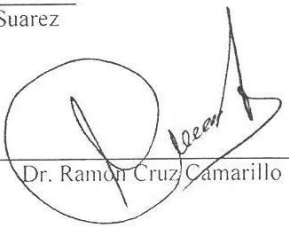
**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México, D.F. el día 20 del mes junio del año 2011, el que suscribe alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias Quimicobiológicas con número de registro B071057, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Luz Irene Rojas Avelizapa y el Dr. Ramón Cruz Camarillo y ceden los derechos del trabajo intitulado **“Aislamiento, purificación y caracterización de la estructura proteica paraesporal asociada a apéndices presentes en la cepa Bt1-88”** 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 [luzirenemx@hotmail.com](mailto:luzirenemx@hotmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
M. en C. Antonio Ventura Suarez

  
Dra. Luz Irene Rojas Avelizapa

  
Dr. Ramón Cruz Camarillo

# Characterization of a Novel *Bacillus thuringiensis* Phenotype Possessing Multiple Appendages Attached to a Parasporal Body

Antonio Ventura-Suárez · Ramón Cruz-Camarillo ·  
Joanne Rampersad · David R. Ammons · Edgar O. López-Villegas ·  
Jorge E. Ibarra · Luz I. Rojas-Avelizapa

Received: 24 March 2010 / Accepted: 10 May 2010 / Published online: 18 July 2010  
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

**Abstract** *Bacillus thuringiensis* is a bacterium best known for its production of crystal-like bodies comprised of one or more Cry-proteins, which can be toxic to insects, nematodes or cancer cells. Although strains of *B. thuringiensis* have occasionally been observed with filamentous appendages attached to their spores, appendages in association with their parasporal bodies are extremely rare. Herein we report the characterization of Bt1-88, a bacterial strain isolated from the Caribbean that produces a spore–crystal complex containing six long appendages, each comprised of numerous thinner filaments approximately 10 nm in diameter and 2.5 µm in length. Each of the multi-filament appendages was attached to a single, small parasporal body located at one end of the bacterial spore. Biochemical tests, 16S rDNA gene sequencing, and the identification of two Cry proteins by partial protein sequencing (putatively Cry1A and Cry2A), unambiguously

identified Bt1-88 as a strain of *B. thuringiensis*. Bt1-88 represents the second reported strain of *B. thuringiensis* possessing a parasporal body/appendage phenotype characterized by one or more long appendages, comprised of numerous filaments in association with a parasporal body. This finding suggests that Bt1-88 is a member of a new phenotypic class of *B. thuringiensis*, in which the parasporal body may perform a novel structural role through its association with multi-filament appendages.

## Introduction

*Bacillus thuringiensis* is an environmental bacterium, that has been readily recovered from diverse environments throughout the world, including the phylloplane, soil, insects, animals, and aquatic environments [1]. However, the specific natural habitat of *B. thuringiensis* has not been precisely determined, and in many cases its presence in any particular environment may be merely transient. The most peculiar morphological feature of *B. thuringiensis* is the presence of crystalline inclusions (parasporal bodies) formed during the sporulation process. These are comprised of proteins called for this reason Cry proteins, which have been classified in 59 groups according with their amino acid sequences [2]. Although different Cry proteins have demonstrable toxicity against insects, nematodes, or even human cancer cells [3], there is little evidence that the natural role of Cry toxins in nature is to kill these insects and cell types. Thus, *B. thuringiensis*, with its diverse family of Cry proteins, represents one of the microbial world's most scientifically enigmatic and fascinating organisms.

Previously, a novel strain of *B. thuringiensis* was reported (Bt2-56) that showed a long multi-filament appendage, associated with a large parasporal body held

---

A. Ventura-Suárez · R. Cruz-Camarillo ·  
L. I. Rojas-Avelizapa (✉)  
Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias  
Biológicas del I.P.N, Carpio y Plan de Ayala S/N,  
Casco de Santo Tomas, Mexico DF 11340, Mexico  
e-mail: luzirenemx@hotmail.com

E. O. López-Villegas  
Central de Microscopía, Escuela Nacional de Ciencias  
Biológicas del I.P.N, Carpio y Plan de Ayala S/N,  
Casco de Santo Tomas, Mexico DF 11340, Mexico

J. Rampersad · D. R. Ammons  
Department of Chemistry, University of Texas–Pan American,  
1201 West University Drive, Edinburg, TX 78539, USA

J. E. Ibarra  
Laboratorio de Bioinsecticidas, CINVESTAV-Irapuato. Km 9.6  
Lib. Norte Carretera Irapuato-León, Irapuato, Guanajuato 36500,  
Mexico

within the exosporium [4]. Spore-associate appendages have been reported before for *B. thuringiensis* [5] and the closely related *B. cereus* [6–8], however, these appendages were not in association with parasporal bodies and had, in general, different morphological features, being described as ribbon-like [9], tubular [10–12], or feather and pin-like [10]. Discovered along with Bt2-56 was a second strain (Bt1-88) that formed a spore, also with a parasporal body/appendage phenotype [13]. However, due to the relatively small size of the parasporal body, lack of demonstrable toxicity or presence of *cry* genes, it was uncertain if Bt1-88 was a strain of *B. thuringiensis*. Presented herein is a detailed characterization of Bt1-88, showing substantial evidence that Bt1-88 is a novel phenotype of *B. thuringiensis*, with an arrangement of six filamentous appendages rooted in a small parasporal body.

## Materials and Methods

### Bt1-88

Bt1-88 was isolated from the island of Trinidad [13], from dirt taken from a rural field where goats were sometimes left to graze.

### Substrate Metabolic Profile

A carbohydrate metabolism profile of Bt1-88 was determined using an API 50 CH carbohydrate metabolism panel (bioMérieux), according to manufacturer's instructions for the identification of *Bacillus* species.

### Amplification and Sequencing of 16S rDNA

Genomic DNA was extracted from Bt1-88 [14] and used to amplify 16S rDNA [15]. Sequence was determined at the sequencing facilities of LANGEBIO-CINVESTAV Irapuato (Guanajuato, Mexico). Revision and editing of the sequence were performed with the BioEdit software [16]. The Molecular Evolutionary Genetics Analysis program MEGA4 [17] was used to align sequences using Clustal W [18], create Neighbor-Joining dendrograms [19], and determine confidence levels based on a bootstrap analysis of 1,000 replications [20]. Other 16S rDNA sequences were used in analyses, obtained from Genbank using the BLAST utility [21] available through NCBI.

### Purification of Parasporal Body and Appendages

Thirty petri dishes containing a lawn of Bt1-88 were cultured at 28°C on G medium until autolysis. Spores were washed from the dishes with distilled water, concentrated

by centrifugation for 15 min at 4,900×g, followed by three additional washes of the pellet in 15 ml distilled water. The pellet was then suspended in 5 ml distilled water and sonicated for 22.5 min at 4°C, using a 20 kHz Ultrasonic Homogenizer, operated at 35% strength, applying alternate pulses of 9.9 s of sonication and 5 s of cooling. This procedure allowed the separation of the parasporal body with the attached filaments of various lengths, from the spore. Free filaments (presumably broken from the parasporal body) were purified by centrifugation of the sonicated solution at 5,900×g for 15 min. The parasporal body/appendage complex was purified from the resulting pellet by re-suspending the pellet in 4 ml distilled water, followed by ultracentrifugation at 71,142×g for 1 h at 4°C in a sucrose gradient generated by adding equal volumes of a sucrose solution at the following percentages: 79, 75, 67, 63, and 59%. The parasporal body/appendage complex was recovered from the interphase between the 75 and 67% sucrose solutions, washed three times by successive suspension in 1 ml of distilled water and centrifugation at 4,900×g for 15 min and frozen at –20°C until use.

### Protein Sequencing

Proteins from purified parasporal body/appendage complexes were solubilized and size-separated by 10% SDS-PAGE [22]. Major protein bands were subjected to automated Edman-based N-terminal protein sequencing by the Protein Analysis Facility, Institute for Cellular and Molecular Biology, University of Texas, Austin, TX, USA.

### Transmission Electron Microscopy

Bt1-88 was cultured for 30 h with agitation (180 rpm) in liquid G-medium at 28°C and pelleted by centrifugation at 6,740×g for 5 min. The resulting pellet was fixed in 3% glutaraldehyde/0.1 M phosphate buffer (pH 7) for 2 h, washed twice in 0.1 M phosphate buffer (pH 7, containing 10% sucrose and 0.004% CaCl<sub>2</sub>), post-fixed (2 h) with osmium tetroxide diluted to 1% with distilled water (unbuffered), then washed three times as above. Dehydration was achieved through successive 10 min incubations in ethanol at 10% increments from 50 to 100%. The sample was then incubated for 30 min each in ethanol-propylene oxide mixtures of 1:2, 1:1, 2:1, and lastly pure propylene oxide, after which the sample was incubated for 4 h each in EMBED812 resin (Electron Science Microscopy) with propylene oxide mixtures of 1:2, 1:1, and 2:1. The sample was then placed in pure resin and hardened at 60°C for 24 h. Ultrathin sections (60–70 nm) of the embedded sample were made with a diamond knife, placed on copper grids and contrasted for 20 min each in 4% uranyl acetate, and Reynolds lead citrate [23].

Negative staining was performed by culturing Bt1-88 on a G-medium agar plate at 28°C for 72 h. Then, a loopfull of the autolyzed cells was gently suspended in 1 ml distilled water. A drop of the spore suspension was placed on a formvar-coated copper grid and air-dried for 20 min to allow spores to adhere. The grid was then covered for 20 s with a solution of 0.5% uranyl acetate, the excess liquid was removed with a filter paper, and then air-dried. A JEOL JEM-1010 transmission electron microscope, operated at 60 kV, was used to observe and photograph both thin sections and negatively stained preparations.

## Results

### Electron Microscopy

Electron Microscopy revealed that Bt1-88 produces spores containing a very small parasporal body ( $479 \pm 67.5$  nm), from which six long appendages emerge (Figs. 1, 2a, c). Each appendage appears like a bundle of numerous thin filaments, each  $10.28 \pm 1.72$  nm wide (Fig. 2a, c, d). The filaments were observed to lie parallel to one another, and appeared soft and flexible (Fig. 2c). Under vigorous agitation, filaments were observed to both break and unbundle, moving freely from one another (Fig. 2a, b). Parasporal bodies, released from the spore by sonication, remained attached to their appendages, showing more clearly a hexagonal arrangement of the appendages at each vertex, forming what appeared to be a small hole at the center (Fig. 2c).

### Metabolic Profile

Bt1-88 fermented 13 carbohydrates out of the 49 included in the API 50 CH carbohydrate metabolism strip: *N*-acetyl-

*D*-glucosamine, cellobiose, maltose, *D*-fructose, *D*-glucose, *D*-ribose, starch, sculine, salicin, sucrose, trehalose, glycogen (weak), arbutine (weak). These results identified Bt1-88 as a *B. thuringiensis*/*B. cereus* species, according to the manufacturer's dataset.

### 16S rDNA Sequence Analysis

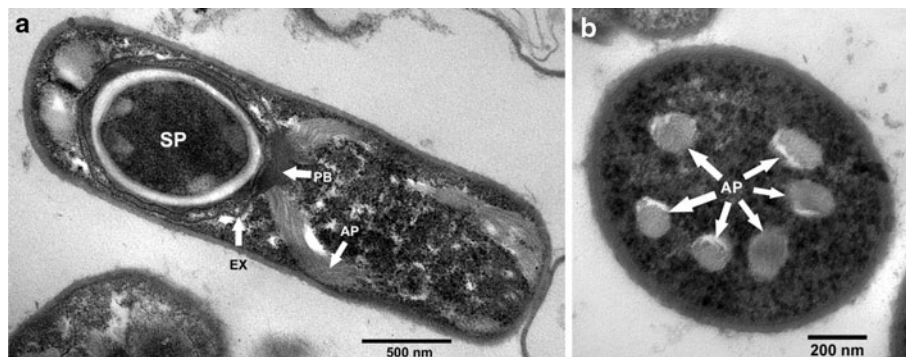
The 1,400 bp of the 16S rDNA from Bt1-88 was compared phylogenetically with the corresponding DNA sequences of *B. cereus*, *B. thuringiensis*, and other *Bacillus* species, indicating that Bt1-88 is indistinguishable from *B. cereus*/*B. thuringiensis* isolates (Fig. 3).

### Protein Sequencing

Proteins associated with purified parasporal body/appendages complexes (Fig. 2c) were resolved by SDS-PAGE, revealing three prominent protein bands of ca. 140, 60, and 31 kDa (Fig. 4). These were subjected to Edman-based N-terminal protein sequencing. The ca. 140 kDa protein showed the sequence MDNNPNINEVIPYN that was 92% identical to a Cry1A protein; the ca. 60 kDa protein showed the sequence MNVLNSGRITISDAYNVVAH-DRYAG which was 90% identical to a Cry2A protein; and the ca. 31 kDa protein showed the sequence MDTNNEFNPIANMIDLVN which showed no obvious identity with any known bacterial proteins.

## Discussion

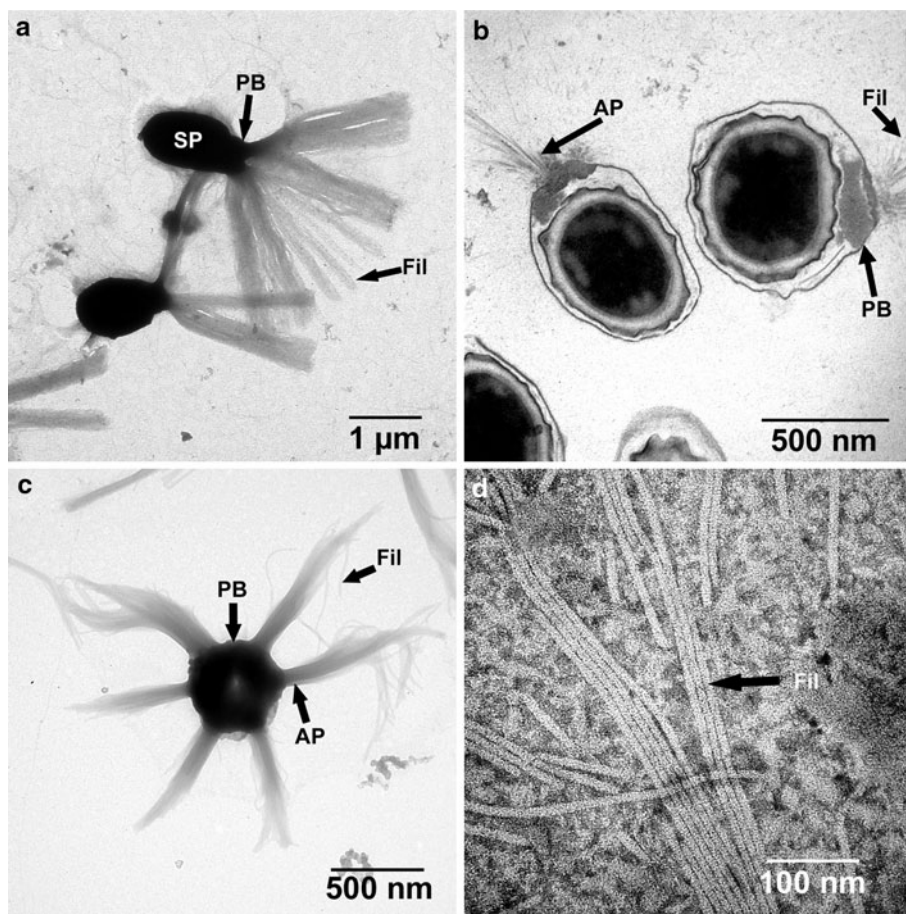
*B. thuringiensis* remains one of the microbial world's most enigmatic organisms. Although best known for its Cry family of related protein toxins, the role of these toxins, as well as the ecology of *B. thuringiensis* itself, remains



**Fig. 1** TEM micrographs of *Bacillus thuringiensis* Bt1-88 mature sporangia. **a** longitudinal thin section of a mature sporangium, showing the typical terminal spore (SP), surrounded by the thin exosporium (EX). A small, dense parasporal body (PB) is attached to

the exosporial membrane. From the parasporal body two groups of filamentous appendages (AP) are seen, projected toward the opposite end. In **b** a cross section of a mature sporangium is showing the tubular nature of the six appendages (AP)

**Fig. 2** **a** TEM negative stain, showing the spore (SP) closely attached to the parasporal body (PB) from which emerge multiple thin filaments (Fil). **b** TEM micrograph showing the close association of the parasporal body to the exosporial membrane and the multiple filaments (Fil) that comprise the appendages (AP). **c** TEM micrograph showing the novel hexagonal shape of an isolated, negative-stained parasporal body (PB), separated from the spore by sonication. The nascent portion of the six filaments can be seen attached to the six vertices of the parasporal body. **d** Negative stain of the long, tubular isolated filaments (Fil) demonstrating their size and relative uniformity



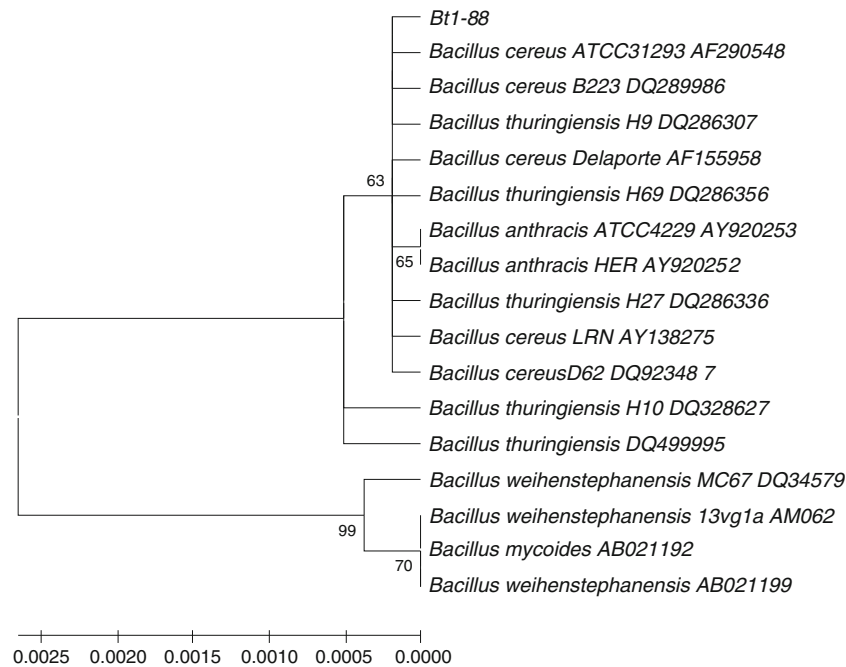
uncertain. The recent discovery of two novel bacterial isolates (Bt1-88 and Bt2-56) with parasporal bodies associated with one or more appendages [13], suggested the existence of a new class of *B. thuringiensis* in which the parasporal body works as an anchoring structure to hold the filaments attached to the spore. However, due to a very small parasporal body ( $479 \pm 67.5$  nm) and the lack of evidence for either Cry proteins or toxic activity, it was uncertain if Bt1-88 was in fact a *B. thuringiensis*. The work presented in this report answered this question, and provided a more detailed characterization of the parasporal body/appendage complex.

Considering the morphological similarities between the appendages in Bt1-88 and the one reported previously in Bt2-56, the question of a common molecular composition arose. However, little evidence was found to support this. For example, the size of the major proteins reported for the parasporal body/appendages of Bt2-56 (ca. 92, 55, and 51 kDa), [24] are significantly different from those found in Bt1-88. Similarly, there are differences in the details of the respective structures. The parasporal body in Bt2-56 was reported to be significantly larger, and the single appendage much longer, but still forming a bundle of thin

filaments. Despite these differences, the appendages in both isolates are in association with a parasporal body and are comprised of numerous filaments that can unbundled from the appendage to be loosely displayed (Fig. 2d) This may suggest that the presence of these loosely held filaments could be involved in a substrate attachment function.

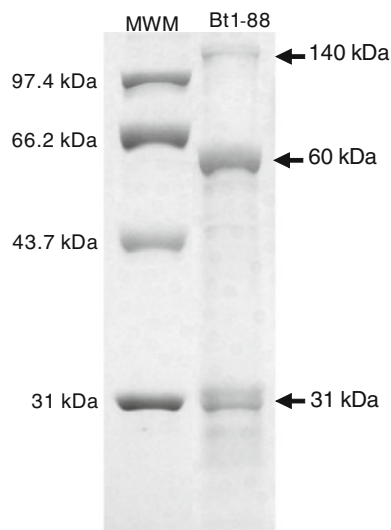
Our inability to separate the appendages from the parasporal body by sonication suggests that proteins in the parasporal body are intimately related to the appendages and may hold the individual filaments together, thereby forming the appendage. This raises the hypothesis about a possible origin of the parasporal bodies and the Cry proteins in *B. thuringiensis*, as a structural anchor for the filaments.

Evidence on the nature of the proteins constituting the parasporal body-appendages complex was obtained by SDS-PAGE and N-sequencing analyses of the major components. The identification of ca. 140 and ca. 60 kDa proteins as a Cry1A-like and a Cry2A-like proteins, respectively, indicated the likely composition of the parasporal body, similar to many other *B. thuringiensis* strains. This finding also corroborates that Bt1-88 is a strain of *B. thuringiensis*, as established by the 16S rDNA



**Fig. 3** A neighbor-joining tree generated from the 16S rDNA sequence of Bt1-88 and representatives of five bacterial species belonging to the *B. cereus sensu lato* family of closely related bacteria. Numbers presented at each branch indicate confidence values based on 1,000 bootstrap replications. Consistent with other data identifying Bt1-88 as *B. thuringiensis*, 16S rDNA sequence from

Bt1-88 was phylogenetically indistinguishable from that of other *B. thuringiensis/cereus* strains, thereby identifying Bt1-88 phylogenetically to this *B. cereus sensu lato* sub-group. 16S rDNA sequence of *B. mycooides* and *B. weihenstephanensis*, although highly related to Bt1-88, were clearly more divergent



**Fig. 4** A composite image of two SDS-PAGE gel lanes, showing the three major proteins comprising purified parasporal bodies with attached filamentous appendages (as in Fig. 2c). Bands of ca. 140 kDa and ca. 60 kDa were identified (see text) as Cry1A- and Cry2A-like proteins, respectively, which presumably comprise the small parasporal body. The ca. 31 kDa band lacked protein sequence homology to any known proteins (see text), suggesting that it originates from the novel filamentous appendage. *MWM* molecular weight markers

sequence analysis and the carbohydrate metabolism profile. A third major component of the parasporal body-appendages complex was a ca. 31 kDa protein, whose N-terminal sequence analysis showed no significant match to any other known protein. This may be the main component of the appendage filaments; however, further studies are required to associate this (and the other proteins) to a specific structure. Also, in spite of the preliminary identification of the Cry1A- and Cry2A-like proteins, proper cloning and sequencing of the complete genes are required, which may render important information about the crystal-filament association.

In conclusion, in spite of its peculiarities, significant evidence has been obtained to properly identify Bt1-88 as a strain of *B. thuringiensis*. Also, the peculiar six appendages attached to the parasporal body, similar to bundles of fine filaments, may indicate that this strain, as well as another one reported earlier [4], may constitute a new phenotype of the species. Furthermore, this peculiar arrangement may clarify a possible evolutionary origin for the parasporal body of *B. thuringiensis*.

**Acknowledgments** LIRA and RCC thanks financial support for this research, from Secretaría de Investigación y Posgrado, Instituto Politécnico Nacional, through grants SIP 20070722, SIP 20082599

and SIP 20090912. AVS was supported by scholarships from CONACYT and PIFI. LIRA and RCC are recipients of CONACYT, COFAA and EDI fellowships. JNR thanks the Faculty Research Council at the University of Texas- Pan American for financial support of work described in this Report. We would like to acknowledge the technical assistance of Dr. Klaus Linse, University of Texas, Austin, in performing N-terminal protein sequencing.

## References

1. Chaufax J, Marchal M, Gilois N, Jehanno I, Buisson C (1997) Investigation of natural strains of *Bacillus thuringiensis* in different biotypes throughout the world. *Can J Microbiol* 43: 337–343
2. Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Dean DH (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:807–813
3. Akiba T, Abe Y, Kitada S, Kusaka Y, Ito A, Ichimatsu T, Katayama H, Akao T, Higuchi K, Mizuki E, Ohba M, Kanai R, Harata K (2009) Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells. *J Mol Biol* 386:121–133
4. Rampersad J, Khan A, Ammons D (2003) A *Bacillus thuringiensis* isolate possessing a spore-associated filament. *Curr Microbiol* 47:355–357
5. Smirnova TA, Kulinich LI, Galperin MY, Azizbekyan RR (1991) Subspecies-specific haemagglutination patterns of fimbriated *Bacillus thuringiensis* spores. *FEMS Microbiol Lett* 90:1–4
6. DesRosier JP, Lara JC (1981) Isolation and properties of pili from spores of *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* 146:613–619
7. Mizuki E, Ohba M, Ichimatsu T, Hwang SH, Higuchi K, Saitoh H, Akao T (1998) Unique appendages associated with spores of *Bacillus cereus*. *J Basic Microbiol* 38:33–39
8. Sthalteim T, Granum PE (2001) Characterization of spore appendages from *Bacillus cereus* strains. *J Appl Microbiol* 91: 839–845
9. Rode LJ, Crawford MA, Williams MG (1967) *Clostridium* spores with ribbon-like appendages. *J Bacteriol* 93:1160–1173
10. Pope L, Yolton DP, Rode LJ (1967) Appendages of *Clostridium bifermantans* spores. *J Bacteriol* 94:1206–1215
11. Pope L, Rode LJ (1969) Spore fine structure in *Clostridium cochlearium*. *J Bacteriol* 100:994–1001
12. Samsonoff WA, Hashimoto T, Conti SF (1970) Ultrastructural changes associated with germination and outgrowth of an appendage-bearing clostridial spore. *J Bacteriol* 101:1038–1045
13. Rampersad J, Ammons D (2005) A *Bacillus thuringiensis* isolation method utilizing a novel stain, low selection and high throughput produced atypical results. *BMC Microbiol* 5:52–62
14. Reyes A, Ibarra JE (2004) Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* type strains and isolates by using *Bacillus cereus* group-repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR analysis. *Appl Environ Microbiol* 71:1346–1355
15. Heddi A, Grennier AM, Khatchadourian C, Charles H, Nardon P (1999) Four intracellular genomes direct weevil biology: nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and wolbachia. *Evolution* 96:6814–6819
16. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98
17. Tamura K, Dudley J, Nei MK (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599
18. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W (1994) Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
19. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
20. Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–789
21. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410
22. Laemmli JK, Favre M (1973) Maturation of the head of bacteriophage T4 I. DNA packing agents. *J Mol Biol* 80:575–599
23. Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at a high pH as electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208–212
24. Rampersad J (2006) A study on the isolation of *Bacillus thuringiensis* from the environment: a critical look at library construction. PhD thesis, The University of the West Indies, Trinidad and Tobago

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Enzimas Microbianas del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, bajo la dirección de la Dra. Luz Irene Rojas Avelizapa y el Dr. Ramón Cruz Camarillo.

La investigación contó con el apoyo de los siguientes proyectos:

- Proyecto: Aislamiento, purificación y caracterización de la estructura proteica-paraesporal-filamentos presente en la cepa Bt1-88 de *B. thuringiensis*. **SIP 20081599.**
- Proyecto: Contribución de la microbiología presente en suelos altamente contaminados con hidrocarburos en la biomerremediación por composteo. **SIP 20090912.**
- Proyecto: Estudio molecular de Bt1-88, una nueva cepa de *B. thuringiensis*. **SIP 20101478.**

El estudiante contó con el apoyo del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) y con el apoyo del CONACyT desde agosto de 2007 hasta junio de 2011.

*Iniciando mi vida en un mundo lleno de posibilidades infinitas.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al **Instituto Politecnico Nacional** y a la **Escuela Nacional de Ciencias Biológicas** por los conocimientos necesarios para terminar mi formación académica.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por su apoyo financiero durante la realización del trabajo de investigación.

Al **Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI)**, por su apoyo financiero durante la realización del trabajo de investigación.

A la **Dra. Luz Irene Rojas Avelizapa**, Profesor investigador del Laboratorio de Enzimas Microbianas, por todo el apoyo incondicional y la amistad invaluable brindada durante toda mi formación académica.

Al Dr. **Ramón Cruz Camarillo**, Profesor investigador del Laboratorio de Enzimas Microbianas, por su asesoría y experiencia compartida durante la realización de este proyecto.

Al Dr. **Jorge E. Ibarra Rendón**, Profesor investigador del Laboratorio de Bioinsecticidas del departamento de Biotecnología del CINVESTAV-Irapuato, por las asesoría y facilidades brindadas durante la estancia de investigación en su laboratorio.

A la **PhD. Joanne Rampersad**, Profesor asistente de la University of Texas – Pan American, por el apoyo, asesoría y las facilidades brindadas para la realización de la estancia de investigación en su laboratorio.

Al PhD. **David Ammons**, Profesor asistente de la University of Texas – Pan American, por la asesoría brindada durante la realización de la estancia de investigación en su laboratorio.

A **Regina Basurto**, Auxiliar de investigación del CINVESTAV-Irapuato, por su asesoría durante la estancia en el Laboratorio de Bioinsecticidas del CINVESTAV-Irapuato.

Al IAP **Javier Luévano Borroel**, Auxiliar de investigación del CINVESTAV-Irapuato, por su asesoría y conocimientos brindados durante la realización de bioensayos en el Laboratorio de Bioinsecticidas del CINVESTAV-Irapuato.

A mis sinodales: **Dra. Nora Ruiz Ordaz**, **Dr. Juvencio Galíndez Mayer**, **Dra. Enriqueta Amora Lazcano** y el **Dr. Edgar O. Lopez Villegas**; por el tiempo dedicado para la revisión de esta tesis.

## DEDICATORIAS

A mis padres **Catalina Suarez Macías** y **Marcelino Ventura Blas**, por haberme dado la vida y la oportunidad de realizar mis estudios profesionales y posteriormente de posgrado. Por haber creído en mí a pesar de lo adverso que fue el camino, nunca estaré lo suficientemente agradecido.

A mis hermanos **David Ventura Suarez** y **Juan Carlos Ventura Suarez**, que han sido y serán una luz en mi camino.

A mis amigos **Zahuiti, Elsa, Javier, mi Jefa (Dra. Luz)**, por haber estado ahí siempre, por hacerme ver mis errores y apoyarme en todo momento, por darme el empujón que muchas veces me hizo falta. Mil gracias.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
RESUMEN .....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1 INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Generalidades de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	1
1.2 Identificación de <i>B. thuringiensis</i> .....	3
1.3 Tipificación de cepas de <i>B. thuringiensis</i> .....	9
1.4 Apéndices presentes en las esporas de los géneros <i>Clostridium</i> y <i>Bacillus</i> .....	11
1.5 Apéndices presentes en esporas de <i>B. thuringiensis</i> .....	14
1.6 Antecedentes de la cepa Bt1-88 .....	16
2 JUSTIFICACIÓN .....	22
3 OBJETIVOS .....	23
3.1 General.....	23
3.2 Particulares .....	23
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
4.1 Microorganismos y su conservación .....	24
4.2 Determinación del tiempo óptimo de crecimiento de Bt1-88 .....	24
4.2.1 Protocolo general para observación de muestras biológicas, mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) .....	24
4.3 Aislamiento de los apéndices y la inclusión proteica paraesporal .....	25
4.4 Purificación de los apéndices y la inclusión proteica paraesporal.....	26
4.4.1 Recuperación de las inclusiones proteicas paraesporales .....	26
4.4.2 Tinción negativa de las estructuras de interés, para su observación mediante MET .....	27
4.4.3 Purificación de los apéndices .....	27
4.4.4 Determinación de proteínas por el método de Lowry .....	28
4.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida .....	28
4.5.1 Revelado con azul de Coomassie.....	28

---

4.5.2 Revelado con ácido peryódico de Schiff (PAS) .....	29
4.6 Secueciación N-terminal .....	29
4.7 Hidrólisis de los apéndices purificados .....	29
4.8 Presencia de carbohidratos en los apéndices de Bt1-88 .....	30
4.8.1 Cuantificación de carbohidratos neutros .....	30
4.8.2 Cuantificación de hexosaminas .....	30
4.8.3 Cuantificación de hexosaminas N-acetiladas .....	31
4.9 Identificación de los carbohidratos detectados.....	31
4.10 Extracción de DNA genómico .....	33
4.11 Amplificación del gen <i>hag</i> .....	33
4.11.1 Purificación del DNA separado previamente en geles de agarosa .....	34
4.11.2 Secuenciación.....	34
4.11.3 Análisis bioinformático.....	35
4.12 Obtención de mutantes de Bt1-88, para la interrupción de los genes que codifican a las proteínas de las IPP's y los filamentos, mediante transposon tagged mutagenesis (TTM) .....	37
4.12.1 Selección de mutantes carentes de IPP's y apéndices.....	37
4.13 Ensayo de germinación de esporas.....	38
4.14 Bioensayos de toxicidad de las IPP's semi purificadas.....	39
4.14.1 Bioensayos con <i>Manduca sexta</i> (LEPIDOPTERA: <i>Sphingidae</i> ) .....	39
4.14.2 Bioensayos con <i>Aedes aegypti</i> (DIPTERA: <i>Culicidae</i> ) .....	40
5 RESULTADOS.....	41
5.1 Determinación del tiempo óptimo de cosecha de las esporas de Bt1-88.....	41
5.2 Aislamiento de los filamentos y las inclusiones proteicas paraesporales (IPP).....	42
5.3 Determinación de las proteínas constituyentes de las inclusiones paraesporales y de los apéndices purificados .....	47
5.4 Secuenciación del extremo amino terminal de las proteínas presentes en las inclusiones paraesporales purificadas .....	48
5.5 Identificación mediante TLC de los carbohidratos presentes en los apéndices purificados.....	49
5.6 Cuantificación colorimétrica de los carbohidratos presentes en los apéndices purificados.....	51
5.7 Tipificación molecular de la cepa Bt1-88.....	52

---

5.8 Obtención de mutantes de la cepa Bt1-88 para interrumpir los genes codificantes de las inclusiones paraesporales y los apéndices.....	58
5.9 Ensayo de germinación de esporas para determinar si las inclusiones paraesporales afectan la velocidad de germinación .....	61
5.10 Ensayos de toxicidad .....	65
6 DISCUSIÓN.....	66
7 CONCLUSIONES.....	71
PERSPECTIVAS.....	72
8 BIBLIOGRAFÍA.....	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diferentes formas de cristales de <i>B. thuringiensis</i> .....	1
<b>Figura 2.</b> Preparación fija de un autolisado de <i>B. thuringiensis</i> cepa Bt-107.....	2
<b>Figura 3.</b> Estructura de un flagelo procariota (Brock <i>et al</i> 2006). .....	11
<b>Figura 4.</b> Micrografías de transmisión de diversas especies de <i>Clostridium</i> , que muestran los diferentes tipos de apéndices presentes en las esporas de dicha especie.....	13
<b>Figura 5.</b> Tinción negativa de esporas de <i>Bacillus cereus</i> mostrando numerosos apéndices.....	14
<b>Figura 6.</b> La figura 6A muestra una micrografía electrónica de transmisión de una espora de Bt2-56, realizada con tinción negativa.....	15
<b>Figura 7.</b> Micrografía de contraste de fases de Bt1-88.....	16
<b>Figura 8.</b> Dendograma obtenido con el agrupamiento de las secuencias del gen 16S rDNA de Bt1-88.....	17
<b>Figura 9.</b> Resultados obtenidos de tipificación con RepPCR y perfil de plásmidos de la cepa Bt1-88.....	17
<b>Figura 10.</b> Dendograma generado con las secuencias traducidas a aminoácidos codificados en los genes <i>cry</i> detectados en la cepa Bt1-88 .....	18
<b>Figura 11.</b> Cambios intracelulares ocurridos en la cepa Bt1-88 durante el ciclo de esporulación.....	20
<b>Figura 12.</b> Micrografías electrónicas de transmisión correspondientes a un estudio cinético del crecimiento de Bt1-88.....	41
<b>Figura 13.</b> Micrografías electrónicas de transmisión de una cinética de crecimiento de Bt1-88 .....	42
<b>Figura 14.</b> Micrografías electrónicas de transmisión en las que se muestra el producto de sonicación de las esporas de Bt1-88.....	43
<b>Figura 15.</b> Fraccionamiento por ultracentrifugación, en un gradiente discontinuo de sacarosa, de las diferentes estructuras liberadas por sonicación de los complejos espора-IPP-apéndices .....	44
<b>Figura 16.</b> Micrografía electrónicas de transmisión de las inclusiones paraesporales de Bt1-88 .....	45
<b>Figura 17.</b> Micrografía de transmisión de apéndices presentes en Bt1-88 .....	46
<b>Figura 18.</b> SDS-PAGE donde se muestra el perfil de proteínas de los cristales purificados de Bt1-88 .....	47
<b>Figura 19.</b> Separación electroforética en gel de poliacrilamida de las proteínas constituyentes de los filamentos .....	48
<b>Figura 20.</b> Alineamiento de la secuencia N- terminal de la proteína de 30 kDa de Bt1-88 y de las proteínas constituyentes de los apéndices de <i>C.</i> <i>taeniosporum</i> .....	49
<b>Figura 21.</b> Cromatograma obtenido de los filamentos hidrolizados con ácido sulfúrico, revelados con TTC .....	50

---

<b>Figura 22.</b> Alineamiento de las secuencias del gen hag de Bt1-88, de las secuencias obtenidas con los iniciadores BtHagF1-BtHagR1 y Flaf1-Flar1.....	53
<b>Figura 23.</b> Dendograma construido con las diferentes secuencias del gen hag .....	57
<b>Figura 24.</b> Micrografía electrónica de transmisión de las cepas mutantes Bt1-88(148) y Bt1-88(163).....	59
<b>Figura 25.</b> Micrografías electrónicas de la cepa Bt1-88 (148) mutada con transposones.....	60
<b>Figura 26.</b> Micrografías electrónicas de transmisión de la cepa Bt1-88(163) .....	61
<b>Figura 27.</b> En A se muestra la cinética de germinación de las esporas de la cepa silvestres de Bt1-88 y dos de sus mutantes (CTS10 y SDS40) .....	62
<b>Figura 28.</b> Micrografías electrónicas de transmisión de Bt-188 a lo largo del proceso de germinación.....	64

---

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Algunas estrategias utilizadas en la identificación de <i>B. thuringiensis</i> . .....	6
<b>Tabla 2.</b> Perfil fenotípico de la cepa Bt1-88, utilizando el sistema API50CH. ....	16
<b>Tabla 3.</b> Secuencias del gen <i>hag</i> usadas para la construcción del dendograma de tipificación de Bt1-88.....	36
<b>Tabla 4.</b> Rf's obtenidos de la cromatografía en capa fina de los apéndices hidrolizados.....	51
<b>Tabla 5.</b> Resultados de la cuantificación de carbohidratos presentes en los apéndices hidrolizados. ....	52

## RESUMEN

*Bacillus thuringiensis* produce en su fase estacionaria de crecimiento, pequeñas inclusiones proteicas intracelulares, llamadas comúnmente cristales, cuya forma y tamaño son diversas. Por su ubicación en un extremo de la espora, también se les conoce como inclusiones proteicas paraesporales (IPP's). Tales estructuras están constituidas por proteínas que actúan contra ciertos géneros de insectos plaga. Por lo tanto, dichas IPP's se han usado a gran escala para producir insecticidas biológicos. Recientemente se describió una cepa atípica de *B. thuringiensis* denominada Bt2-56, cuya espora está unida a un filamento largo en cuyo extremo proximal se encuentra una IPP de forma cúbica. Más recientemente, y como resultado de la investigación que aquí se presenta, se informó de otra cepa de la misma especie denominada Bt1-88, la cual presenta una espora asociada a una pequeña IPP de forma plana y hexagonal, de la cual se desprenden seis apéndices. Las características tan peculiares de estas dos cepas permiten suponer la existencia de un nuevo fenotipo de *B. thuringiensis*, cuyas IPP's están asociadas a uno o más apéndices.

El presente trabajo tuvo como objetivo principal realizar nuevos estudios que permitan tener una imagen más completa de la cepa Bt1-88. Al respecto se encontró que su IPP de forma hexagonal mide  $479 \pm 67.5$  nm, y está compuesta por tres proteínas de 30, 60 y 140 kDa, perteneciendo las dos últimas a las familias proteicas CryIA y Cry2A. Los apéndices están constituidos por al menos cinco proteínas, dos de las cuales están glicosiladas, y su porción de carbohidratos contiene glucosa y/o manosa.

La tipificación de Bt1-88 mediante la secuenciación del gen responsable de la producción de la flagelina, mostró que dicha cepa no muestra identidad con ninguna de las 82 serovariedades identificadas por esta técnica, lo que permite proponer a Bt1-88 como perteneciente a una nueva variedad de *B. thuringiensis*.

Por otra parte, con objeto de conocer si existe algún tipo de participación de las IPP's y de los apéndices en la germinación de las esporas de Bt1-88, se obtuvieron mutantes carentes de tales estructuras, mediante el uso de transposones. Tales mutantes no mostraron afectación alguna en su tiempo de germinación, lo que sugiere que las IPP's no son utilizadas como fuente de carbono y nitrógeno por la nueva célula vegetativa que emerge de la espora germinada.

Finalmente, los bioensayos realizados con las IPP's purificadas, mostraron que sus proteínas Cry no poseen efecto tóxico contra insectos plaga modelo como *Manduca sexta* y *Aedes aegypti*, por lo que puede pensarse que su función debe ser sólo de tipo estructural.

## ABSTRACT

*Bacillus thuringiensis* produces along its stationary phase of growth, small intracellular proteinic inclusions commonly named crystals, whose size and shape may be variable. By considering its location at one end of the spore, such bodies are as well known as parasporal proteinic inclusions (PPI), which have larvicidal activity on certain specific plague-insects. For this reason, such PPI has been used around the world to formulate commercial bioinsecticides. However, an atypical novel strain known as Bt2-56 was isolated recently. Such bacterium had its spore joined to a very long filament, which in turn was linked through its other end to a large cubic PPI. Even more recently, another novel strain of *B. thuringiensis*, named Bt1-88 which is the central point of the present research, shows close to one end of its spore, a very small flat hexagonal PPI, with six appendages. The nascent portion of these six appendages is closely attached to the six vertices of the parasporal bodies. The presence of PPI associated to one or more appendages could represent a new phenotypic class of *B. thuringiensis*.

The aim of the present research was to carry out new studies on the Bt1-88 strain of *B. thuringiensis*. Thus, it was found that the size of its hexagonal PPI was  $479\pm 67.5$  nm. Besides, it was composed by three different proteins, whose molecular weights corresponded to 30, 60 and 140 kDa. The two last were related to CryIA and Cry2A proteins families. The appendages showed to be formed by at least five different proteins. Two of them were glycosylated, and contained glucose and/or mannose in its carbohydrate portion.

The typification of Bt1-88 by sequencing the gene involved in the flagellin production, clearly show that this bacterial strain had not identity with any of the 82 known serovarieties of *B. thuringiensis*. Therefore, Bt1-88 should be considered as a new serovariety of *B. thuringiensis*.

Another aspect was to study if the PPIs could be used as carbon/nitrogen sources for germination of the spores of Bt1-88. Results showed however, no difference in the time of germination between the wild type strain, and two of its mutants lacking of PPI and appendages. Such mutants were obtained by using one specific transposon.

Finally, it was demonstrated that the Cry proteins contained in the purified PPIs of Bt1-88, were not toxic for larvae of *Manduca sexta* and *Aedes aegypti*; therefore such proteins could have only a structural role.

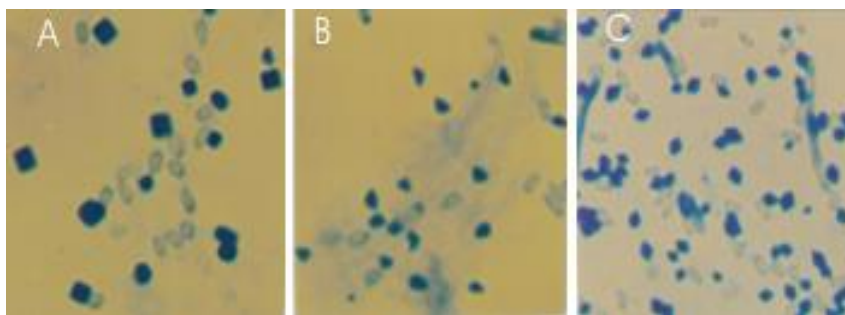
## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 Generalidades de *Bacillus thuringiensis*

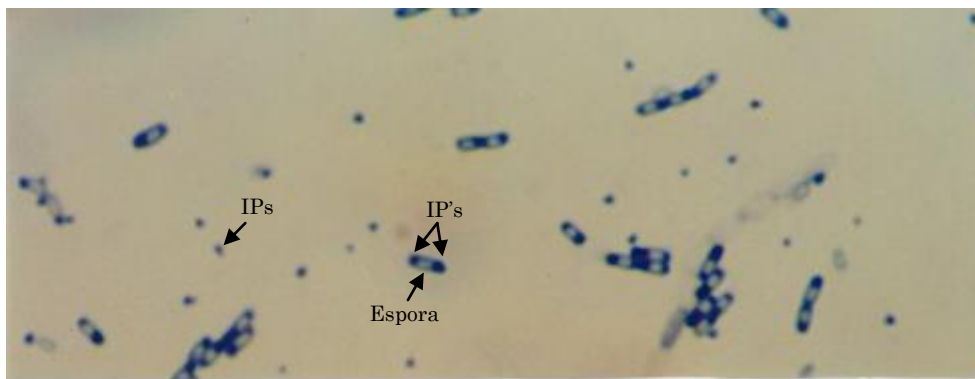
*B. thuringiensis* es una bacteria Gram (+), aerobia estricta, heterótrofa, capaz de formar esporas y cristales proteicos durante la fase estacionaria del crecimiento. Este microorganismo fue descrito por primera vez por Ishiwata (1901), quien lo aisló de larvas del gusano de seda que presentaban la enfermedad de sotto. Sin embargo, *B. thuringiensis* fue descrito formalmente por Berliner hasta 1911. La cepa reportada por este autor fue aislada de *Anagasta kuehniella* y colectada en Thuringia, Alemania; lo cual da el nombre a la especie.

Con respecto a los cristales, éstos se encuentran constituidos principalmente por una o más proteínas Cry, también conocidas como  $\delta$ -endotoxinas (Bravo *et al.* 2007). La forma de estos cristales puede ser variada dependiendo de su composición: bipiramidal (Cry1); cuboidal (Cry2A); rectangular (Cry3A); esférica (Cry4A y Cry4B) y romboidal (Cry11A), (Schnepf *et al.* 1998) (figura 1). Estas inclusiones cristalinas son tóxicas y altamente específicas contra insectos de varios órdenes, entre los principales se encuentran: Diptera, Himenoptera y Coleoptera; son inocuas hacia los humanos, vertebrados y plantas, por lo que *B. thuringiensis* es una alternativa útil para el control de insectos plaga en agricultura (Bravo *et al.* 2005).

Cabe señalar que no todas las cepas de *B. thuringiensis* presentan cristales típicos, como los que se mencionaron anteriormente. Por ejemplo la cepa Bt-107 presenta dos pequeñas inclusiones paraesporales unidas a la espora (figura 2).



**Figura 1.** Diferentes formas de cristales de *B. thuringiensis*; en A se muestra la forma cuboidal; en B la triangular y en C la bipiramidal (González Villa 2005) (x1000).



**Figura 2.** Preparación fija (X1000) de un autolisado de *B. thuringiensis* cepa Bt-107, teñida con amido negro. Se observan dos pequeñas inclusiones paraesporales (IP's) de color azul oscuro en los extremos de la espora (Rojas-Avelizapa 1999).

Además de las proteínas Cry, involucradas en los mecanismos entomopatógenos de esta bacteria, *B. thuringiensis* ha desarrollado una serie de factores de virulencia que le permiten infectar a sus blancos con mayor eficiencia. Entre éstos se encuentran enzimas como: fosfolipasas (Zhang *et al.* 1993), proteasas (Fedhila *et al.* 2002) y quitinasas (Schnepf & Whiteley 1985);  $\alpha$ -exotoxinas o exotoxinas termolábiles (Schnepf & Whiteley 1985) y las  $\beta$ -exotoxinas (Levinson 1990), las que funcionan como análogos del ATP; además las proteínas VIP con carácter insecticida, las cuales se producen en la fase vegetativa del crecimiento (Yu *et al.* 1997; Lee *et al.* 2003; Selvapandiyan *et al.* 2001).

Sin embargo, se ha reportado la aparición de insectos resistentes a las toxinas de *B. thuringiensis*, principalmente contra la familia Cry1A, siendo el género *Plutella* el que presenta el mayor número de especies resistentes, y en menor proporción, los géneros *Spodoptera* y *Heliothis* (Schnepf *et al.* 1998).

Por otra parte, *B. thuringiensis* es considerada una bacteria ubicua, ya que se ha aislado en todas partes del mundo y de muy diversos sistemas; como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, etc. Sin embargo, Meadows (1992) sólo ha propuesto tres nichos hipotéticos: organismo del suelo, habitante de filoplanos y como entomopatógeno. Al respecto, conviene referir que la metodología utilizada para su aislamiento involucra un tratamiento con calor para la selección de microorganismos esporulados. Además, en algunas ocasiones se emplea un medio de

enriquecimiento con acetato (Delucca *et al.* 1981), o la selección con antibióticos (Poncet *et al.* 1997).

## 1.2 Identificación de *B. thuringiensis*

*B. thuringiensis* está estrechamente relacionado con las bacterias *B. anthracis* y *B. cereus*. Las tres especies son miembros del mismo grupo bacteriano, pero muestran fenotipos claramente diferentes, así como diversos efectos patológicos. Dado que sus genotipos son muy semejantes, se hace difícil su identificación y diferenciación. *B. anthracis* es el agente etiológico del ántrax, y es potencialmente un arma biológica debido a su alta toxicidad; *B. cereus* es un patógeno potencial asociado principalmente a intoxicaciones alimenticias, *B. thuringiensis*, como se ha mencionado, es capaz de formar cristales proteicos con capacidad entomotóxica. En el último caso, los genes Cry se encuentran usualmente en plásmidos de alto peso molecular; éste es también el caso de *B. anthracis*, cuyos factores de virulencia se encuentran codificados en los plásmidos pOX1 y pOX2 (Rasko *et al.* 2005). Cuando los plásmidos que contienen los genes Cry se pierden, ya no es posible diferenciar a *B. thuringiensis* de *B. cereus*.

A lo largo del tiempo se han implementado diversos métodos para diferenciar a *B. thuringiensis* de *B. cereus* (Tabla 1), pues estas dos especies presentan genomas prácticamente idénticos. Los primeros métodos reportados comprenden la descripción de un perfil fenotípico (Baumann *et al.* 1984), el cual menciona la capacidad de *B. thuringiensis* y de *B. cereus* para degradar diferentes compuestos orgánicos, como azúcares simples y polisacáridos, ácidos orgánicos y aminoácidos. Los resultados obtenidos de este ensayo fueron poco útiles para distinguir las cepas de *B. thuringiensis* de las de *B. cereus*, pues los perfiles fenotípicos resultaron prácticamente idénticos. Por otro lado, unos años antes Niskanen y col. (1978), describieron un método basado en los perfiles de ácidos grasos de estas cepas; los resultados fueron similares a los reportados por Baumann y col. (1984), ya que no se logró establecer una diferenciación clara de estas especies. Posteriormente se retomó el perfil de ácidos grasos (Black *et al.* 1997) intentando establecer diferencias entre *B. thuringiensis* y *B. cereus*. En este caso se analizaron los perfiles de los ácidos grasos

presentes en los fosfolípidos, sin embargo, tampoco se encontraron diferencias significativas ni en los tipos de ácidos grasos ni en las proporciones de los fosfolípidos presentes en *B. thuringiensis* y *B. cereus*, e incluso en *B. anthracis*; por lo que no se logró diferenciar entre sí a estas tres especies. Un trabajo similar al de Niskanen y col. (1978) fue descrito por Carlson y col. (1994), pero en lugar de dirigirse al estudio de las enzimas relacionadas con el metabolismo extracelular, se enfocó en las enzimas del metabolismo central, como catalasa, alcohol deshidrogenasa y adenilato ciclasa, entre otras. A esta estrategia se le conoce mejor como perfil de enzimas multilocus (MEE). Para complementar este trabajo se incluyó la electroforesis de campos pulsados del DNA genómico digerido con enzimas de restricción. Los resultados obtenidos con estas dos estrategias fueron los mismos que en el caso del perfil de ácidos grasos y el perfil bioquímico, ya que no se logró diferenciar a *B. thuringiensis* de *B. cereus*, e incluso se llegó a la conclusión de que estas dos especies deben ser consideradas como una sola, y no como dos microorganismos diferentes, y además, que *B. thuringiensis* es sólo una variedad de *B. cereus* con la capacidad de producir un cristal.

Debido a que los perfiles enzimáticos y lipídicos no fueron capaces de diferenciar a esas dos especies tan estrechamente relacionadas, se introdujeron técnicas de biología molecular; una de éstas utilizó como blanco el 16S rDNA. Al respecto, Giffel y col. (1997) describieron sondas especie-específicas, las cuales fueron capaces de distinguir entre una especie y otra. Por otra parte, Bavykin y col. (2004) no sólo utilizaron la secuencia del 16S rDNA, sino también las secuencias de dos genes adicionales: el 23S rDNA y el *gyrB*. Aún así no se logró establecer con claridad, que *B. thuringiensis* y *B. cereus* son especies distintas, aunque debido a las diferencias fenotípicas que existen entre ellas, tampoco se puede considerar que sean una misma especie. Otras estrategias en biología molecular que se han descrito, son el análisis de secuencias multilocus (Sorokin *et al.* 2006), el análisis del gen que codifica para la flagelina (Xu & Côté 2006), y el análisis de las secuencias espaciadoras entre los genes 16S y 23S rDNA, mejor conocidos como ITS (Daffonchio *et al.* 2006).

Finalmente, uno de los métodos considerado útil para la diferenciación de las especies citadas, fue el arreglo nanoestructural de la cubierta externa de las esporas

---

de *B. thuringiensis* y de *B. cereus*, pues de acuerdo con Plomp y col. (2005), la espora de *B. thuringiensis* presenta un arreglo en forma de colmena, el cual es claramente diferente al arreglo en forma de fibras entrelazadas (rodlet) para *B. cereus*; sin embargo, en este estudio sólo se utilizaron una cepa de cada especie, por lo que no se considera una muestra representativa que pudiera proporcionar información suficiente para establecer diferencias significativas entre ambas especies. Otro método que también se consideró útil fue el análisis proteómico (DeVecchio *et al.* 2006) de las esporas de *B. cereus* y *B. thuringiensis*, encontrando suficiente evidencia que permite establecer diferencias significativas entre éstas dos especies, pues fue posible detectar proteínas particulares, siendo *B. thuringiensis* la que presentó la mayor cantidad de proteínas únicas, mientras que *B. anthracis* presentó la menor cantidad. Sin embargo, al igual que en el caso del análisis nanoestructural, se utilizaron un número reducido de cepas: tres de *B. anthracis*, dos de *B. thuringiensis* y dos de *B. cereus*, no siendo, por lo tanto, material suficiente para afirmar que este patrón se debe repetir en todas las cepas de las especies estudiadas, pues la cantidad de cepas no es significativa.

Finalmente, en la tabla 1 se resumen las estrategias propuestas hasta ahora, para la identificación de *B. thuringiensis*.

**Tabla 1.** Algunas estrategias utilizadas en la identificación de *B. thuringiensis*.

Referencia	Estrategia	Resultados
Niskanen <i>et al.</i> 1978	Determinación del perfil de ácidos grasos empleando cromatografía de gases	Mediante esta estrategia se determinó la composición de ácidos grasos de varias cepas del grupo de <i>B. cereus</i> ( <i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. mycoides</i> ). Haciendo comparaciones cualitativas, la composición es similar en las tres especies, pero con diferencias cuantitativas menores entre las cepas. La diferencia principal se encontró en el ácido graso C15 iso, el cual distinguió a <i>B. thuringiensis</i> / <i>B. cereus</i> de <i>B. mycoides</i> , con una diferencia del 4%. Mientras que ese mismo ácido graso varió solamente en un 0.3% entre <i>B. thuringiensis</i> / <i>B. cereus</i> . Lo cual dejó claro que esta estrategia no logra diferenciar entre las especies <i>B. thuringiensis</i> / <i>B. cereus</i> .
Baumann <i>et al.</i> 1984	Perfil fenotípico basado en la utilización de diferentes fuentes de carbono	Para determinar el perfil fenotípico de las diferentes cepas del grupo de <i>B. cereus</i> , se realizó la fermentación de diferentes carbohidratos, hidrólisis de macromoléculas (quitina, lecitina, almidón, etc.) e hidrólisis de aminoácidos. Haciendo un análisis comparativo de los perfiles obtenidos se concluyó que <i>B. cereus</i> es indistinguible de <i>B. thuringiensis</i> , y que la producción del cristal paraesporal es la única diferencia.
Carlson <i>et al.</i> 1994	Perfil de enzimas multilocus (MEE) y electroforesis de campos pulsados (PFGE) de DNA genómico restringido con <i>NotI</i> y <i>SfiI</i>	Con la estrategia de enzimas multilocus se lograron obtener 27 electrotipos (ET). La relación genética entre estos ET's logró dividir el total de las cepas en tres clusters principales (A, B y C) y 6 clusters independientes. Los Cluster A y B contenían tanto cepas de <i>B. cereus</i> como de <i>B. thuringiensis</i> , en tanto que el B sólo agrupaba cepas de <i>B. thuringiensis</i> . Con la estrategia de PFGE se logró diferenciar cepas con el mismo ET. También se encontró que cada cepa de <i>B. cereus</i> y <i>B. thuringiensis</i> tenía perfiles únicos de restricción con <i>NotI</i> y <i>SfiI</i> , reflejando su heterogeneidad. Esta estrategia al igual que MEE no logró diferenciar entre las cepas de <i>B. cereus</i> y <i>B. thuringiensis</i> . Adicionalmente se sugirió que <i>B. cereus</i> y <i>B. thuringiensis</i> deben ser considerados una sola especie.
Black <i>et al.</i> 1997	Diferenciación quimiotaconómica empleando perfiles de glicero-fosfolípidos	Para obtener los perfiles de los fosfolípidos se empleó ESI MS-MS (Electrospray ionization tandem mass spectrometry). Con esta técnica fue fácil distinguir a <i>B. subtilis</i> de <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> y <i>B. anthracis</i> , pero no fue capaz de distinguir entre las tres últimas especies, pues sólo se encontró una pequeña diferencia en un C12, el cual sólo está presente en <i>B. cereus</i> y está ausente en <i>B. anthracis</i> y <i>B. thuringiensis</i> , pero no se consideró significativo para la discriminación de las tres especies.

Tabla 1. Continuación...

Referencia	Estrategia	Resultados
Giffel <i>et al.</i> 1997	Diferenciación de cepas empleando sondas de DNA dirigidas contra las regiones variables del gen 16S rRNA	Se realizó la secuenciación y posterior alineamiento de la región VI del gen 16S rRNA, la cual mostró una variabilidad suficiente para identificar y diferenciar a <i>B. thuringiensis</i> de <i>B. cereus</i> . Con base en estas diferencias se diseñaron sondas de DNA basadas en la región VI, tanto para <i>B. cereus</i> como para <i>B. thuringiensis</i> . Se encontró como resultado que las sondas son especie específicas, por lo que esta estrategia resultó útil para la diferenciación entre las cepas de <i>B. thuringiensis</i> y <i>B. cereus</i> .
Cherif <i>et al.</i> 2003	Huellas moleculares empleando rep-PCR (repetitive extragenic polymorphic-PCR)	Con la amplificación de las regiones repetitivas se logró determinar que las cepas de <i>B. anthracis</i> son homogéneas, mientras que las cepas de <i>B. cereus</i> mostraron perfiles variados, pero sin ningún patrón que permita su identificación. Algunas cepas de <i>B. cereus</i> y <i>B. thuringiensis</i> mostraron dos bandas principales de 670 pb y 1070 pb y algunas otras de menor tamaño. <i>B. mycooides</i> sólo mostró dos patrones principales. Haciendo el agrupamiento correspondiente se lograron obtener dos grupos principales (A y B); el grupo A contenía cepas de <i>B. mycooides</i> y <i>B. cereus</i> , mientras que el B incluía cepas de <i>B. mycooides</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. anthracis</i> , <i>B. pseudomycooides</i> y <i>B. wiehenstephanensis</i> . En el dendograma generado se observó claramente que <i>B. anthracis</i> formaba un subgrupo claramente definido mientras que el resto de las cepas mostraban una gran diversidad. Debido a que las cepas de <i>B. cereus</i> y <i>B. thuringiensis</i> permanecieron en el mismo grupo se puede decir que este método no resultó adecuado para diferenciar a estas dos especies.
Bavykin <i>et al.</i> 2004	Análisis de secuencias de los genes 16S rRNA, 23S rRNA y <i>gyrB</i>	Se realizó un análisis exhaustivo de las secuencias de los genes 16S rRNA y 23S rRNA, encontrando pequeñas diferencias en tan solo algunos nucleótidos, mientras que con el gen <i>gyrB</i> encontraron mayores diferencias entre las cepas de <i>B. cereus</i> y <i>B. thuringiensis</i> . Con estos datos se logró dividir las cepas del grupo de <i>B. cereus</i> en varios subgrupos, los cuales fueron denominados Anthracis, Cereus A y T, Thuringiensis A y B y Mycooides A y B. No hubo una clara diferencia entre las especies del grupo de <i>B. cereus</i> , pues se encontraron cepas de <i>B. cereus</i> y <i>B. thuringiensis</i> en todos los subgrupos, lo cual sugirió fuertemente que las dos especies no son unificables.

Tabla 1. Continuación...

Referencia	Estrategia	Resultados
Plomp <i>et al.</i> 2005	Análisis nanoestructural de la cubierta externa mediante microscopía de fuerza atómica (AFM)	Se logró identificar la nanoestructura del exosporium así como la presencia de 3 tipos de apéndices asociados a ésta. Cuando el exosporium fue removido quedó expuesta la cubierta externa de la espora (outer coat), la cual tiene un arreglo en forma de “colmena” para <i>B. thuringiensis</i> y de fibras entrelazadas para <i>B. cereus</i> . Los resultados obtenidos por AFM sugieren que los arreglos nanométricos y estructurales son especie-específicos, y pueden ser útiles para la diferenciación de cepas de <i>B. thuringiensis</i> y <i>B. cereus</i> . Finalmente, las variaciones nanoestructurales estaban directamente relacionadas con SspE, la cual es una proteína estructural del “core” esporal.
DelVecchio <i>et al.</i> 2006	Perfil proteómico de proteínas esporales	Se realizaron perfiles proteómicos en geles 2DE encontrando un total de 1,217 proteínas, de las cuales 245 fueron de <i>B. anthracis</i> , 290 de <i>B. cereus</i> , 390 de <i>B. thuringiensis</i> cepas 10972 y 285 de <i>B. thuringiensis</i> cepa 97-27. El análisis informático mostró que las cepas podían ser distinguidas entre sí, de acuerdo a sus perfiles de proteínas en geles 2DE. Además se encontraron proteínas únicas para cada especie: 21 para <i>B. anthracis</i> , 58 para <i>B. cereus</i> y 113 para <i>B. thuringiensis</i> . Esta estrategia sí permitió diferenciar a <i>B. cereus</i> de <i>B. thuringiensis</i> .
Xu & Côté 2006	Secuenciación del alelo <i>hag</i> , el cual codifica para la flagelina	Se realizó la secuenciación del alelo <i>hag</i> y el agrupamiento tanto con las secuencias de nucleótidos como con las secuencias traducidas a aminoácidos. Se encontró que las cepas de <i>B. cereus</i> no se agruparon juntas, sino que fueron situadas junto a las cepas de <i>B. thuringiensis</i> , no logrando una diferenciación entre especies.
Sorokin <i>et al.</i> 2006	Análisis de secuencias multilocus	Se analizaron las secuencias de los loci <i>cliC</i> , <i>dinB</i> , <i>gdpD</i> , <i>panC</i> , <i>purF</i> y <i>yhfL</i> . Los resultados mostraron tres grupos principales, denominados C, T y W. Estos grupos contuvieron cepas de <i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> y <i>B. weinstephanensis</i> , respectivamente. Además, fue posible dividir a las cepas en 10 genotipos distintos, en base a sus perfiles alélicos denominados de G1 a G10. Este trabajo ofrece una mayor diferenciación entre las especies referidas anteriormente, habiendo sólo una pequeña discrepancia en el genotipo G8 del grupo T, donde se encontraron tanto las cepas de <i>B. thuringiensis</i> como de <i>B. cereus</i> .

Tabla 1. Continuación...

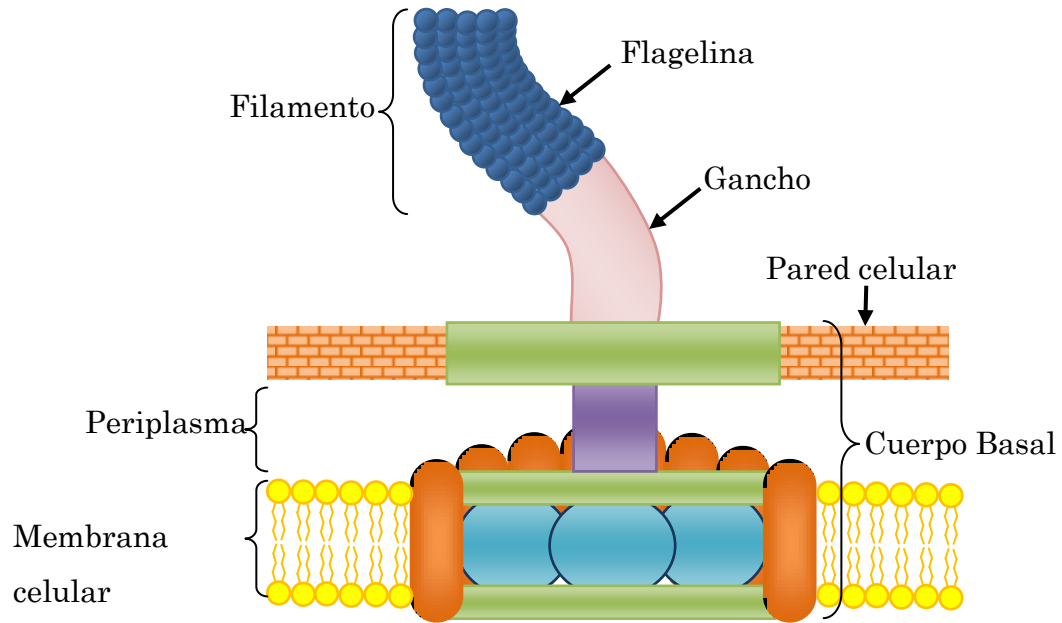
Referencia	Estrategia	Resultados
Daffonchio <i>et al.</i> 2006	Detección de nucleótidos polimórficos únicos en el ITS 16S-23S rRNA	Esta estrategia consistió en amplificar el ITS (Intergenic sequences) entre el gen 16S rRNA y el gen 23S rRNA con RSI-PCR (PCR de inserción de sitios de restricción) y el posterior análisis de los nucleótidos de las posiciones 75 y 121. Con los resultados del RSI-PCR lograron encontrar 8 haplotipos denominados de H1 a H8. Aproximadamente 62 y 77% de las cepas de <i>B. cereus</i> y <i>B. thuringiensis</i> fueron agrupadas en el haplotipo H2. El resto de las cepas de <i>B. cereus</i> y <i>B. thuringiensis</i> fueron agrupadas en el haplotipo H3, éste también contuvo al 55% de las cepas de <i>B. mycooides</i> y todas las cepas de <i>B. pseudomycooides</i> . Con estos resultados se pudo concluir que esta estrategia no es capaz de discriminar entre las especies de <i>B. thuringiensis</i> y <i>B. cereus</i> .
Vardhan <i>et al.</i> 2011	Amplificación y digestión del gen 16SrRNA con <i>AluI</i>	Se amplificó la secuencia del gen 16S rRNA y posteriormente se realizó una digestión con la endonucleasa <i>AluI</i> . La mayoría de las cepas de <i>Bacillus</i> utilizadas, mostraron fragmentos de varios tamaños, particularmente la presencia de un fragmento de 256 pb, con excepción de <i>B. thuringiensis/B. cereus</i> . Estas cepas presentaron sitios de restricción dentro del fragmento de 256 pb. La secuenciación y análisis de este fragmento permitió establecer diferencias significativas entre las diferentes especies de <i>Bacillus</i> , pero no entre las especies <i>thuringiensis</i> y <i>cereus</i> .
Bavykin <i>et al.</i> 2008	Análisis de las secuencias 16S y 23S usando microarreglos	Este equipo de trabajo dividió previamente al grupo de <i>Bacillus cereus</i> en varios subgrupos (Bavykin <i>et al.</i> 2004). Con esta nueva estrategia se diseñaron iniciadores tanto para el gen 16S como para el 23S rRNA, pero tomando como referencia el grupo de cepas que pertenecían a cada subgrupo. Esto permitió diseñar sondas específicas para cada subgrupo, lo cual hace posible establecer una diferencia significativa para las diferentes especies del grupo de <i>B. cereus/B. thuringiensis</i> .

### 1.3 Tipificación de cepas de *B. thuringiensis*

Hasta la fecha se sabe que existen más de 50, 000 cepas de *B. thuringiensis*, que han sido aisladas y almacenadas en diferentes colecciones en todo el mundo (Joung & Coté, 2001). A partir de 1960 se empleó la técnica de serotipificación flagelar

(antígeno H) como herramienta para clasificarlas (De Barjac 1962) y se han descrito 69 serotipos H y 82 serovariedades (Lecadet *et al.* 1999). A este respecto conviene mencionar que el flagelo es una estructura de locomoción que se compone de tres partes: el cuerpo basal, el gancho y el filamento (figura 3). El cuerpo basal está anclado a la membrana citoplasmática y a la pared celular, y funciona como motor. Éste se encuentra constituido por un eje central que atraviesa un sistema de anillos. El gancho es una estructura flexible de acoplamiento entre el cuerpo basal y el filamento. El filamento es una fibra que hace posible la movilidad, y está constituido de copias de una sola proteína llamada flagelina, la cual es la responsable de la reacción inmunológica (Brock *et al.* 2006).

No sólo se ha empleado la reacción serológica para la clasificación de las cepas de *B. thuringiensis*, también se han empleado técnicas moleculares usando la amplificación del gen codificante de la flagelina (Xu & Côté 2006); RFLP (restriction fragment length polymorphism) usando como sondas DNA total de *B. thuringiensis* serovar *leesis*, digerido con *EcoRI* (Joung *et al.* 2001); RFLP usando como sondas fragmentos del 23S y 5S rRNA de *B. subtilis* (Joung & Côté 2001); PCR (polimerase chain reaction) con iniciadores aleatorios (Brosseau *et al.* 1993) y PCR basada en secuencias extragénicas repetidas (REP-PCR) (Reyes-Ramirez & Ibarra 2005). Es importante mencionar que todas las estrategias anteriores resultaron útiles en la clasificación de los diferentes serovares de *B. thuringiensis*, pues en todos los casos se lograron obtener secuencias o patrones únicos para cada serovar. Como información adicional se puede decir que de dichas estrategias, la que se refiere al análisis de la secuencia del gen de la flagelina, resulta una alternativa que pudiera reemplazar a la serotipificación, pues como describieron Xu & Côté (2006), pocos laboratorios tienen acceso a los 82 antisueros necesarios para la serotipificación de las cepas de *B. thuringiensis*, o bien no se cuenta con una colección completa de los 82 serovares de esta bacteria. Además, algunas cepas de *B. thuringiensis* no son serotipificables, pues son no móviles o se autoaglutinan, lo cual hace imposible su tipificación por métodos serológicos.

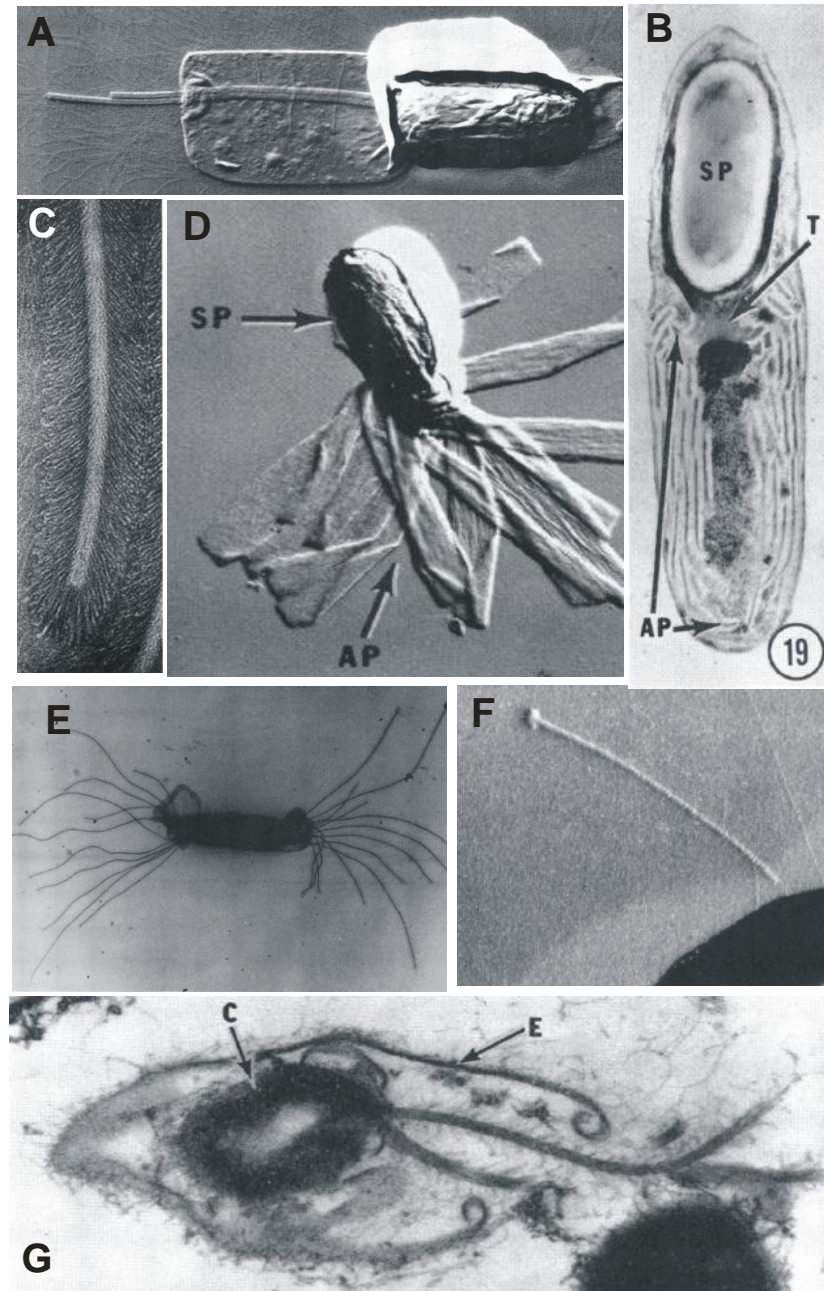


**Figura 3.** Estructura de un flagelo procariota (Brock *et al* 2006).

#### 1.4 Apéndices presentes en las esporas de los géneros *Clostridium* y *Bacillus*

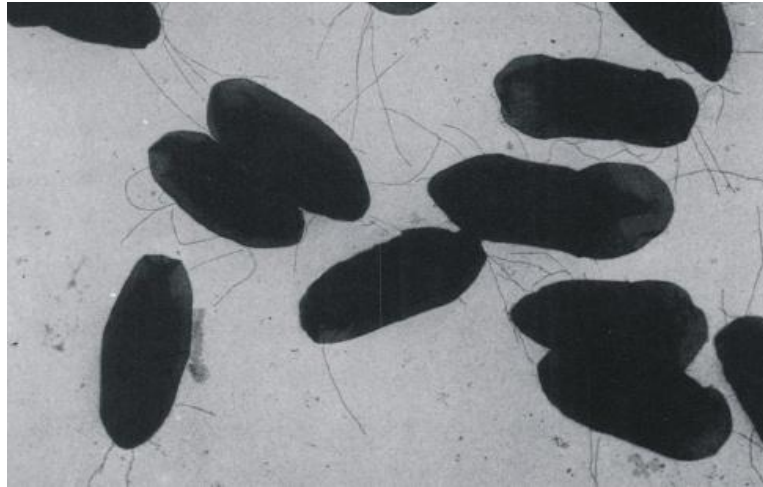
En la naturaleza existen esporas que pueden presentar apéndices o pilis; este fenómeno se ha reportado en bacterias anaeróbicas del género *Clostridium*. La forma de estos apéndices se ha descrito con apariencia tubular (Pope & Rode 1969; Yolton *et al.* 1968; Samsonoff, *et al.* 1970, Rode *et al.* 1967). En *C. bifermentans* y *C. sordellii*, este tipo de apéndices es de aspecto aplanado (figura 4D) y se presentan en grupos de 2 o 3 apéndices unidos a un extremo de la spora y ocasionalmente en ambos extremos de la misma; tienen una longitud aproximada de 3  $\mu\text{m}$  y 60 nm de ancho. La forma de “pluma” se describió en *C. bifermentans* (Pope *et al.* 1967) (figura 4A y 4B), donde este tipo de apéndices se encuentran unidos a la spora, y forman grupos de 11-13 unidos a través de un tronco basal, el cual atraviesa el exosporium (figura 4B); tienen una longitud de 14  $\mu\text{m}$ , y la particularidad de poseer un eje central, el cual mide de 15-22.5 nm de diámetro, y está tapizado de innumerables apéndices finos (1,100 a 1,200) distribuidos regularmente a lo largo del eje central. Estas finas estructuras tienen una longitud de 60 nm de largo y 2 nm de diámetro. El apéndice

en forma de “cinta” (figura 4C), se ha descrito ampliamente en *C. taeniosporum*, y se presentan en grupos de 12, los cuales están unidos a un extremo de la espora a través de un tronco común, y pueden ser lisos o estriados; además son relativamente delgados, y pueden medir entre 4.5  $\mu\text{m}$  de largo y 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho, presentando prolongaciones de 40 nm de largo por 5.2 nm de ancho (figura 4E). Cuando los apéndices se encuentran dentro de la célula madre (etapa VII del ciclo de esporulación, Rode *et al.* 1967), están orientados hacia un extremo de la célula y unidos a la espora a través del tronco basal, asumiendo una forma de espiral (figura 4D). Los apéndices en forma de “cinta” están conformados por cuatro proteínas, una de las cuales es una glicoproteína denominada GP85, la cual presenta dos formas, una glicosilada y otra no glicosilada. Además poseen una proteína denominada P29 con dos isoformas, P29a y P29b (Walker *et al.* 2007). Otro tipo de apéndices que se han descrito con menor detalle, son los que tienen forma de alfiler y bucle (Pope *et al.* 1967). De manera general, los apéndices presentes en el género *Clostridium* son solubles en ácidos diluidos (0.01%), y se desprenden con relativa facilidad si son sometidos a sonicación.



**Figura 4.** Micrografías electrónicas de transmisión de diversas especies de *Clostridium*, que muestran los diferentes tipos de apéndices presentes en las esporas de dicha especie. A) apéndices en forma tubular; B) esporangio maduro de *C. taeniosporu*; C) apéndices en forma de pluma; D) apéndices en forma de cinta; E) apéndices en forma de pluma dispuestos en ambos polos de la espora; F) filamento tipo alfiler; G) apéndices en forma de bucle. SP, espora; T, tronco común; AP, apéndices; C, cortex; E, exosporium. (Pope *et al.* 1967; Yolton *et al.* 1968).

Por otro lado, la presencia de apéndices en esporas de *B. cereus* también ha sido estudiado. En este caso tienen forma de “espada” y se encuentran agrupados (3-20 apéndices) formando una especie de “cola de pescado”, unidos al exosporium, con una longitud de 1.5-2.8  $\mu\text{m}$  de largo por 0.03-0.06  $\mu\text{m}$  de ancho (Mizuki *et al.* 1998,). Otro tipo de apéndices en *B. cereus* fue descrito por DesRosier & Lara (1981), los cuales se encuentran unidos a la superficie del exosporium de manera aleatoria. Dichos apéndices tienen un diámetro de 2  $\mu\text{m}$  de largo y 6.8 nm de ancho. En un estudio realizado por Staltheim & Granum (2001), se encontró que el peso molecular de la subunidad proteica que los constituye es de 35 kDa. Los apéndices referidos fueron asociados principalmente a fenómenos de adherencia (figura 5).



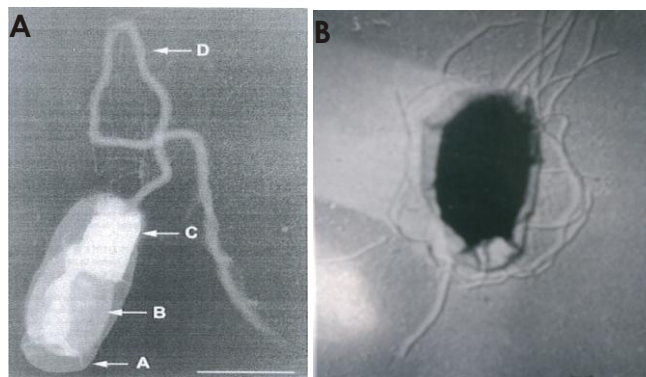
**Figura 5.** Tinción negativa de esporas de *Bacillus cereus* mostrando numerosos apéndices (Staltheim & Granum 2001).

### 1.5 Apéndices presentes en esporas de *B. thuringiensis*

La presencia de apéndices asociados a esporas de *B. thuringiensis* es un fenómeno poco estudiado; Smirnova *et al.* (1991) reportaron la presencia de apéndices (figura 6B) en cepas correspondientes a 10 serovares de *B. thuringiensis* (*thuringiensis*, *insectus*, *finitimus*, *morrisoni*, *darmstadiensis*, *kurstaki*, *gallarise*, *tenebrionis*,

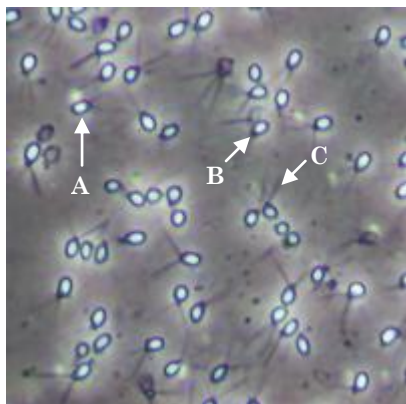
*israelensis* y *wuhanensis*). Dichos apéndices fueron de tres tipos: cilíndricos, tubulares y filamentosos. Los cilíndricos tenían una longitud de 4  $\mu\text{m}$  y un diámetro de 6-10 nm, se presentaban en forma de pequeños bucles de 2 nm de diámetro, en tanto que los tubulares tenían una longitud de 4-5  $\mu\text{m}$  de largo y un diámetro de 4 nm. Es importante mencionar que los apéndices tubulares, sólo estuvieron presentes en los 10 serovares estudiados, mientras que los apéndices filamentosos sólo se observaron en los serovares *finitimus*, *morrisoni*, *darmstadiensis*, *kurstaki* y *gallarie*; así mismo, los apéndices cilíndricos sólo se apreciaron en el serovar *israelensis*. Con estas mismas cepas se determinaron patrones de hemaglutinación con eritrocitos de rata, pollo y cobayo, encontrando que tanto los títulos, como los perfiles de hemaglutinación eran diferentes entre los diferentes serovares. Smirnova (1991) sugirió que los valores de hemaglutinación y el tipo de apéndices asociados a la espora podrían tener un fuerte valor taxonómico. Es conveniente resaltar que los apéndices descritos por Smirnova (1991), son muy diferentes a los que se encontraron en la cepa utilizada en el presente estudio, la Bt1-88, como se verá más adelante.

Por otro lado, en un estudio de aislamiento y caracterización de cepas de *B. thuringiensis* realizado por Rampersad y col. (2003), se encontró que una cepa (la Bt2-56) aislada de suelo, presentaba un apéndice proveniente de la superficie de la espora (figura 6A), así como un pequeño cuerpo proteico paraesporal. En este trabajo se sugirió que el papel del filamento podía estar asociado a la adherencia de la espora a las células epiteliales del intestino del organismo huésped.



**Figura 6.** La figura 6A muestra una micrografía electrónica de transmisión de una espora de Bt2-56, realizada con tinción negativa. A) Exosporium; B) espora; C) cuerpo paraesporal; D) filamento. La barra representa 1.2 micrómetros. (Rampersad *et al.* 2003). En 6B se observa una espora de *B. thuringiensis* con apéndices filamentosos (Smirnova *et al.* 1991).

## 1.6 Antecedentes de la cepa Bt1-88



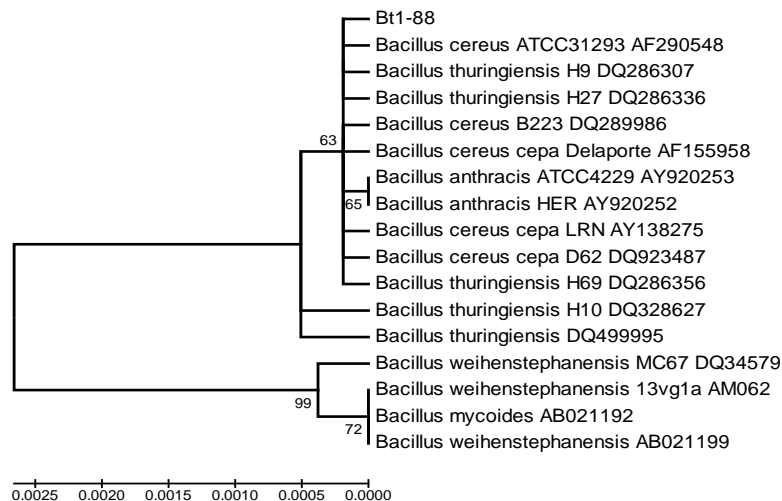
**Figura 7.** Micrografía de contraste de fases de Bt1-88, la cual muestra (A) espora, (B) cuerpo paraesporal; (C) filamento. Rampersad & Ammons, 2005.

La cepa Bt1-88 (figura 7), fue aislada a partir de excremento seco de rumiantes por Rampersad & Ammons (2005), de la University of West Indies en la isla de Trinidad, en Sudamérica. En ese mismo año fue donada al laboratorio de Enzimas Microbianas de la ENCB, para su estudio e identificación. La característica principal de Bt1-88 es que posee una espora con apéndices unidos a un posible microcristal.

Como parte de una investigación previa (tesis de Maestría realizada por Ventura Suárez 2007), se llevó a cabo la identificación de Bt1-88 utilizando dos técnicas: perfil fenotípico con el sistema API50CH de Biomeriux (Tabla 2), y la amplificación del gen 16S rDNA (figura 8). En ambos casos se concluyó que Bt1-88 pertenece al grupo *B. cereus/B. thuringiensis*.

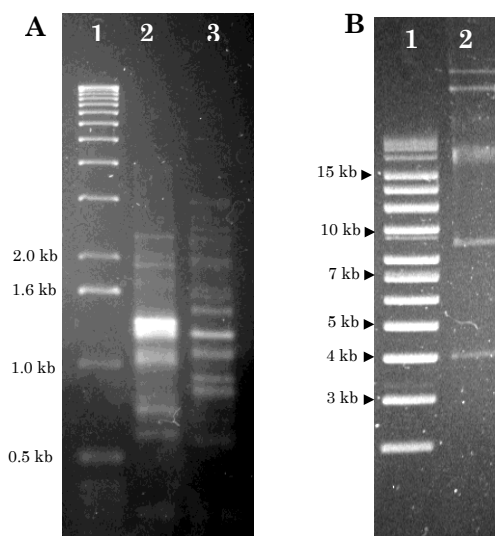
**Tabla 2.** Perfil bioquímico de la cepa Bt1-88, utilizando el sistema API50CH. Sólo se incluyen las pruebas que resultaron positivas; también se incluyen los datos obtenidos con dos cepas de *B. cereus* como referencia (IBC-1960 y FITC-60, Mizuki *et al.* 1998), y con una cepa de *B. thuringiensis* serovar *neoleonensis* (Bt-107).

Carbohidrato	Cepa				Carbohidrato	Cepa			
	FITC-60	IBC-1960	Bt1-88	Bt-107		FITC-60	IBC-1960	Bt1-88	Bt-107
NAG	+	+	+	+	D-Glucosa	+	+	+	+
Amigdalina	-	-	-	+	Glicerol	W	W	-	-
Arbutina	+	+	W	+	Glucógeno	-	-	W	+
Celobiosa	+	+	+	+	Ribosa	+	+	+	+
D-Turanosa	-	W	-	-	Salicilina	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	Almidón	+	+	+	+
Eritritol	-	-	-	+	Sucrosa	+	+	+	+
Esculina	+	+	+	+	Trealosa	+	+	+	+
D-Fructosa	+	+	+	+					
Gluconato	W	W	-	-					



**Figura 8.** Dendrograma obtenido con el agrupamiento de las secuencias del gen 16S rDNA de Bt1-88, utilizando el algoritmo Neighbor-Joinig (Ventura Suárez 2007).

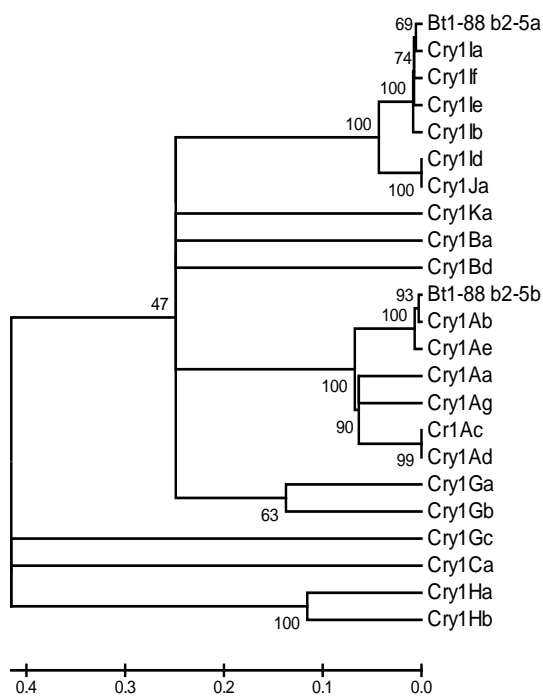
En el estudio referido, se intentó determinar también el serovar al cual pertenece Bt1-88, con base en su perfil de bandas utilizando los iniciadores Bc-Rep1 y Bc-Rep2 (Reyes-Ramírez & Ibarra 2005). Sin embargo, el resultado obtenido no coincidió con ninguno de los perfiles disponibles, correspondientes a cepas de *B. thuringiensis* (figura 9A). Se encontró además, que Bt1-88 presenta cuatro plásmidos uno de 4 y otro de 9 kb, además de dos plásmidos de más de 15 kb. Este perfil de plásmidos tampoco fue coincidente con los reportados para las cepas de *B. thuringiensis* estudiadas por Reyes-Ramírez & Ibarra (2005) (figura 9B). El



**Figura 9.** Resultados obtenidos de tipificación con RepPCR y perfil de plásmidos. En A se observa el perfil de bandas obtenido con los iniciadores Bc-Rep1 y Bc-Rep2 carril 1, marcadores de peso molecular, carril 2, *B. thuringiensis* serovar *higo*, carril 3, Bt1-88; en B se muestra el perfil de plásmidos de la cepa Bt1-88.

conjunto de resultados parecían indicar que se trataba de una nueva cepa (Ventura-Suárez, 2007).

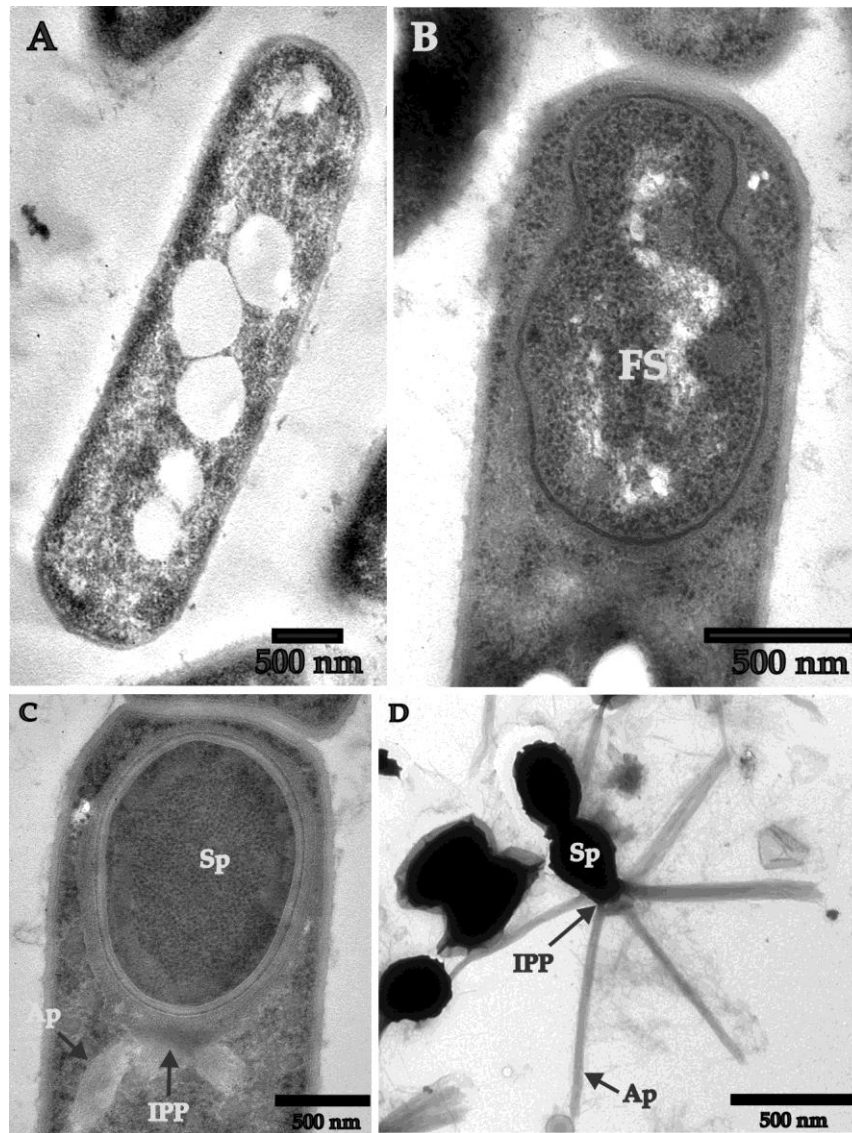
Otro aspecto abordado fue la búsqueda de genes *cry* utilizando los iniciadores universales descritos por Noguera & Ibarra (2010). Los resultados mostraron la presencia de dos genes *cry*, el *cry1Ab* y el *cry1I* (figura 10). Se ha descrito que el primero codifica a la proteínas Cry1Ab la cual es capaz de formar inclusiones cristalinas de forma bipiramidal, y el segundo codifica a una proteína soluble que se secreta durante la fase vegetativa de crecimiento. Considerando la presencia de estos dos genes, se realizaron bioensayos hacia dos insectos plaga modelo: *Manduca sexta* y *Aedes aegypti*, para investigar si Bt1-88 presentaba toxicidad hacia ellos, pues se ha reportado que los productos de estos genes presentan actividad tóxica contra lepidópteros (*M. sexta*) y dípteros (*A. aegypti*) (Bravo 1997). Los resultados fueron negativos en ambos casos, sugiriendo que los genes presentes en Bt1-88 no están codificando a proteínas tóxicas hacia ese tipo de insectos modelo; por lo que debería ensayarse un espectro más amplio de insectos que comprendiera nemátodos, himenópteros y coleópteros (Ventura Suárez 2007).



**Figura 10.** Dendrograma generado con las secuencias traducidas a aminoácidos codificados en los genes *cry*, detectados en la cepa Bt1-88, utilizando el algoritmo Neighbor-Joining (Ventura Suárez 2007).

Otro aspecto abordado fue el perfil exoenzimático de Bt1-88, con el fin de compararlo con el de otras cepas testigo de *B. thuringiensis*. Los resultados mostraron que dicho perfil es idéntico al de las cepas probadas, variando sólo en los niveles de producción, lo cual ocurre ordinariamente.

También se realizó un estudio cinético para conocer el desarrollo de la estructura espora-inclusión paraesporal-apéndices mediante microscopía óptica y electrónica, haciendo un análisis comparativo con el ciclo de esporulación descrito por Bechtel & Bulla (1976) para *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* cepa HD1. Los cambios morfológicos observados durante el crecimiento de Bt1-88 se muestran en la figura 11. Básicamente Bt1-88 presenta los 7 estadios descritos para la cepa HD1. Se encontraron pocas diferencias, entre ellas: que los mesosomas de Bt1-88 no participan en la síntesis del septo foroesporeal y la síntesis de la inclusión paraesporal ocurre en la etapa IV del ciclo de esporulación, mientras que para HD1 ocurre en la etapa III. Por último, la inclusión paraesporal se encuentra dentro del exosporium y los apéndices están constituidos por varias fibrillas (Ventura-Suárez *et al.* 2007).



**Figura 11.** Cambios intracelulares ocurridos en la cepa Bt1-88, durante el ciclo de esporulación. En A se muestra la fase vegetativa. En B la formación de la preespora (FS). En C se observa una espora aún inmadura, pero se puede apreciar la presencia de los apéndices (Ap) y la inclusión paraesporal (IPP). En D, la espora ya se encuentra libre; se pueden observar con claridad 5 apéndices unidos a la inclusión paraesporal.

Del trabajo referido (Ventura-Suárez 2007; Ventura-Suárez *et al.* 2007), se pudo concluir lo siguiente:

- Con base en los resultados obtenidos con el sistema API 50CH y a la secuencia del gen 16S rDNA, Bt1-88 pertenece al grupo *B. cereus*/*B. thuringiensis*.

- Dicha bacteria presenta cuatro plásmidos, uno de 4 y otro de 9 kb; además de dos plásmidos de más de 15 kb.
- La presencia de los genes *cry1Ab* y *cry1I*, permite clasificar a Bt1-88 como *B. thuringiensis*.
- A pesar de tener los genes *cry1Ab* y *cry1I*, la cepa Bt1-88 no fue tóxica a *Manduca sexta* ni a *Aedes aegypti*, cuando se realizaron bioensayos con los complejos espora-cristal-apéndices.
- No se pudo determinar el serovar de Bt1-88 con la técnica de Rep-PCR utilizada, pues no se encontró similitud con los perfiles reportados de los diferentes serovares de *B. thuringiensis*.
- Mediante microscopía electrónica de transmisión se determinó que Bt1-88 presenta 6 apéndices compuestos por varias fibrillas de 2 µm de largo, y la inclusión paraesporal es de tipo amorfo con un tamaño máximo de 100 nm.
- El ciclo de esporulación de Bt1-88 es, en general, similar al de la cepa patrón internacional *B. thuringiensis* HD-1 serovar *kurstaki*.
- Los apéndices presentes en la espora de Bt1-88 son semejantes a los que se presentan en *B. cereus*, en cuanto a ser altamente estables a diferentes ácidos y bases débiles, pero fácilmente solubilizados por NaOH 1N y KMnO<sub>4</sub> al 0.1%, sugiriendo una estructura similar a las fibras de colágena.

Con base en estos resultados, la investigación ahora reportada es una continuación, con la finalidad de indagar con más detalle la ultraestructura y la composición, tanto de los apéndices, como de la inclusión proteica paraesporal (IPP), presentes en la cepa Bt1-88, y adicionalmente determinar la serovariedad a la que pertenece.

## 2 JUSTIFICACIÓN

La presencia de apéndices unidos a inclusiones proteicas paraesporales en cepas de *B. thuringiensis*, es un fenómeno poco estudiado. Existe sólo un reporte, con la cepa Bt2-56, en el que se describe un filamento muy largo proveniente de la superficie de la espora, en cuyo extremo se encuentra un cristal proteico de forma cúbica (Rampersad *et al.* 2003). Por otra parte, los estudios previos realizados con la cepa Bt1-88 demostraron que ésta posee 6 apéndices filamentosos unidos a una inclusión proteica paraesporal ubicada dentro del exosporium. Hasta la fecha no existen reportes que hagan referencia a este tipo particular de estructuras en *B. thuringiensis*. Por lo tanto, la presente investigación, proporcionará información relevante de tipo morfológico y bioquímico referentes a estas novedosas estructuras subcelulares.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 General

Aislar, purificar y caracterizar morfológica y bioquímicamente, la inclusión proteica paraesporal (IPP) asociada a seis apéndices filamentosos, producidos por la cepa Bt1-88 de *B. thuringiensis*.

#### 3.2 Particulares

- Aislar y purificar la IPP y los apéndices presentes en la espora de Bt1-88.
- Estudiar bioquímica y electroforéticamente la IPP y los apéndices asociados, previamente purificados.
- Tipificar molecularmente (alelo *hag*) la cepa Bt1-88.
- Secuenciar los extremos amino terminal de las proteínas presentes en las IPPs, previamente purificadas.
- Determinar los genes que codifican tanto a las proteínas de las IPPs como a las proteínas de los filamentos, mediante mutaciones aleatorias con transposones.
- Ensayar la toxicidad de los cristales purificados de Bt1-88, contra larvas de *Manduca sexta* y de *Aedes aegypti*

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Microorganismos y su conservación

La cepa Bt1-88 fue donada por el Dr. David Ammons, de la Universidad de West Indies en la isla de Trinidad, en Sudamérica. Fue aislada a partir de excremento seco de rumiantes, y fue previamente identificada como *B. thuringiensis*, mediante pruebas bioquímicas, análisis del gen 16S rDNA y presencia de genes *cry* (Ventura-Suárez 2007).

Para su conservación a largo plazo se liofilizaron esporas, las cuales se conservaron en refrigeración. Para su conservación a corto plazo, la bacteria se sembró en viales conteniendo agar nutritivo inclinado; éstos se incubaron a 28 °C durante 96 h, y posteriormente se guardaron en refrigeración a 4 °C. .

### 4.2 Determinación del tiempo óptimo de crecimiento de Bt1-88

Para corroborar el tiempo en el cual Bt1-88 alcanza un óptimo crecimiento y ha completado la formación de la estructura espora-cristal-apéndices, se realizó una cinética de crecimiento en cultivo sumergido en medio G ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0005 g;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.005 g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.005 g;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.05 g;  $\text{CaCl}_2$ , 0.025 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.5 g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 g; extracto de levadura, 2 g; glucosa, 1 g; pH 7.0) (Nakata & Halvorson 1960). El cultivo fue sincronizado realizando tres pases previos de 12 h cada uno en medio G, incubando a 28 °C y 180 rpm. Se tomaron muestras a las 6, 24, 36, 48 y 72 h. Las cuales fueron procesadas para su observación mediante microscopía electrónica de transmisión.

#### 4.2.1 Protocolo general para observación de muestras biológicas, mediante microscopía electrónica de transmisión (MET)

Se tomaron de 1.5-3 mL de cultivo. Las muestras se centrifugaron a 8,000 rpm por 5 min. El botón se fijó con 1 mL de glutaraldehído (glutaraldehído 3%;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1 M- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1 M; pH 7) durante dos horas. Posteriormente se lavaron 3 veces

con 1.5 mL de solución lavadora ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1 M;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1 M; Sacarosa 10%;  $\text{CaCl}_2$  0.001%; pH 7). Las células se postfijaron con tetraóxido de osmio al 1% durante 2 h, a temperatura ambiente y se lavaron en tres ocasiones con solución lavadora. Se deshidrataron introduciéndola en soluciones de etanol a concentración creciente de 50-100 %, dejando la muestra 10 min en cada caso. Después se introdujeron en mezclas de etanol-óxido de propileno (relación 2:1; 1:1; 1:2 y óxido de propileno puro), cada 30 min. La muestra se preincluyó 4 h en mezclas de resina (EMbed812)-óxido de propileno (relación 1:2, 1:1 y 2:1). Posteriormente se incluyó en resina pura. Las muestras se polimerizaron a 60 °C durante 24 h. La obtención de cortes ultrafinos (50-90 nm) se realizó con una cuchilla de diamante. Dichos cortes se montaron en rejillas de cobre de 200 mallas (mesh). Las preparaciones se contrastaron con acetato de uranilo por 20 min, y con citrato de plomo de Reynolds por 20 min. Finalmente se observaron en el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1010, a diferentes magnificaciones, a una aceleración de voltaje de 60 kV.

### **4.3 Aislamiento de los apéndices y la inclusión proteica paraesporal**

Bt1-88 se cultivó en placas de medio G sólido durante 72 h a 28 °C, hasta la obtención de esporas libres. Una vez terminado el tiempo de incubación, las esporas fueron recuperadas adicionando 5 mL de agua destilada estéril en cada placa. En total se colectó la biomasa cultivada en 40-50 placas de medio G, para cada experimento. La suspensión de esporas se lavó en tres ocasiones con 30 mL de agua destilada estéril, y después se calentó en baño maría a 65 °C durante 30 min, para eliminar las células vegetativas. Después se centrifugó y se lavó la suspensión una vez más, con 30 mL de agua destilada estéril. Después de una nueva centrifugación, la pastilla se resuspendió en 10 mL de agua destilada, y se sometió a sonicación durante 10 min, con pulsos de 9.9s:5s de sonicación:enfriamiento. La muestra tratada se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 min, y el sobrenadante conteniendo los filamentos fue recuperado y almacenado en refrigeración a 4 °C hasta su uso. Por su parte, el sedimento fue sometido a una nueva sonicación durante 10 min, para llevar

el cabo el rompimiento de las esporas restantes. Para todos los tratamientos de sonicación, se empleó un Ultrasonic Homogenizer de 20 kHz, al 35 % de amplitud.

#### **4.4 Purificación de los apéndices y la inclusión proteica paraesporal**

Debido a que las estructuras de interés se obtienen mezcladas con restos celulares, fue necesario purificar tanto los apéndices como las IPP, para ello se utilizaron las siguientes estrategias.

##### **4.4.1 Recuperación de las inclusiones proteicas paraesporales**

El sedimento obtenido en el apartado 4.3, el cual contiene, entre otras cosas, las IPP libres, se resuspendió en 6 mL de agua destilada. Dicha suspensión se fraccionó en un gradiente discontinuo de sacarosa formado por una serie de capas de 2 mL de sacarosa al 79, 75, 67, 63 y 59 %, además de 1.5 mL de sacarosa al 40 %. La muestra se centrifugó a 20,000 rpm durante 1 h a 4 °C en una ultracentrífuga Beckman, utilizando un cabezal de columpio 40Ti. Una vez terminado el tiempo de centrifugación, el material suspendido en las diferentes bandas fue recuperado, y observado al microscopio de contraste de fases, para su análisis rápido, y posteriormente al microscopio electrónico de transmisión para un análisis más detallado.

Las IPP fueron sometidas a un segundo paso de purificación, para ello se recuperó la banda de interés, se lavó en tres ocasiones con 3 mL de agua destilada, y la pastilla final se resuspendió en 1 mL de agua destilada. Esta suspensión se fraccionó nuevamente en un gradiente discontinuo, compuesto de varias capas de 2 mL cada una, de soluciones de sacarosa al 68, 66, 64, 62, 60 y 58 %. La muestra colocada en la parte superior del gradiente, se centrifugó a 20,000 rpm durante 1 h a 4 °C. La banda conteniendo las IPP fue colectada con una pipeta Pasteur, y lavada en tres ocasiones por centrifugación con 3 mL de agua destilada, para eliminar la sacarosa. En ambos pasos de purificación, las bandas fueron analizadas tanto en el microscopio de contraste de fases, como en el microscopio electrónico de transmisión,

para corroborar su grado de pureza. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry y col. (1951), utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

#### **4.4.2 Tinción negativa de las estructuras de interés, para su observación mediante MET**

Para corroborar el grado de pureza y la integridad de las estructuras de interés, se realizaron tinciones negativas durante los diferentes pasos de purificación. El protocolo utilizado fue el siguiente: se colocó una gota de la suspensión problema, sobre un cuadro de 3x3 cm de parafilm. Posteriormente se colocó una rejilla de cobre cubierta con Formvar sombreada con carbón y se dejó adsorber por 20 min. La rejilla se dejó secar a temperatura ambiente; ya seca, se contrastó con acetato de uranilo al 0.5% por 30 s. Finalmente se observó a diferentes magnificaciones, empleando una aceleración de 60 kV, en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1010.

#### **4.4.3 Purificación de los apéndices**

El sobrenadante obtenido en el apartado 4.3, fue concentrado por precipitación adicionando dos volúmenes de etanol frío, dejando reposar en congelación durante toda la noche. Los apéndices precipitados fueron recuperados por centrifugación a 8,000 rpm durante 10 min. La pastilla obtenida se resuspendió en 4 mL de agua destilada, y se colocó en la superficie de un gradiente discontinuo compuesto por capas de 4 mL de sacarosa al 59, 45 y 38% (Dimmitt & Simon 1971). La muestra se centrifugó a 25,000 rpm durante 4 h. Las bandas fueron recuperadas con una pipeta Pasteur, y dializadas contra agua destilada durante toda la noche para eliminar la sacarosa. Posteriormente se realizaron tinciones negativas de cada banda, para determinar en cuál de ellas habían quedado los apéndices. Por último, las bandas que contenían los apéndices se liofilizaron. La concentración de proteínas se determinó con el método de Lowry (Lowry *et al.* 1951), utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

#### 4.4.4 Determinación de proteínas por el método de Lowry

En tubos de ensayo de 13×150 mm se colocaron 700  $\mu\text{L}$  de las muestras y se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de NaOH 1 N. Los tubos se calentaron en baño maría a ebullición durante 10 min, y después se enfriaron a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 2.5 mL del reactivo D, y se dejaron reposar 15 min a temperatura ambiente. El reactivo D se preparó al momento de ser utilizado, mezclando 100 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2 % en NaOH 0.1 N; 1 mL de  $\text{Cu SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  al 1%, y 1 mL de tartrato de sodio y potasio al 2 %. Luego, se agregaron 500  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin (diluido 1:1 con agua desionizada). Los tubos se incubaron a 37 °C en la oscuridad, durante 30 min, y se leyó su absorbencia a 750 nm en un espectrofotómetro Thermo Spectronic modelo BioMate 3 (Lowry *et al.* 1951).

#### 4.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se emplearon geles de poliacrilamida al 15% (Laemmli & Favre 1973). Las muestras concentradas por liofilización se resuspendieron en 500  $\mu\text{L}$  de agua destilada, y se dejaron hidratar durante toda la noche. Después se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  y se mezcló con 50  $\mu\text{L}$  de regulador de carga 2x (SDS al 4%; Glicerol al 20%; tris-HCl 0.1M, pH 6.8; azul de bromofenol al 0.01%), 40  $\mu\text{L}$  de agua desionizada y 10  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol. Las muestras se calentaron en baño maría a ebullición durante 5 min. Después se realizaron los cálculos correspondientes, para cargar en el gel 20  $\mu\text{g}$  de proteína total en cada pozo. Las corridas electroforéticas se realizaron a 45 V durante una hora y posteriormente a 95 V durante 4.5 h.

##### 4.5.1 Revelado con azul de Coomassie

Los geles fueron teñidos de acuerdo con el protocolo descrito por Wang y col. (2007). Este consiste en que una vez terminada la electroforesis, los geles se fijaron durante 1 h sumergiéndolos en 100 mL de una mezcla de ácido acético glacial-etanol al 96%-metanol-agua (1:1:4:6). Después se sumergió el gel en 100 mL de solución de sensibilización (ácido acético 1%;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10%), dejándose 2 h en agitación suave.

La tinción se realizó sumergiendo el gel en 150 mL de ácido acético al 5%; etanol al 45%; azul brillante de Coomassie R al 0.125%; dejando en reposo durante toda la noche. Se eliminó el exceso de colorante sumergiendo los geles en 100 mL de ácido acético al 5%; etanol al 40%, durante una hora. Por último los geles se transfirieron a 150 mL de ácido acético al 3%; etanol al 30%, hasta que se observó que el fondo del gel era claro (aproximadamente 1-2 h).

#### **4.5.2 Revelado con ácido peryódico de Schiff (PAS)**

Después de la electroforesis, los geles se fijaron con 100 mL de ácido tricloroacético durante 30 min. Se realizaron dos lavados con 100 mL de agua destilada, durante 10 min cada uno. Posteriormente los geles se oxidaron con 50 mL de ácido peryódico al 1% durante 30 min. Después se lavaron en dos ocasiones con 100 mL de agua destilada durante 10 min cada uno. Para el desarrollo de color, los geles se sumergieron en 50 mL del reactivo de Schiff (fucsina decolorada con SO<sub>2</sub>) durante 2 h. Para estabilizar la coloración de las bandas, los geles se colocaron en 100 mL de metabisulfito de sodio al 1% durante 2 h y luego se lavaron con 100 mL de agua destilada (Zacharius *et al.* 1969).

#### **4.6 Secueciación N-terminal**

Para determinar la secuencia aminoacídica en el extremo N-terminal de las proteínas contenidas en el complejo IPP/filamentos de Bt1-88, estos se solubilizaron y separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (Laemmli & Favre 1973). Posteriormente, las bandas proteicas fueron enviadas para su análisis secuencial, al Dr Klaus Linse, de la Universidad de Texas, con sede en Austin, Tx. USA.

#### **4.7 Hidrólisis de los apéndices purificados**

La muestra conteniendo los apéndices purificados fue concentrada por liofilización, obteniéndose aproximadamente 5.5 mg de proteína total. Una vez secas,

las muestras se resuspendieron en 1 mL de agua desionizada y se transfirieron a un tubo de vidrio con tapón de rosca, y ahí se adicionó 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N (Yolton *et al.* 1972). Las muestras se calentaron en baño de aceite a 100 °C durante 4 h, y la acidez fue neutralizada adicionando 10 mL de Ba(OH)<sub>2</sub> al 30 %. El precipitado de BaSO<sub>4</sub> fue eliminado por centrifugación a 10,000 rpm por 10 min.

#### **4.8 Presencia de carbohidratos en los apéndices de Bt1-88**

Bajo la hipótesis de que los apéndices están constituidos por glicoproteínas, se determinaron cuali y cuantitativamente los monosacáridos presentes en dichas estructuras, previamente purificadas. Los tres grupos de carbohidratos que se evaluaron por métodos colorimétricos fueron: carbohidratos neutros como glucosa, manosa y ramnosa; hexosaminas como glucosamina, y además hexosaminas N-acetiladas como la N-acetil-D-glucosamina. Las técnicas utilizadas se describen a continuación.

##### **4.8.1 Cuantificación de carbohidratos neutros**

Una vez que se obtuvieron las muestras hidrolizadas y neutralizadas, como se refirió en el rubro 4.7, se tomó una muestra de 500 µL a la cual se le adicionaron 50 µL de fenol al 80%, y se mezcló cuidadosamente. Posteriormente se adicionaron 1.25 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se agitó vigorosamente. Los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y la absorbencia se leyó a 490 nm. Los resultados obtenidos se interpolaron en una curva tipo de glucosa en el intervalo de 10-50 µg/mL (Dubois *et al.* 1956).

##### **4.8.2 Cuantificación de hexosaminas**

Se tomaron 100 µL de muestra hidrolizada y neutralizada, a la cual se le adicionaron 100 µL del reactivo de acetilacetona (acetilacetona al 4 % en carbonato de sodio 1.25 N). Las muestras se llevaron a 105-110 °C en una autoclave durante 5 min, y en seguida se transfirieron a un baño de hielo para detener la reacción. Una vez que

se enfriaron, se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto, y después 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de Earlich (1.6 g de para-dimetilaminobenzaldehído, en una mezcla 30:30 de etanol absoluto-HCl concentrado). Posteriormente se incubó en baño maría a 65 °C durante 10 min, y luego los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Finalmente se leyó la absorbancia a 530 nm. Los resultados obtenidos se interpolaron en una curva tipo de glucosamina de 20-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Morgan & Elson 1934)

#### 4.8.3 Cuantificación de hexosaminas N-acetiladas

En este caso se tomaron 250  $\mu\text{L}$  de muestra hidrolizada y neutralizada, a la cual se le adicionaron 40  $\mu\text{L}$  de tetraborato de potasio 0.8 M. Luego se mezcló bien y se incubó en baño maría a ebullición por exactamente 3 min. Los tubos se enfriaron en baño de agua y se les adicionó 1 mL del reactivo para-dimetil-amino-benzaldehído (DMAB), diluido 1:10 en ácido acético glacial (10 g de DMAB disuelto en una mezcla de 87.5 mL de ácido acético glacial y 12.5 mL de HCl concentrado). Después se incubó a 37 °C durante 20 min para el desarrollo de color. Finalmente se leyó la absorbancia a 585 nm y los resultados se interpolaron en una curva tipo de N-acetil-D-glucosamina de 20-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Reissig *et al.* 1955).

#### 4.9 Identificación de los carbohidratos detectados

Una vez que se cuantificaron los carbohidratos presentes en los apéndices purificados, con base en los grupos químicos a que pertenecen; se procedió a su identificación individual mediante cromatografía en capa fina. Para ello se tomaron 300  $\mu\text{L}$  de apéndices hidrolizados (aproximadamente 800  $\mu\text{g}$  de carbohidratos totales), y se aplicaron en una placa de sílica gel de 20×20 cm, muestras individuales de 2  $\mu\text{L}$ , hasta completar un volumen de 300  $\mu\text{L}$ . Así mismo se aplicaron 13  $\mu\text{L}$  de las siguientes soluciones estándar: glucosa, manosa, galactosa, fructosa, glucosamina, N-acetilglucosamina,  $\alpha$ -metilglucósido,  $\alpha$ -metilmanósido y celobiosa, todas ellas a una concentración de 60  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ .

El solvente de corrimiento fue una mezcla de n-butanol-metanol-amoniaco al 25%-agua, en proporciones 50:40:20:10. La cámara de corrimiento se dejó saturar con

el mismo solvente de desarrollo durante 24 h, y en seguida se corrió en forma ascendente hasta que el frente del solvente de corrimiento estaba por alcanzar el extremo superior del cromatograma (aproximadamente 1 cm). Éste se dejó secar a temperatura ambiente y se asperjó finalmente con los siguientes reveladores (Manual Merck para cromatografía, sin año de publicación):

Los cromatogramas se revelaron con los siguientes reactivos:

- **Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC).** Antes de utilizarse se mezcló un volumen de TTC al 4% en metanol, con un volumen de NaOH 1N en metanol. Esta mezcla se asperjó sobre el cromatograma, y después se calentó a 110 °C por al menos 5 min, hasta la aparición de manchas rojas sobre un fondo blanco o ligeramente rosado. Este reactivo se utiliza para revelar azúcares reductores, esteroides, glucósidos y tioácidos.
- **Reactivo de Elson-Morgan.** Previamente se prepararon por separado dos soluciones pulverizables. La solución I se preparó al momento de ser utilizada, mezclando 0.5 mL de una mezcla de KOH al 50% y 20 mL de etanol absoluto, con 10 mL de una mezcla de 0.5 mL de acetilacetona en 50 mL de n-butanol. La solución II se preparó disolviendo 1 g de para-dimetilaminobenzaldehído disuelto en una mezcla de etanol absoluto-HCl concentrado 30:30 (v:v). Después de asperjar la solución I, el cromatograma se calentó a 105 °C por 5 min e inmediatamente después se asperjó con la solución II. A los pocos segundos aparecieron manchas de color morado intenso. Esta técnica se utiliza para el revelado de aminoazúcares.
- **Reactivo de la antrona.** La solución se preparó disolviendo 0.3 g de antrona en 10 mL de ácido acético glacial. A la solución obtenida se le agregaron 20 mL de alcohol etílico absoluto, 3 mL de ácido fosfórico al 85% y 1 mL de agua. Después se asperjó el cromatograma, y se calentó 5-6 min a unos 110 °C. Las cetosas y los oligosacáridos que contienen cetosas, aparecieron como manchas amarillas. Ésta técnica es útil para diferenciar aldosas de cetosas.

#### 4.10 Extracción de DNA genómico

Para realizar la extracción del DNA genómico de la cepa Bt1-88, ésta se creció masivamente en una placa de YT (tripotona 1%-extracto de levadura 0.5%-NaCl 0.5%), y se incubó a 28 °C durante toda la noche. Después se tomó una muestra del cultivo con un hisopo estéril y se inocularon dos placas de YT, las cuales se dejaron incubar a 28 °C durante 5 h aproximadamente, hasta que el crecimiento fue visible. Las células jóvenes se recuperaron con una varilla acodada, adicionando 1 mL de regulador Tris 50 mM-EDTA 10 mM pH 7.4. Las células se lavaron en tres ocasiones con 1.5 mL del mismo regulador. En el último lavado, las células, se resuspendieron en 200 µL de regulador Tris-EDTA y se adicionaron 200 µL de lisozima (10 mg/mL) disuelta en una mezcla que contiene: glicerol 50%; Tris 50 mM pH 8.0; NaCl 100 mM; EDTA 0.1 mM; Triton X-100 0.1%. Se dejó incubar por una hora a 37 °C, y luego se adicionaron 10 µL de RNAsa A (10 mg/mL), dejándose incubar 15 min más. Después se adicionaron 200 µL de SDS al 10%, y se agitó suavemente hasta que la suspensión se tornó translúcida. A la suspensión se le adicionaron 600 µL de fenol-cloroformo (3:1), y se mezcló suavemente por varios minutos. Se recuperó la fase acuosa y se le adicionaron 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2. El DNA genómico se precipitó adicionando 1 volumen de isopropanol frío, la mezcla se dejó reposar a -20 °C durante 2 h. La mezcla se centrifugó a 15,000 rpm por 15 min, y el DNA se lavó en dos ocasiones con etanol al 70%. Luego se dejó secar a temperatura ambiente por 30 min, y el DNA se resuspendió en 50 µL de regulador TE 0.1x (Tris 10 mM pH 7.4; EDTA 1 mM).

#### 4.11 Amplificación del gen *hag*

La mezcla para la PCR contenía lo siguiente: KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM; 0.2 mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP); 2.5 U de Taq polimerasa; Triton X-100 1.5 %; DNA molde 200 ng y 20 pmoles/µL de los iniciadores Bthag-F1 (5'-AGT ACA TGC GCC AAA ACC AAG) y Bthag-R1 (5'-GTT TGC TTG AGA AAG CAT GCT) (Xu and Cote, 2006); también se usaron los iniciadores BTFlaA3 (5'-ACA AAT ATT AAT AGC ATG CG-3') y BTFlaA4 (5'-TTG TAA TAA TTT AGA AGC C-3') (Guzmán-Chávez

2011). Las condiciones usadas para la PCR fueron 2 min de desnaturalización inicial a 95 °C, seguido de 15 s a 95 °C; 30 s a 54 °C y 1.5 min a 72 °C. Este ciclo se repitió 30 veces. Las condiciones para el segundo par de iniciadores fueron 5 min de desnaturalización inicial a 94 °C, seguido de 30 s a 95 °C; 30 s a 50 °C y 1.5 min a 72 °C. Este ciclo se repitió 30 veces. Una vez terminada la PCR, los fragmentos formados se separaron en un gel de agarosa al 1%-bromuro de etidio (10mg/mL) usando regulador de borato de sodio 100 mM pH 8.5 (Brody & Scott 2004), a un voltaje de 100 V/h. Como estándar, se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb (Promega).

#### **4.11.1 Purificación del DNA separado previamente en geles de agarosa**

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 90  $\mu$ L, y los fragmentos sintetizados se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 0.7 %. Las bandas de interés fueron cortadas con un cubreobjetos, y el bloque se colocó en un tubo de 0.6 mL y se dejó a -20 °C toda la noche. Después las muestras se centrifugaron a 15,000 rpm por 30 s. El líquido obtenido fue transferido a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Luego se le adicionó 0.1 vol. de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y se mezcló perfectamente. Posteriormente se le adicionaron 2.5 vol. de etanol frío y se dejó reposar a -20 °C, durante una hora. La muestra se centrifugó a 15,000 rpm por 15 min. El DNA recuperado se lavó en dos ocasiones con 1 mL de etanol al 70 %. Después el botón se dejó secar a temperatura ambiente por 30 min, y se resuspendió en 15  $\mu$ L de Tris 10 mM pH 7.4. La concentración del DNA se midió en un NanoDrop 1000 Spectrophotometer, tomando 2  $\mu$ L de muestra (Tautz & Renz 1982).

#### **4.11.2 Secuenciación**

Para las reacciones de secuenciación se utilizó el kit Quick Start (Beckman Coulter). La mezcla de PCR consistió de lo siguiente: 4  $\mu$ L de reactivo DTCS; 1  $\mu$ L del iniciadores Bthag-F1 (1.6  $\mu$ M); 60 ng de DNA molde y el volumen se ajustó a 10  $\mu$ L con agua destilada estéril. Las condiciones de la PCR fueron, 10 s a 94 °C, 15 s a 55 °C y 4 minutos a 65 °C. Este ciclo se repitió 35 veces. Una vez terminada la PCR, la

reacción se detuvo adicionando 2.5  $\mu$ L de “regulador de terminación” (1  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M pH 5.2, 1  $\mu$ L de EDTA 100 mM pH 8 y 0.5  $\mu$ L de glucógeno). La mezcla se centrifugó inmediatamente a 15,000 rpm por 15 min a 4 °C. El botón obtenido se lavó en tres ocasiones con etanol frío al 75 %. Después se dejó secar a temperatura ambiente en una microcentrífuga con vacío, y se resuspendió en 25  $\mu$ L de regulador de carga (Beckman). La muestra se inyectó en un secuenciador CEQ 8800 Beckman Coulter. El tiempo de corrida fue de 90 min y el tiempo de inyección fue de 15 s.

#### 4.11.3 Análisis bioinformático

Las secuencias obtenidas fueron depuradas y analizadas mediante BioEdit (Hall 1999). Cada secuencia fue analizada mediante análisis BLAST v2.2.14 (Altschul et al. 1990) de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); los alineamientos fueron realizados utilizando el algoritmo Clustal W (Thompson *et al.* 1994), y el dendograma fue construido mediante el algoritmo de Neighbor Joining (Saitou & Nei 1987). El análisis filogenético fue realizado mediante el uso del programa MEGA4 (Tamura *et al.* 2007). El bootstrap fue realizado mediante 1000 replicaciones (Felsenstein 1985). Para el análisis se utilizaron las 82 secuencias del gen *hag* reportadas previamente y consignadas en la tabla 3 (Xu & Coté, 2006).

**Tabla 3.** Secuencias del gen *hag* usadas para la construcción del dendograma requerido para la tipificación de Bt1-88.

Cepa	Serotipo	GenBank	Cepa	Serotipo	GenBank
<i>B. thuringiensis</i> serovar thuringiensis	1	DQ377245	<i>B. thuringiensis</i> serovar leesis	33	DQ377272
<i>B. thuringiensis</i> serovar finitimus	2	DQ377243	<i>B. thuringiensis</i> serovar konkukian 97-27	34	YP_035879
<i>B. thuringiensis</i> serovar alesti	3a,3c	X67138	<i>B. thuringiensis</i> serovar seoulensis	35	DQ377273
<i>B. thuringiensis</i> serovar kurstaki	3a,3b,3c	DQ377225	<i>B. thuringiensis</i> serovar malaysiensis	36	DQ377235
<i>B. thuringiensis</i> serovar sumiyoshiensis	3a,3d	DQ377246	<i>B. thuringiensis</i> serovar andaluciensis	37	DQ377236
<i>B. thuringiensis</i> serovar fukuokaensis	3a,3d,3e	DQ377247	<i>B. thuringiensis</i> serovar oswaldocruzi	38	DQ377274
<i>B. thuringiensis</i> serovar sotto	4a,4b	DQ377248	<i>B. thuringiensis</i> serovar brasiliensis	39	DQ377237
<i>B. thuringiensis</i> serovar kenyaensis	4a,4c	DQ377249	<i>B. thuringiensis</i> serovar tochiensis	19	DQ377259
<i>B. thuringiensis</i> serovar galleriae	5a,5b	DQ377225	<i>B. thuringiensis</i> serovar yunnanensis	20a,20b	DQ377260
<i>B. thuringiensis</i> serovar canadensis	5a,5c	DQ377227	<i>B. thuringiensis</i> serovar pondicheriensis	20a,20c	DQ377261
<i>B. thuringiensis</i> serovar entomocidus	6	DQ377250	<i>B. thuringiensis</i> serovar colmeri	21	DQ377262
<i>B. thuringiensis</i> serovar aizawai	7	DQ377228	<i>B. thuringiensis</i> serovar shandongensis	22	DQ377263
<i>B. thuringiensis</i> serovar morrisoni	8a,8b	DQ377229	<i>B. thuringiensis</i> serovar japonensis	23	DQ377264
<i>B. thuringiensis</i> serovar ostriniae	8a,8c	DQ377251	<i>B. thuringiensis</i> serovar neoleonensis	24a,24b	DQ377265
<i>B. thuringiensis</i> serovar nigeriensis	8b,8d	DQ377252	<i>B. thuringiensis</i> serovar novosibirsk	24a,24c	DQ377317
<i>B. thuringiensis</i> serovar tolworthi	9	DQ377253	<i>B. thuringiensis</i> serovar coreanensis	25	DQ377232
<i>B. thuringiensis</i> serovar darmstadiensis	10a,10b	DQ377242	<i>B. thuringiensis</i> serovar silo	26	DQ377266
<i>B. thuringiensis</i> serovar londrina	10a,10c	DQ377230	<i>B. thuringiensis</i> serovar mexicanensis	27	DQ377267
<i>B. thuringiensis</i> serovar toumanoffi	11a,11b	DQ377254	<i>B. thuringiensis</i> serovar monterrey	28a,28b	DQ377233
<i>B. thuringiensis</i> serovar kyushuensis	11a,11c	DQ377255	<i>B. thuringiensis</i> serovar jegathesan	28a,28c	DQ377234
<i>B. thuringiensis</i> serovar thompsoni	12	DQ377294	<i>B. thuringiensis</i> serovar amagiensis	29	DQ377268
<i>B. thuringiensis</i> serovar pakistani	13	DQ377256	<i>B. thuringiensis</i> serovar medellin	30	DQ377269
<i>B. thuringiensis</i> serovar israelensis	14	DQ377244	<i>B. thuringiensis</i> serovar toguchini	31	DQ377270
<i>B. thuringiensis</i> serovar dakota	15	DQ377231	<i>B. thuringiensis</i> serovar cameroun	32	DQ377271
<i>B. thuringiensis</i> serovar indiana	16	DQ377257	<i>B. thuringiensis</i> serovar leesis	33	DQ377272
<i>B. thuringiensis</i> serovar tohokuensis	17	DQ377258	<i>B. thuringiensis</i> serovar konkukian 97-27	34	YP_035879
<i>B. thuringiensis</i> serovar kumamotoensis	18a,18b	DQ377293	<i>B. thuringiensis</i> serovar seoulensis	35	DQ377273
<i>B. thuringiensis</i> serovar yosoo	18a,18c	DQ377300	<i>B. thuringiensis</i> serovar malaysiensis	36	DQ377235
<i>B. thuringiensis</i> serovar tochiensis	19	DQ377259	<i>B. thuringiensis</i> serovar andaluciensis	37	DQ377236
<i>B. thuringiensis</i> serovar yunnanensis	20a,20b	DQ377260	<i>B. thuringiensis</i> serovar oswaldocruzi	38	DQ377274
<i>B. thuringiensis</i> serovar pondicheriensis	20a,20c	DQ377261	<i>B. thuringiensis</i> serovar brasiliensis	39	DQ377237
<i>B. thuringiensis</i> serovar colmeri	21	DQ377262	<i>B. thuringiensis</i> serovar huazhongensis	40	DQ377320
<i>B. thuringiensis</i> serovar shandongensis	22	DQ377263	<i>B. thuringiensis</i> serovar sooncheon	41	DQ377275
<i>B. thuringiensis</i> serovar japonensis	23	DQ377264	<i>B. thuringiensis</i> serovar jinghongensis	42	DQ377238
<i>B. thuringiensis</i> serovar neoleonensis	24a,24b	DQ377265	<i>B. thuringiensis</i> serovar guiyangensis	43	DQ377239
<i>B. thuringiensis</i> serovar novosibirsk	24a,24c	DQ377317	<i>B. thuringiensis</i> serovar higo	44	DQ377301
<i>B. thuringiensis</i> serovar coreanensis	25	DQ377232	<i>B. thuringiensis</i> serovar roskildensis	45	DQ377276
<i>B. thuringiensis</i> serovar silo	26	DQ377266	<i>B. thuringiensis</i> serovar chanpasis	46	DQ377240
<i>B. thuringiensis</i> serovar mexicanensis	27	DQ377267	<i>B. thuringiensis</i> serovar wratislaviensis	47	DQ377277
<i>B. thuringiensis</i> serovar monterrey	28a,28b	DQ377233	<i>B. thuringiensis</i> serovar balearica	48	DQ377297
<i>B. thuringiensis</i> serovar jegathesan	28a,28c	DQ377234	<i>B. thuringiensis</i> serovar muju	49	DQ377302
<i>B. thuringiensis</i> serovar amagiensis	29	DQ377268	<i>B. thuringiensis</i> serovar navarrensis	50	DQ377278
<i>B. thuringiensis</i> serovar medellin	30	DQ377269	<i>B. thuringiensis</i> serovar xiaguangensis	51	DQ377279
<i>B. thuringiensis</i> serovar toguchini	31	DQ377270	<i>B. thuringiensis</i> serovar kim	52	DQ377280
<i>B. thuringiensis</i> serovar cameroun	32	DQ377271	<i>B. thuringiensis</i> serovar asturiensis	53	DQ377241
<i>B. thuringiensis</i> serovar poloniensis	54	DQ377281	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>wuhanensis</i>		DQ377298
<i>B. thuringiensis</i> serovar palmanyolensis	55	DQ377282	<i>B. cereus</i>		DQ377304
<i>B. thuringiensis</i> serovar rongseni	56	DQ377283	<i>B. cereus</i>		DQ377305
<i>B. thuringiensis</i> serovar pirenaisca	57	DQ377295	<i>B. anthracis</i> Ames ancestor		YP_018345
<i>B. thuringiensis</i> serovar argentinensis	58	DQ377284	<i>B. anthracis</i> Ames		NP_844143
<i>B. thuringiensis</i> serovar iberica	59	DQ377285	<i>B. anthracis</i> Sterne		YP_027849
<i>B. thuringiensis</i> serovar pingluosensis	60	DQ377286	<i>B. mycoides</i>		DQ377306
<i>B. thuringiensis</i> serovar sylvestriensis	61	DQ377287	<i>B. mycoides</i> BGSC 6A20		DQ377307
<i>B. thuringiensis</i> serovar zhaodongensis	62	DQ377288	<i>B. weihenstephanensis</i>		DQ377308
<i>B. thuringiensis</i> serovar bolivia	63	DQ377289	<i>B. weihenstephanensis</i>		DQ377309
<i>B. thuringiensis</i> serovar azorensis	64	DQ377296	<i>B. weihenstephanensis</i>		DQ377310
<i>B. thuringiensis</i> serovar pulsiensis	65	DQ377290	<i>B. subtilis</i>		NP_391416
<i>B. thuringiensis</i> serovar graciosensis	66	DQ377291	<i>B. halodurans</i>		NP_244483
<i>B. thuringiensis</i> serovar vazensis	67	DQ377292			

#### **4.12 Obtención de mutantes de Bt1-88, para la interrupción de los genes que codifican a las proteínas de las IPP's y los filamentos, mediante transposon tagged mutagenesis (TTM)**

Para la obtención de mutantes, se utilizó el plásmido pMarA (Breton *et al.* 2006). Para ello se prepararon células de Bt1-88 electrocompetentes de la siguiente manera. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio YT, se inóculo a Bt1-88 y se dejó incubar toda la noche a 28 °C 180 rpm. Después se tomó 1 mL del cultivo, el cual se transfirió a un matraz conteniendo 50 mL de medio YT fresco y se dejó incubar a 28 °C hasta que se alcanzó una OD<sub>600</sub> de 0.7. El cultivo fue colocado en baño de hielo durante 10 min. Las células fueron recuperadas por centrifugaron a 8,000 rpm durante 5 min a 4 °C. El paquete celular obtenido fue lavado en tres ocasiones con una solución fría, que contiene 53.3 g de sacarosa disueltos en 250 mL de MgCl<sub>2</sub> 1 mM, y finalmente las células fueron resuspendidas en 200 µL de la misma solución y conservadas en un baño de hielo hasta su utilización.

Para llevar a cabo la transformación de las células de Bt1-88, se tomaron 40 µL de las células electrocompetentes, preparadas como se indicó anteriormente, y se colocaron en una cubeta para electroporación previamente enfriada. Se adicionaron 2 µL de pMarA en solución (equivalente a 1 µg de DNA), y se dejaron reposar en hielo por 5 min. Posteriormente se aplicó un único pulso a 2 kV, e inmediatamente después se adicionaron 300 µL de caldo YT y se incubaron a 28 °C durante 3 h. Después se tomaron alícuotas de 50 y 100 µL y se sembraron sobre placas YT-Eritromicina (2µg/mL). Las células crecidas se resembraron 24 h después, sobre placas de YT-kanamicina (5 µg/mL) (Breton *et al.* 2006).

##### **4.12.1 Selección de mutantes carentes de IPP's y apéndices**

Una vez que se tuvieron las mutantes resistentes a eritromicina y kanamicina, se procedió a realizar una nueva selección de las mismas, siguiendo dos estrategias. La primera consistió en realizar frotos de 400 colonias diferentes. Dichas preparaciones fueron teñidas con azul de Coomassie (azul brillante de Coomassie R 0.125 % en ácido acético al 50%) (Rampersad *et al.*, 2005), y después fueron observadas al

microscopio de campo claro. Las clonas que presuntamente carecían de la inclusión paraesporal, fueron observadas nuevamente al microscopio de campo claro, pero bajo contraste de fases, para verificar la ausencia de filamentos y de las IPP.

La segunda estrategia consistió en realizar microarreglos de las mutantes obtenidas, para ello se tomaron microplacas de 96 pozos, los cuales fueron llenados con 50  $\mu$ L de caldo YT-CCY, y después fueron inoculadas por picadura con cada una de las clonas mutantes obtenidas. Las microplacas fueron incubadas a 28 °C durante 48 h y después se dejaron secar a 28 °C durante 24 h. Una vez secas se adicionaron 10  $\mu$ L de agua destilada a cada pozo y se mezcló cuidadosamente hasta que la suspensión fue homogénea. Los microarreglos se hicieron utilizando un robot SDDC-2 Micro Array. Los microarreglos consistieron de 900 clonas cada uno. Los cuales fueron teñidos con azul de Coomassie para ser observados después bajo el microscopio de campo claro; otros fueron cubiertos con oro-paladio para ser observados bajo el microscopio electrónico de barrido.

#### **4.13 Ensayo de germinación de esporas**

Con el objetivo de abordar la hipótesis de que los cristales presentes en las esporas de *B. thuringiensis*, son utilizados como una fuente de carbono y nitrógeno y así favorecen la germinación y crecimiento de las esporas. Se realizaron ensayos en los que se evaluó la velocidad de germinación tanto de la cepa silvestre (conteniendo las IPP) como de cepas mutantes (carentes de IPP) obtenidas previamente, mediante tratamientos con luz UV, choque térmico, crecimiento en SDS y bromuro de etidio, así como combinaciones de los métodos anteriores (Ventura-Suarez, 2007). Al respecto se realizaron dos experimentos por separado. En el primero se tomó un cultivo autolizado de Bt1-88 (25 mL en total) y se lavó en tres ocasiones con 25 mL de agua destilada estéril, centrifugando a 8,000 rpm por 10 min en cada lavado. Posteriormente las esporas se resuspendieron en 25 mL de agua destilada estéril y se colocaron en baño maría a 70 °C durante 30 min. La suspensión se centrifugó y lavó una vez más con agua destilada estéril. Después las esporas se resuspendieron en regulador Tris 10 mM; NaCl 10 mM; Alanina 100 mM, ajustando la OD<sub>600</sub> a 1. De

dicha suspensión se tomaron alícuotas de 1 mL, las cuales se colocaron en celdas de plástico previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio (100 ppm), durante 10 min. Las celdas se colocaron en baño maría a 28 °C y se tomaron lecturas de la absorbencia a 600 nm cada 20 min, durante 3 h. Con esta estrategia se evaluó el tiempo que requieren las esporas para pasar a la fase oscura, es decir cuando éstas dejan de ser refringentes al ser observadas en el microscopio. Este cambio indica que la pared de la spora se ha adelgazado lo suficiente, para permitir que la célula vegetativa emerja. Sin embargo, con el regulador empleado no se pueden obtener células vegetativas propiamente, pues no se cuenta con una fuente de carbono. Por ello se decidió utilizar medio G para favorecer el desarrollo de las células vegetativas. De igual manera que cuando se utilizó el regulador Tris-NaCl-alanina, en este caso. También se ajustó la OD<sub>600</sub> a 1, y se colocaron fracciones de 25 mL en matraces Erlenmeyer incubándose en baño maría a 28 °C. Se tomaron muestras cada 20 min, las cuales se fijaron con glutaraldehído al 3% durante 2 h. Las muestras se lavaron en tres ocasiones con 1.5 mL de regulador de fosfatos 100 mM pH 7.0, y posteriormente se procesaron para tinción negativa, para su observación mediante microscopia electrónica de transmisión.

#### **4.14 Bioensayos de toxicidad de las IPP's semi purificadas**

Debido a que anteriormente se realizaron ensayos de toxicidad con los complejos spora-cristal-filamento (Ventura-Suárez 2007), se consideró necesario volver a realizar los ensayos con las IPP purificadas, para así comparar con los resultados obtenidos previamente. Los detalles particulares de estos nuevos bioensayos se dan a continuación. Estos ensayos fueron realizados en el Laboratorio de Bioinsecticidas del CINVESTAV-Irapuato, bajo la asesoría del Dr. Jorge E. Ibarra Rendon.

##### **4.14.1 Bioensayos con *Manduca sexta* (LEPIDOPTERA: *Sphingidae*)**

Se prepararon 4 cajas de Petri conteniendo 15 g de dieta artificial sólida (80 g de germen de Trigo; 36 g de caseinato de calcio; 32 g de sacarosa; 16 g de levadura de cerveza; 12 g de Mix de Sales de Wesson; 2 g de ácido sórbico; 10 g de vitaminas de

Vanderzant; 1 g de Metil-Paraben; 4 g de ácido ascórbico y 3 g de colesterol). Luego se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de una suspensión (29  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de IPP purificadas (preparadas en Tween 20 al 0.02 %) y se distribuyeron uniformemente sobre toda la superficie. La concentración final de los cristales fue de 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Los testigos se prepararon únicamente con 200  $\mu\text{l}$  de Tween 20 al 0.02%. Sobre la superficie de la placa se colocó una rejilla de plástico para aislar las larvas de *M. sexta*. Se utilizaron 10 larvas por cada caja, siendo un total de 20 larvas para el testigo y 20 para el problema. Las placas se incubaron durante 5 días bajo condiciones de insectario (fotoperiodo de 14:10 h luz/obscuridad, una humedad relativa de 75-80% y una temperatura de  $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ). Al término de la incubación se contaron las larvas muertas.

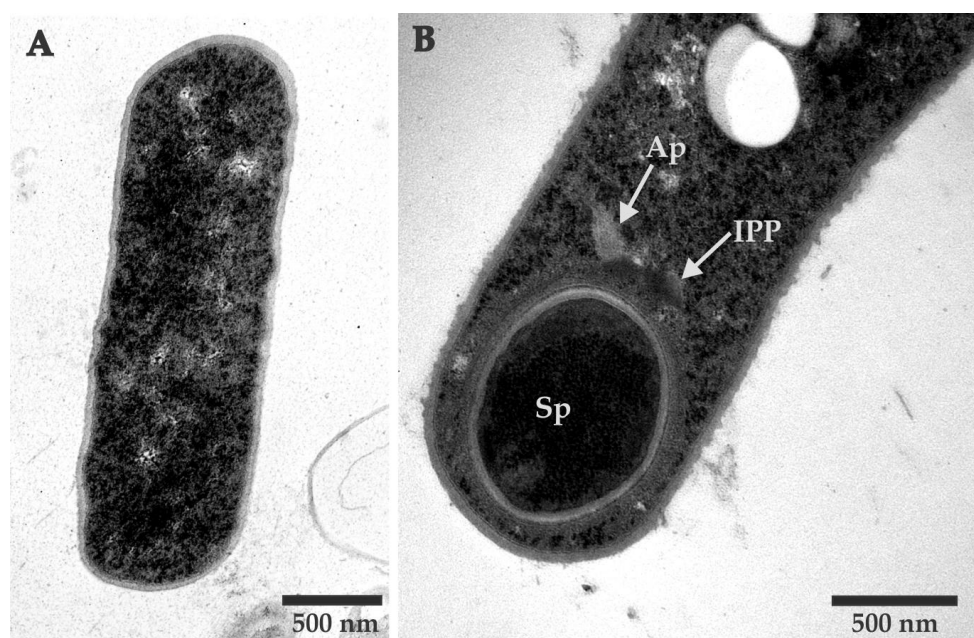
#### **4.14.2 Bioensayos con *Aedes aegypti* (DIPTERA: *Culicidae*)**

Se depositaron 100 mL de agua potable desclorada en un vaso de plástico. Luego se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de una suspensión de cristales (8 mg/mL). El testigo sólo contenía agua. Después, se depositaron 20 larvas tercer instar de *A. aegypti* con la ayuda de una malla, y se incubaron los vasos bajo condiciones de insectario (fotoperiodo de 14:10 h luz/obscuridad, una humedad relativa de 70-75% y una temperatura de  $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ). Finalmente se evaluó la mortalidad larvaria a las 48 h de incubación.

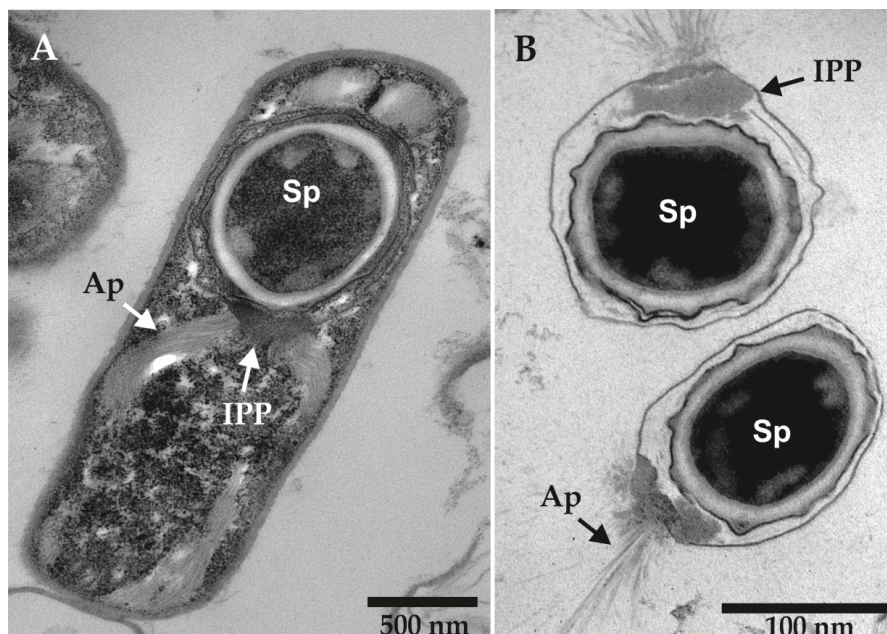
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Determinación del tiempo óptimo de cosecha de las esporas de Bt1-88

Para determinar el tiempo adecuado al cual se deberían cosechar las esporas de Bt1-88, se realizó el estudio cinético de su crecimiento, monitoreando por microscopía electrónica de transmisión. En la figura 12A se observa la fase vegetativa de Bt1-88, a las 6 h de incubación. Después de 24 h, la espora se encuentra casi madura (figura 12B), pues se pueden apreciar sus cubiertas externa e interna, así como el cortex que aún no está completamente desarrollado. También se observan las inclusiones paraesporales (IPP's) y los apéndices. A las 36 h de incubación se observan las esporas completamente maduras, pero éstas aún se encuentran dentro de la célula madre (figura 13A). En consecuencia, se decidió dejar los cultivos en agitación 48 h, para estar seguros de que todos los esporangios se hubieran utilizado (figura 13B), y de esta forma recuperar una mayor cantidad de esporas para llevar a cabo los experimentos posteriores.



**Figura 12.** Micrografías electrónicas de transmisión correspondientes a un estudio cinético del crecimiento de Bt1-88. En A se observa una célula vegetativa. En B, una preespora en la que se distinguen las etapas iniciales de formación de la IPP y de los apéndices.

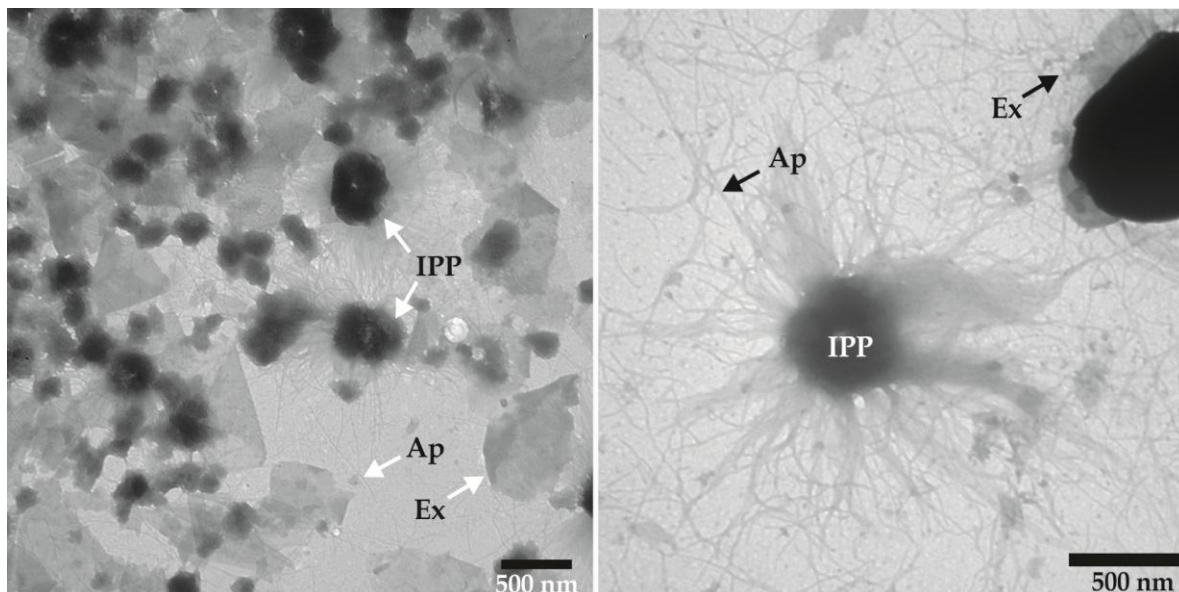


**Figura 13.** Micrografías electrónicas de transmisión de una cinética de crecimiento de Bt1-88. En A se observa una espora madura, aún dentro de la célula madre. En B se muestra una espora libre.

## 5.2 Aislamiento de los filamentos y las inclusiones proteicas paraesporales (IPP)

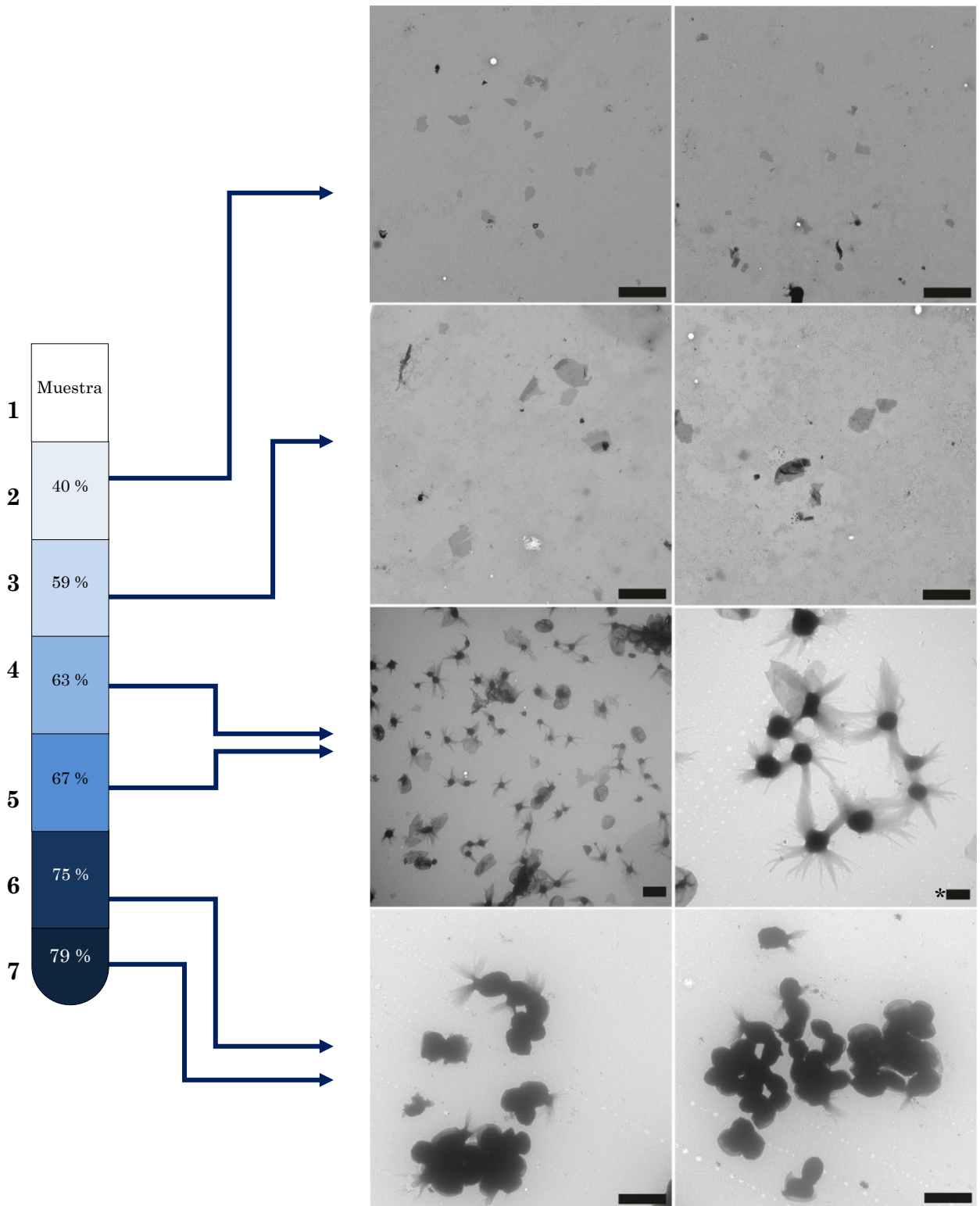
La muestra conteniendo los complejos espora-IPP-apéndices, fue sometida a diferentes tratamientos de sonicación, utilizando amplitudes de 10, 20, 30 y 35 %, esto con el fin de determinar el tiempo y las amplitudes óptimas de sonicación, que permitieran que los apéndices y las IPP's no sufrieran demasiado daño. El tiempo óptimo encontrado fue de 10-15 min de sonicación, pues en este lapso se observó la presencia de una gran cantidad de apéndices libres, así como de IPP's. Es importante mencionar que los apéndices no se liberaron totalmente de la IPP, pues como se observa en la figura 14, algunos fragmentos de los apéndices permanecieron unidos a éstas, debido a que se encuentran fuertemente unidos entre sí.

En la figura 14A se pueden observar fragmentos del exosporium, debido al efecto de la sonicación, así como de IPP's libres. En la figura 14B se muestra una inclusión paraesporal unida aun a los filamentos, así como la presencia de una espora que todavía conserva restos del exosporium.



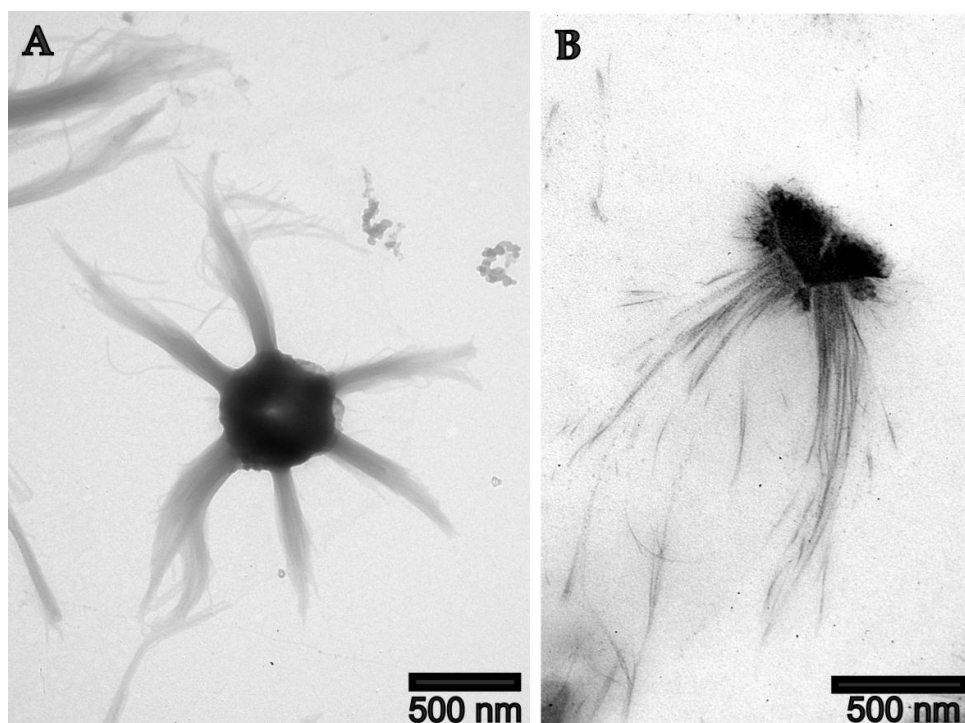
**Figura 14.** Micrografías electrónicas de transmisión en las que se muestra el efecto de la sonicación de las esporas de Bt1-88. Ex, exosporium; AP, apéndices; Sp, espora; IPP, inclusión proteica paraesporal.

Después de lograr la separación de los filamentos y la IPP de la espora, se procedió a realizar el aislamiento de tales estructuras. Para el caso de las IPP's, se realizó un primer paso de purificación en un gradiente discontinuo de sacarosa. Con esta estrategia se logró separar las IPP's del resto de los detritos celulares, incluyendo fragmentos del exosporium y de esporas que no se rompieron con el tratamiento de sonicación. En la figura 15 se muestran las diferentes estructuras que se obtuvieron en los diferentes estratos del gradiente de sacarosa. En la capa más superficial, correspondiente al agua destilada, en la cual se encontraban inicialmente suspendidas las IPP's y las esporas, se observaron algunas esporas que no entraron en el gradiente. En la segunda y tercera capa se observó la presencia de fragmentos de exosporia; estos dos estratos correspondieron a las concentraciones de 40 y 59% de sacarosa. En el cuarto y quinto estrato se ubicaron las concentraciones de 63 y 67 % de sacarosa, y en éstas se observó la presencia de las IPP's junto con restos de exosporia de tamaño más grande, en comparación con los fragmentos observados en los estratos 2 y 3, así como algunas esporas que no lograron sedimentar.



**Figura 15.** Fraccionamiento por ultracentrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa, de las diferentes estructuras liberadas por sonicación de los complejos espóra-IPP-apéndices. Barra igual a 2 micrometros.\*Barra igual a 500 nm.

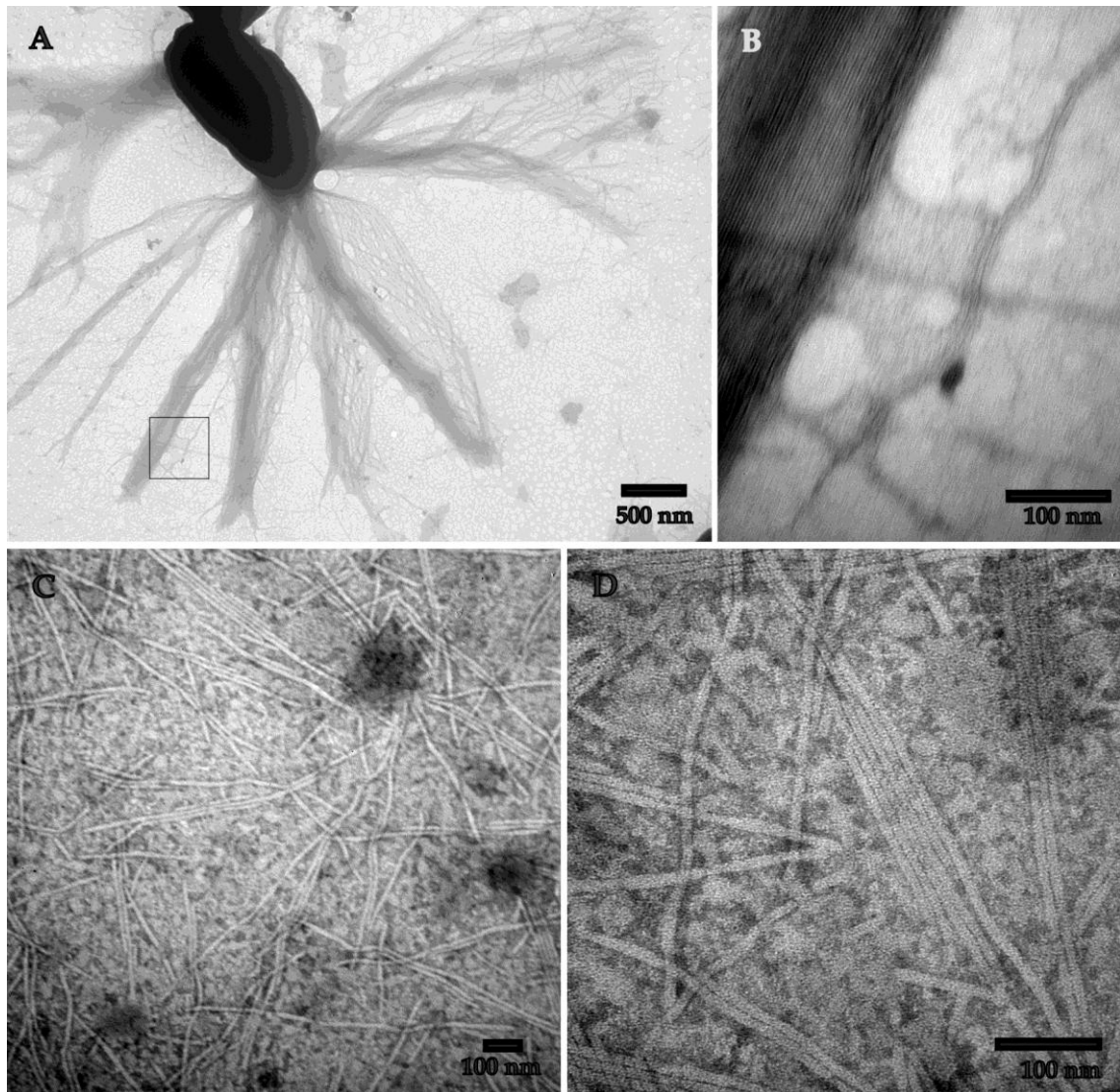
En los estratos inferiores 6 y 7, correspondientes a las concentraciones de sacarosa de 75 y 79 %, se observaron tanto esporas que habían perdido los complejos IPP-apéndices como aquellas esporas que no fueron rotas con el tratamiento empleado. Con las micrografías de las IPP's purificadas parcialmente se realizaron las mediciones correspondientes, encontrando que ésta tiene un tamaño máximo de  $479.3 \text{ nm} \pm 67.5 \text{ nm}$  ( $n=44$ ). También se pudo observar que algunas de éstas presentaban una forma hexagonal, y que de cada uno de sus vértices emergía un grupo de filamentos (figura 16A). Al centro de la inclusión proteica paraesporal (IPP) se podía notar una zona menos electrodensa. Cuando se realizó un corte lateral de la IPP se observó una pequeña hendidura (16B).



**Figura 16.** En A se muestra una micrografía electrónica de una IPP purificada, vista con tinción negativa. En B se observa una IPP en un corte lateral.

Se encontró que los apéndices presentes en la cepa Bt1-88 son de baja densidad, pues éstos no se lograron concentrar por centrifugación a 6,000 rpm. Por esta razón, después de sonicar y centrifugar, los apéndices permanecieron suspendidos en el sobrenadante. Se pudo apreciar que las fibrillas que componen los apéndices se organizan paralelamente en pares a lo largo de todo el apéndice (figuras 17A y 17B).

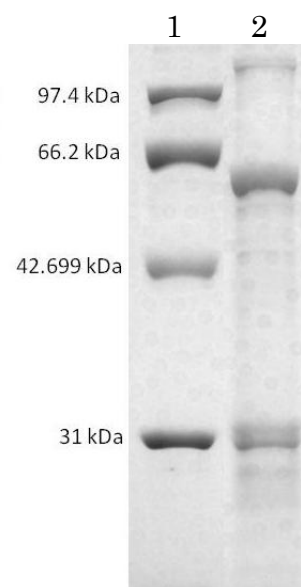
También se pudo detectar que el ancho de las fibrillas es de  $10.28 \text{ nm} \pm 1.72 \text{ nm}$  ( $n=94$ ) (figuras 17C y 17D). Es importante mencionar que los apéndices no se desprendieron en su totalidad de las IPP's, pues como se observa en la figura 14, todas las IPP's presentaban restos de apéndices adheridos, lo que indica una unión fuerte entre ambas estructuras.



**Figura 17.** Micrografía de transmisión de los apéndices presentes en Bt1-88. En A se muestra una espora libr. En B se observa una magnificación de los apéndices. En C se observa una vista panorámica de los apéndices liberados por sonicación, En D se observa una magnificación de los apéndices purificados.

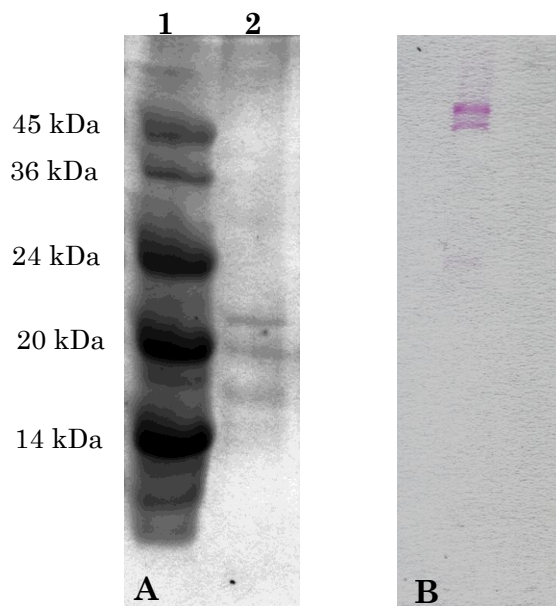
### 5.3 Determinación de las proteínas constituyentes de las inclusiones paraesporales y de los apéndices purificados

Con el objeto de conocer el número y talla molecular de las proteínas que componen la inclusión paraesporal, se realizaron ensayos de SDS-PAGE con los cristales semi purificados, empleando geles de poliacrilamida al 10%. En la figura 18 se muestra el perfil de las proteínas contenidas en los cristales purificados de Bt1-88 (IPP), el tamaño de tales proteínas fue de 30, 60 y 140 kDa. La proteína de 140 kDa tiene un tamaño muy cercano al de las proteínas de la familia Cry1, pues la talla molecular de estas proteínas oscila entre los 130-160 kDa. Es importante mencionar que la concentración de la proteína de 140 kDa es muy baja, en comparación con la proteína de 60 kDa, lo cual sugiere que esta última es la proteína mayoritaria en los cristales paraesporales. Además se encontró una banda correspondiente a una proteína de 30 kDa, la cual aparentemente es una banda doble, con pesos moleculares muy cercanos. Podría tratarse de las proteínas correspondientes a los filamentos, pues debe recordarse que cuando las IPP's fueron recuperadas y purificadas, llevaban asociados fragmentos pequeños de filamentos como se puede apreciar en la figura 14.



**Figura 18.** SDS-PAGE en un gel al 10% donde se muestra el perfil de proteínas de los cristales semi purificados de Bt1-88 (carril 2), teñidas con azul de Coomassie. En carril 1 se muestran los marcadores de peso molecular.

Para el caso de las proteínas constituyentes de los filamentos, se emplearon geles de poliacrilamida al 15%. En la figura 19A se muestra un gel teñido con azul de Coomassie, en el cual puede verse que los apéndices purificados presentaron tres bandas proteicas de 17, 21 y 24 kDa. Por otro lado, en la figura 19B se muestra un gel procesado en las mismas condiciones que el mostrado en la figura 19A, pero teñido con la técnica de PAS para glicoproteínas. Se aprecia en este caso la presencia de dos bandas, correspondientes a glicoproteínas con tamaños entre 36 y 45 kDa.



**Figura 19.** Separación electroforética en gel de poliacrilamida de las proteínas constituyentes de los filamentos. En A se muestra un gel al 15 % teñido con azul brillante de Coomassie. En el carril 1 se encuentran los marcadores de peso molecular y en el carril 2, las proteínas componentes de los filamentos de Bt1-88. En B se observa un gel de poliacrilamida procesado en las mismas condiciones que en 2A, pero teñido con la técnica de PAS para identificar glicoproteínas.

#### 5.4 Secuenciación del extremo amino terminal de las proteínas presentes en las inclusiones paraesporales purificadas

Las proteínas constituyentes de las IPP's fueron separadas electroforéticamente en un gel de poliacrilamida al 10%, y las bandas debidamente recortadas fueron enviadas al Dr. Klaus D. Linse, en el Institute for Cellular and Molecular Biology, University of Texas, Austin, Tx.

Las proteínas de Bt1-88 que se secuenciaron fueron aquellas cuyo peso molecular correspondía a 140, 60 y 30 kDa (ver figura 18). En el caso de la proteína de 140 kDa se obtuvo la siguiente secuencia de aminoácidos MDNNPNINEVIPYN. Cuando se realizó el análisis tipo BLAST, dicha secuencia mostró una identidad del 85% con proteínas de la familia Cry1A. Del mismo modo, la secuencia de la proteína de 60 kDa (MNVLNSGRTTISDAYNVVAHDRYAG), mostró una identidad del 90%

con proteínas de la familia Cry2A. Sin embargo, la secuencia encontrada en el grupo N-terminal de la proteína de 30 kDa (MDTNNEFNPIANMIDLVN), mostró identidad con proteínas de diversos géneros que se encuentran muy alejados del género *Bacillus*. Cabe mencionar que no se han reportado las secuencias de aminoácidos de los extremos N- terminal de las proteínas presentes en los filamentos de *B. cereus* ni en los de *B. thuringiensis*. Sin embargo, si se ha reportado la secuencia N- terminal de las proteínas presentes en los apéndices de *C. taeniosporum*. A pesar de que esta última especie comparte algunas características estructurales con Bt1-88, las secuencias N- terminal de las proteínas presentes en los apéndices es claramente diferente (ver figura 20). Un dato interesante de las proteínas Cry de Bt1-88 referidas anteriormente, es que también se han reportado en los *serovares kurstaki, aizawa, sotto y dendrolimus*.

30 kDa	MDTNNEFNPI AN---MIDLV N-
P29a	MVELKVLXSA DRSYVFFGIX N-
GP85	-MRNQYLXNR NN----TGTY ND
	*

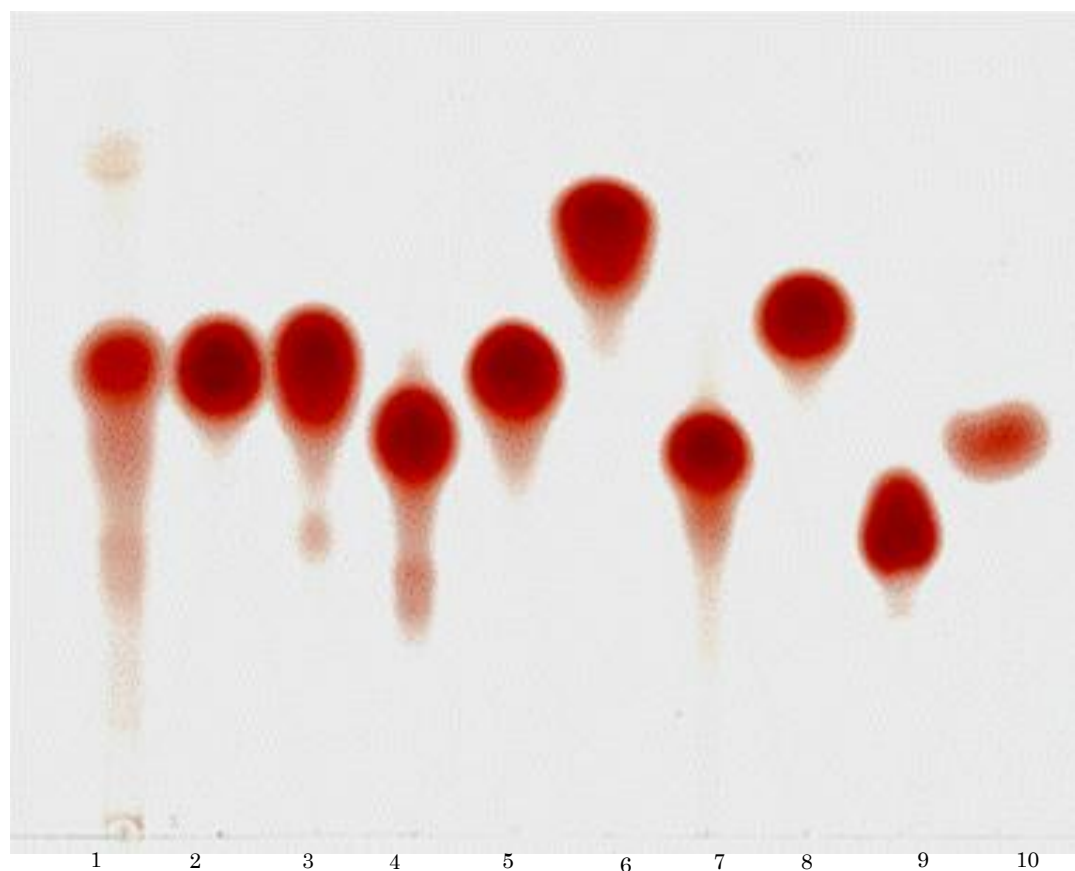
**Figura 20.** Alineamiento de la secuencia N- terminal de la proteína de 30 kDa de Bt1-88 y las proteínas constituyentes de los apéndices de *C. taeniosporum* (Walker *et. al.* 2007).

## 5.5 Identificación mediante TLC de los carbohidratos presentes en los apéndices purificados

Debido a que se detectó electroforéticamente la presencia de glicoproteínas mediante revelado con la técnica de PAS, se procedió a identificar los carbohidratos presentes en los apéndices. Para ello se recuperaron un total de 5.5 mg de las proteínas provenientes de los filamentos purificados, las cuales se sometieron a hidrólisis con ácido sulfúrico. Una vez neutralizadas, las muestras se analizaron mediante cromatografía en capa fina, utilizando como estándares azúcares conocidos. Para la detección general de carbohidratos se empleó el revelado con cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) (ver figura 21). Esta técnica permite la identificación de

glucósidos, aminozúcares y carbohidratos neutros. Los Rf obtenidos se enlistan en la tabla 4. Los carbohidratos resaltados en negritas, son aquellos que presentaron un Rf muy similar al de la muestra. De estos carbohidratos, los que resaltan son la glucosa, fructosa, manosa.

Como se muestra en la figura 21, la muestra presentó sólo una mancha, lo que sugiere, en primera instancia, que las glicoproteínas presentes en los apéndices contienen un solo tipo de carbohidrato; sin embargo, este compuesto no pudo ser identificado puesto que fueron varios los estándares que mostraron Rf's similares a los del azúcar presente en los apéndices hidrolizados. Empero es posible que la mancha problema corresponda a más de un carbohidrato, por lo que será necesario en un futuro realizar una identificación más exacta mediante HPLC.



**Figura 21.** Cromatograma obtenido de los filamentos hidrolizados con ácido sulfúrico, revelados con TTC. 1, muestra; 2, glucosa; 3, manosa; 4, galactosa; 5, fructosa; 6, glucosamina; 7, N-acetilglucosamina; 8,  $\alpha$ -metilglucósido; 9,  $\alpha$ -metilmanósido; 10, celobiosa.

**Tabla 4.** Rf's obtenidos de la cromatografía en capa fina de los apéndices hidrolizados.

Carbohidrato	Rf
<b>Glucosa</b>	<b>0.60</b>
<b>Manosa</b>	<b>0.62</b>
Galactosa	0.56
<b>Fructosa</b>	<b>0.61</b>
Glucosamina	0.64
N-acetilglucosamina	0.59
Celobiosa	0.72
$\alpha$ -metilglucósido	0.49
$\alpha$ -metilmanósido	0.49
<b>Apéndices hidrolizados</b>	<b>0.62</b>

Con el objeto de determinar qué tipo de carbohidrato estaba presente en los apéndices, se utilizaron técnicas diferenciales para revelar los cromatogramas. La técnica del TTC, como ya se mencionó, sirve para detectar cualquier carbohidrato con capacidad reductora. Por otro lado, la técnica de revelado de Elson-Morgan que detecta específicamente aminoazúcares fue negativa para los compuestos presentes en el hidrolizado de los apéndices de Bt1-88. EL revelado con antrona, permite diferencias aldosas de cetosas, dando una coloración amarillo claro para las cetosas y ninguno para las aldosas. Al aplicar esta técnica se encontró reacción positiva sólo con la fructosa (control), por lo que se puede descartar que sea la fructosa u otra cetosa, el carbohidrato presente en la muestra problema. Sin embargo, aún queda la posibilidad de que existan manosa y/o glucosa, o una mezcla de ambas, pues las dos tienen valores de Rf muy similares; aunque atendiendo a los resultados obtenidos, podría sugerirse que se trate de manosa, pues el Rf es idéntico para el control y para la muestra de apéndices hidrolizados.

## **5.6 Cuantificación colorimétrica de los carbohidratos presentes en los apéndices purificados**

Al cuantificar los carbohidratos presentes en las muestras hidrolizadas de los apéndices de Bt1-88, usando diferentes métodos colorimétricos (tabla 5), se pudo detectar solamente la presencia de carbohidratos neutros; es decir, se demostró la

presencia de glucosa (aunque cabría la posibilidad de que fuera manosa), que también es un carbohidrato neutro. Estos resultados concuerdan con lo obtenido en la cromatografía en capa fina. Donde se encontró que los Rf's de la glucosa y la manosa son muy semejantes. Sea cual fuere el azúcar presente en las glicoproteínas de los apéndices, su proporción fue del 9.09 %, lo cual es muy similar al valor reportado en la mayoría de las glicoproteínas.

**Tabla 5.** Resultados de la cuantificación de carbohidratos presentes en los apéndices hidrolizados.

Técnica utilizada	Carbohidratos detectados	Resultado
Elson-Morgan	Hexosaminas	No detectado
Morgan-Elson	Hexosaminas N-acetiladas	No detectado
Fenol-sulfúrico	Carbohidratos neutros	0.09 µgGlc/µgProt*
Ácido dipicónico	---	+

## 5.7 Tipificación molecular de la cepa Bt1-88

Para determinar si la cepa Bt1-88 pertenece a alguno de los serovares previamente descritos, se decidió amplificar un gen codificante para la flagelina (gen *hag*). Tal operación se realizó como se describe en materiales y métodos. Al amplificar el gen referido se obtuvo un fragmento de aproximadamente 900 pb. Este fragmento fue purificado y procesado para su secuenciación. El fragmento obtenido después de la secuenciación fue de 689 pb, al cual se le realizó un análisis BLAST, y en vista de que presentó una identidad máxima entre el 80 y el 98%, se procedió a realizar el dendograma correspondiente, y para ello se utilizaron las secuencias del gen *hag* correspondiente a las 82 serovariedades conocidas (tabla 3) (Xu y Coté, 2006). También se realizó la amplificación de la flagelina con un par de iniciadores diseñados por Guzmán-Chávez (2011), el tamaño esperado era de 1200 pb y al momento de realizar la secuenciación del fragmento se obtuvo una secuencia de de 1100 pb. Los resultados del análisis tipo BLAST fueron idénticos a los obtenidos con los iniciadores diseñados por Xu y Coté (2006). En la figura 22 se muestra la secuencia obtenida con los iniciadores diseñados por Xu y Coté (2006) y con los

iniciadores diseñados por Guzmán-Chávez (2011), mostrando identidad con las secuencias de los serovares *azorensis*, *zhandongiensis* y *rongseni*.

```

UTPA          CATAGATATGACCAACGCTGATGGACCGATTATCAAGCGGTAATACGTATCAACAACGCT
CINVESTAV    -----
rongseni     ---GCTAAAATGAGCAACGCTATGGACCGTTTATCAAGCGGTAAACGTATCAACAACGCT
zhandongiensis ---GCTAAAATGAGCAACGCTATGGACCGTTTATCAAGCGGTAAACGTATCAACAACGCT
azorensis    ---GCTAAAATGAGCAACGCTATGGACCGTTTATCAAGCGGTAAACGTATCAACAACGCT

UTPA          TCTGACGATGCAGCAGGTCTTGCAATCGCAACTCGTATGCGTGCACGTGAAAGCGGATTA
CINVESTAV    -----
rongseni     TCTGACGATGCAGCAGGTCTTGCAATCGCAACTCGTATGCGTGCACGTGAAAGCGGATTA
zhandongiensis TCTGACGATGCAGCAGGTCTTGCAATCGCAACTCGTATGCGTGCACGTGAAAGCGGATTA
azorensis    TCTGACGATGCAGCAGGTCTTGCAATCGCAACTCGTATGCGTGCACGTGAAAGCGGATTA

UTPA          GGTGTTGCAGCTAACAACACACAAGATGGTATGTCATTAATCCGTACAGCTGATTACAGCT
CINVESTAV    -----CATTAAATCCGTACAGCTGATTACAGCT
rongseni     GGAGTAGCAGCTAACAACACACAAGATGGTATGTCATTAATCCGTACAGCTGATTACAGCT
zhandongiensis GGAGTAGCAGCTAACAACACACAAGATGGTATGTCATTAATCCGTACAGCTGATTACAGCT
azorensis    GGAGTAGCAGCTAACAACACACAAGATGGTATGTCATTAATCCGTACAGCTGATTACAGCT
*****

UTPA          TTAAACTCTGTATCTAACATCTTACTTCGTATGCGTGACATCGCTAACCAATCTGCGAAC
CINVESTAV    TTAAACTCTGTATCTAACATCTTACTTCGTATGCGTGACATCGCTAACCAATCTGCGAAC
rongseni     TTAAACTCTGTATCTAACATCTTACTTCGTATGCGTGACATCGCTAACCAATCTGCGAAC
zhandongiensis TTAAACTCTGTATCTAACATCTTACTTCGTATGCGTGACATCGCTAACCAATCTGCGAAC
azorensis    TTAAACTCTGTATCTAACATCTTACTTCGTATGCGTGACATCGCTAACCAATCTGCGAAC
*****

UTPA          GGTACGAACACTGGTGACAACCAAAAAGCATTAGATAAAGAATTTTCTGCATTA AAAAGAA
CINVESTAV    GGTACGAACACTGGTGACAACCAAAAAGCATTAGATAAAGAATTTTCTGCATTA AAAAGAA
rongseni     GGTACGAACACTGGTGACAACCAAAAAGCATTAGATAAAGAATTTTCTGCATTA AAAAGAA
zhandongiensis GGTACGAACACTGGTGACAACCAAAAAGCATTAGATAAAGAATTTTCTGCATTA AAAAGAA
azorensis    GGTACGAACACTGGTGACAACCAAAAAGCATTAGATAAAGAATTTTCTGCATTA AAAAGAA
*****

UTPA          CAAATCGATTACATTTCTAAAAACACAGAGTTTAAATGATAAGAAATTATTAATGGCGAA
CINVESTAV    CAAATCGATTACATTTCTAAAAACACAGAGTTTAAATGATAAGAAATTATTAATGGCGAA
rongseni     CAAATCGATTACATTTCTAAAAACACAGAGTTTAAATGATAAGAAATTATTAATGGCGAA
zhandongiensis CAAATCGATTACATTTCTAAAAACACAGAGTTTAAATGATAAGAAATTATTAATGGCGAA
azorensis    CAAATCGATTACATTTCTAAAAACACAGAGTTTAAATGATAAGAAATTATTAATGGCGAA
*****

UTPA          AACACTTCAATTGCTATTCAAACCTCTTGACAGTGCTGACACAGCTAAACAGATTAACATT
CINVESTAV    AACACTTCAATTGCTATTCAAACCTCTTGACAGTGCTGACACAGCTAAACAGATTAACATT
rongseni     AACACTTCAATTGCTATTCAAACCTCTTGACAGTGCTGACACAGCTAAACAGATTAACATT
zhandongiensis AACACTTCAATTGCTATTCAAACCTCTTGACAGTGCTGACACAGCTAAACAGATTAACATT
azorensis    AACACTTCAATTGCTATTCAAACCTCTTGACAGTGCTGACACAGCTAAACAGATTAACATT
*****

```

**Figura 22.** Alineamiento de las secuencias del gen hag de Bt1-88, de las secuencias obtenidas con los iniciadores BtHagF1-BtHagR1 (Xu & Coté, 2006) y Flaf1-Flar1 (Guzmán-Chávez, 2011). Sólo se muestran las secuencias con mayor identidad hacia Bt1-88.

UTPA	AACCTAGCTGATACTTCTACTTCTTCGCTATTAATTGATAAAATTAAGTATCTCTGGTGCT
CINVESTAV	AACCTAGCTGATACTTCTACTTCTTCGCTATTAATTGATAAAATTAAGTATCTCTGGTGCT
rongseni	AACCTAGCTGATACTTCTACTTCTTCGCTATTAATTGATAAAATTAAGTATCTCTGGTGCT
zhandongiensis	AACCTAGCTGATACTTCTACTTCTTCGCTATTAATTGATAAAATTAAGTATCTCTGGTGCT
azorensis	AACCTAGCTGATACTTCTACTTCTTCGCTATTAATTGATAAAATTAAGTATCTCTGGTGCT
	*****
UTPA	GGTGCTGGTAAAGCTTTAGTTGGTGTTGACGCAGGTGACATTGCTAAGGCAACTACTGAA
CINVESTAV	GGTGCTGGTAAAGCTTTAGTTGGTGTTGACGCAGGTGACATTGCTAAGGCAACTACTGAA
rongseni	GGTGCTGGTAAAGCTTTAGTTGGTGTTGACGCAGGTGACATTGCTAAGGCAACTACTGAA
zhandongiensis	GGTGCTGGTAAAGCTTTAGTTGGTGTTGACGCAGGTGACATTGCTAAGGCAACTACTGAA
azorensis	GGTGCTGGTAAAGCTTTAGTTGGTGTTGACGCAGGTGACATTGCTAAGGCAACTACTGAA
	*****
UTPA	CAAAAAGCATTGTCTGCTCTTGCTGTTGGTGCATCTACAACCTGAAATGGATACTGCTGTA
CINVESTAV	CAAAAAGCATTGTCTGCTCTTGCTGTTGGTGCATCTACAACCTGAAATGGATACTGCTGTA
rongseni	CAAAAAGCATTGTCTGCTCTTGCTGTTGGTGCATCTACAACCTGAAATGGATACTGCTGTA
zhandongiensis	CAAAAAGCATTGTCTGCTCTTGCTGTTGGTGCATCTACAACCTGAAATGGATACTGCTGTA
azorensis	CAAAAAGCATTGTCTGCTCTTGCTGTTGGTGCATCTACAACCTGAAATGGATACTGCTGTA
	*****
UTPA	GGTAAGTTCAAAACAGAATTTGACAAAGTAAAGGACGGCCTGACTGCTGAGGATGCTGAA
CINVESTAV	GGTAAGTTCAAAACAGAATTTGACAAAGTAAAGGACGGCCTGACTGCTGAGGATGCTGAA
rongseni	GGTAAGTTCAAAACAGAATTTGACAAAGTAAAGGACGGCCTGACTGCTGAGGATGCTGAA
zhandongiensis	GGTAAGTTCAAAACAGAATTTGACAAAGTAAAGGACGGCCTGACTGCTGAGGATGCTGAA
azorensis	GGTAAGTTCAAAACAGAATTTGACAAAGTAAAGGACGGCCTGACTGCTGAGGATGCTGAA
	*****
UTPA	AAAGTTACAGCTGCCAATTGAGAAATACT-----
CINVESTAV	AAAGTTACAGCTGC-AATTGAGAAATACTCAAATAGTAAGACTCTTGAAAACGCTAATGC
rongseni	AAAGTTACAGCTGC-AATTGAGAAATACTCAAATAGTAAGACTCTTGAAAACGCTAATGC
zhandongiensis	AAAGTTACAGCTGC-AATTGAGAAATACTCAAATAGTAAGACTCTTGAAAACGCTAATGC
azorensis	AAAGTTACAGCTGC-AATTGAGAAATACTCAAATAGTAAGACTCTTGAAAACGCTAATGC
	*****
UTPA	-----
CINVESTAV	AATTGGAGACCTTTATAAACTATGACACCTGCTGATAGCACTAAAGTTACTAGTGCTAC
rongseni	AATTGGAGACCTTTATAAACTATGACACCTGCTGATAGCACTAAAGTTACTAGTGCTAC
zhandongiensis	AATTGGAGACCTTTATAAACTATGACACCTGCTGATAGCACTAAAGTTACTAGTGCTAC
azorensis	AATTGGAGACCTTTATAAACTATGACACCTGCTGATAGCACTAAAGTTACTAGTGCTAC
UTPA	-----
CINVESTAV	TGGAACTACTGGTAAAGCATTAAATTGATTTAAATACTACTTCTGGTGCATCTGCTACTGA
rongseni	TGGAACTACTGGTAAAGCATTAAATTGATTTAAATACTACTTCTGGTGCATCTGCTACTGA
zhandongiensis	TGGAACTACTGGTAAAGCATTAAATTGATTTAAATACTACTTCTGGTGCATCTGCTACTGA
azorensis	TGGAACTACTGGTAAAGCATTAAATTGATTTAAATACTACTTCTGGTGCATCTGCTACTGA
UTPA	-----
CINVESTAV	TAGACAAACAGCTGTAGATAATTTCAAAAAAGACTTTGATTTAATCAAAGTGGTCTAAA
rongseni	TAGACAAACAGCTGTAGATAATTTCAAAAAAGACTTTGATTTAATCAAAGTGGTCTAAA
zhandongiensis	TAGACAAACAGCTGTAGATAATTTCAAAAAAGACTTTGATTTAATCAAAGTGGTCTAAA
azorensis	TAGACAAACAGCTGTAGATAATTTCAAAAAAGACTTTGATTTAATCAAAGTGGTCTAAA

**Figura 22 (Continuación).** Alineamiento de las secuencias del gen *hag* de Bt1-88, de las secuencias obtenidas con los iniciadores BtHagF1-BtHagR1 (Xu & Coté, 2006) y Flafl-Flar1 (Guzmán-Chávez, 2011). Sólo se muestran las secuencias con mayor identidad hacia Bt1-88.

```

UTPA -----
CINVESTAV CCCACAAGATGCAGCTAAAGTTACAGCAGCTCTTGATAAAATTC AATAAAGCTGACGGTTC
rongseni CCCACAAGATGCAGCTAAAGTTACAGCAGCTCTTGATAAAATTC AATAAAGCTGACGGTTC
zhandongiensi CCCACAAGATGCAGCTAAAGTTACAGCAGCTCTTGATAAAATTC AATAAAGCTGACGGTTC
azorensis CCCACAAGATGCAGCTAAAGTTACAGCAGCTCTTGATAAAATTC AATAAAGCTGACGGTTC

UTPA -----
CINVESTAV TGGAATACTTTGGAGAACGCACAAGAAATCGGTAAGTATTTGCAGAAGTTGCAGCAGG
rongseni TGGAATACTTTGGAGAACGCACAAGAAATCGGTAAGTATTTGCAGAAGTTGCAGCAGG
zhandongiensi TGGAATACTTTGGAGGACGCACAAGAAATCGGTAAGTATTTGCAGAAGTTGCAGCAGG
azorensis TGGAATACTTTGGAGAACGCACAAGAAATCGGTAAGTATTTGCAGAAGTTGCAGCAGG

UTPA -----
CINVESTAV TTCTACAAAATCTAATGCTTCAGATGCAATTAATCGATTGATAAAGCCCTTGAAACAAT
rongseni TTCTACAAAATCTAATGCTTCAGATGCAATTAATCGATTGATAAAGCCCTTGAAACAAT
zhandongiensi TTCTACAAAATCTAATGCTTCAGATGCAATTAATCGATTGATAAAGCCCTTGAAACAAT
azorensis TTCTACAAAATCTAATGCTTCAGATGCAATTAATCGATTGATAAAGCCCTTGAAACAAT

UTPA -----
CINVESTAV TGCATCTAACCGTGCAACTCTAGGTGCTACATTAACCGTCTTGACTTTAACGTAAACAA
rongseni TGCATCTAACCGTGCAACTCTAGGTGCTACATTAACCGTCTTGACTTTAACGTAAACAA
zhandongiensi TGCATCTAACCGTGCAACTCTAGGTGCTACATTAACCGTCTTGACTTTAACGTAAACAA
azorensis TGCATCTAACCGTGCAACTCTAGGTGCTACATTAACCGTCTTGACTTTAACGTAAACAA

UTPA -----
CINVESTAV CCTGAAGAGCCAATCTTCTTCTATGGCTTCAGCTGCTTCTCAAATCGAAGACGCTGACAT
rongseni CCTGAAGAGCCAATCTTCTTCTATGGCTTCAGCTGCTTCTCAAATCGAAGACGCTGACAT
zhandongiensi CCTGAAGAGCCAATCTTCTTCTATGGCTTCAGCTGCTTCTCAAATCGAAGACGCTGACAT
azorensis CCTGAAGAGCCAATCTTCTTCTATGGCTTCAGCTGCTTCTCAAATCGAAGACGCTGACAT

UTPA -----
CINVESTAV GCGGAAAGAAATGTCTGAAATGACTAAGTTCAAATCTTGAACGAAGC-----
rongseni GCGGAAAGAAATGTCTGAAATGACTAAGTTCAAATCTTGAACGAAGCTGGTATC
zhandongiensi GCGGAAAGAAATGTCTGAAATGACTAAGTTCAAATCTTGAACGAAGCTGGTATC
azorensis GCGGAAAGAAATGTCTGAAATGACTAAGTTCAAATCTTGAACGAAGCTGGTATC

```

**Figura 22 (Continuación).** Alineamiento de las secuencias del gen *hag* de Bt1-88, de las secuencias obtenidas con los iniciadores BtHagF1-BtHagR1 (Xu & Coté, 2006) y Flaf1-Flar1 (Guzmán-Chávez, 2011). Sólo se muestran las secuencias con la mayor identidad con Bt1-88.

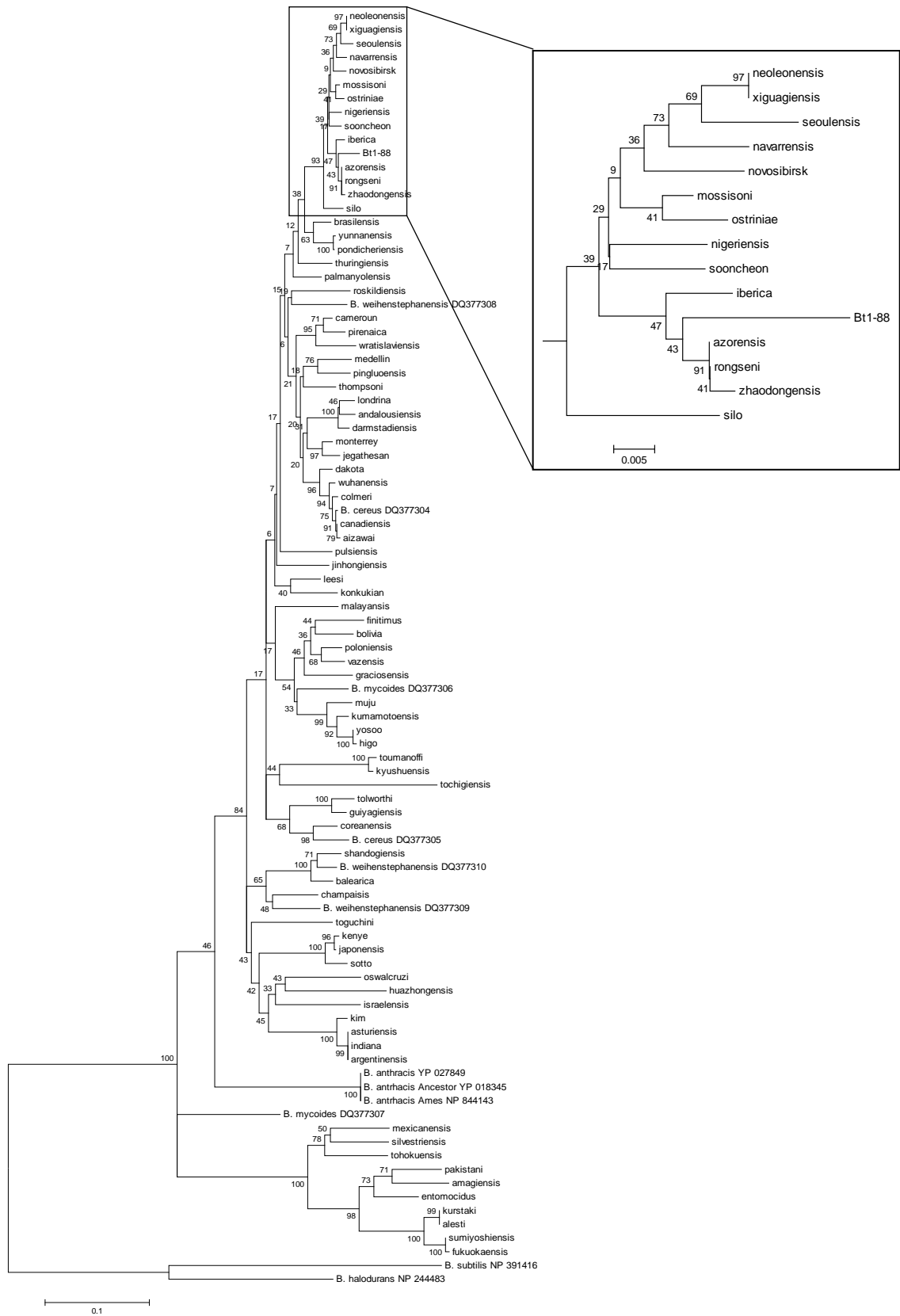
Una vez que las secuencias, fueron alineadas y depuradas. Se construyó el dendograma mostrado en la figura 23, donde se puede apreciar que Bt1-88 queda dentro de en un pequeño grupo constituido por las serovariedades *azorensis*, *zhaodongensis* y *rongseni*; sin embargo, por la distancia, no corresponde a ninguno de estos serovares.

Como resultado del análisis con el programa MatGat, se obtuvieron identidades del 66.1, 87.2, 87.1 y 87.3 %, para los serovares *iberica*, *azorensis*, *zhandongensis* y *rongseni*, respectivamente. Estos resultados son bajos, pues se ha sugerido que se

---

necesitan identidades por encima del 97% para definir el género de una cepa, y por arriba del 99% para determinar la especie. Puesto que en nuestro caso se trata de una subespecie, o serovariedad, lo ideal hubiera sido tener identidades del 100%, para así establecer la serovariedad con mayor seguridad. Con base en estos resultados, se puede suponer que se trata probablemente de una nueva variedad.

Un aspecto particular de las serovariedades citadas en el párrafo anterior, es que no han sido investigadas previamente, con respecto a los cristales y a la entomotoxicidad; es decir, sólo se ha determinado su serovariedad. Lo único que se sabe es que la serovariedad *zhandongiensis* y *rongseni* producen quitinasas, pero no presentan genes *cyt* (citolisinas). De las otras serovariedades referidas no se sabe nada (Liu et al. 2002).



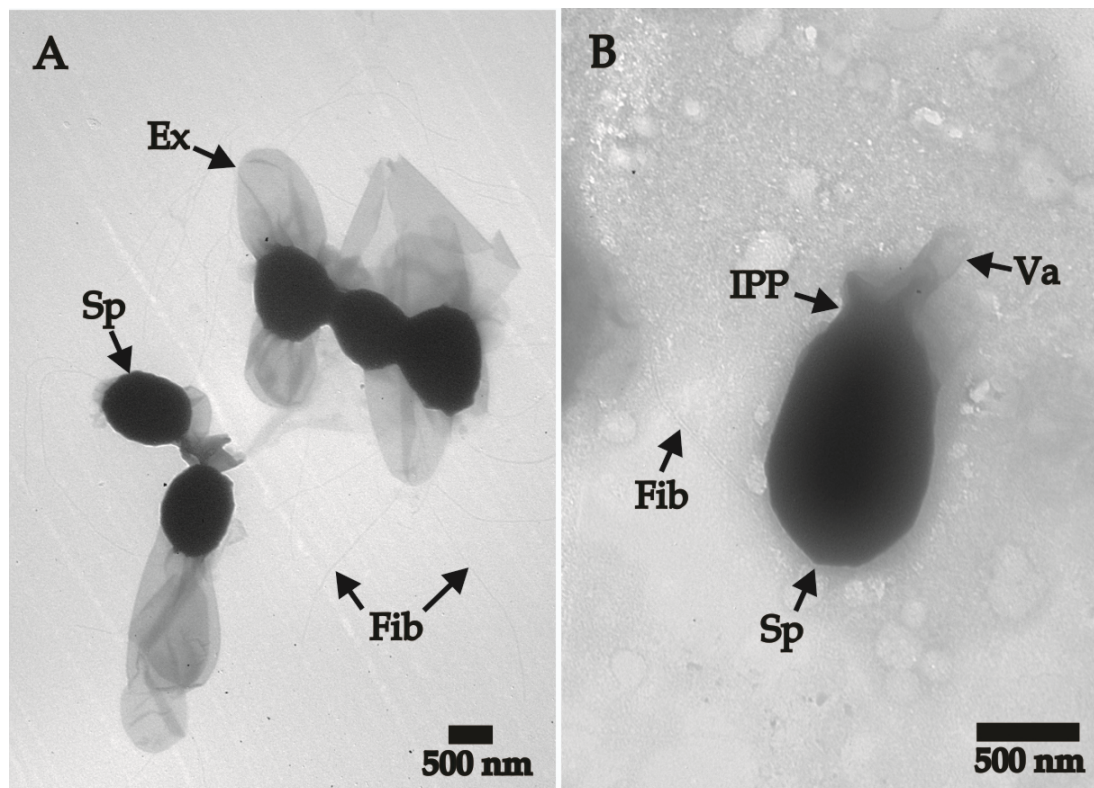
**Figura 23.** Dendrograma construido con las diferentes secuencias del gen hag, utilizando el algoritmo Neighbor-joining.

## 5.8 Obtención de mutantes de la cepa Bt1-88 para interrumpir los genes codificantes de las inclusiones paraesporales y los apéndices

Con el objetivo de realizar la secuenciación de los genes que codifican, tanto a las inclusiones paraesporales, como a los filamentos, se empleó un sistema de transposones mariner, el cual consiste de un cassette de resistencia a kanamicina flanqueado por dos ITR, los cuales se insertan de manera aleatoria dentro del genoma. Cuando este sistema entra en una sola posición del genoma, permite identificar el gen que fue interrumpido.

Usando este sistema se pudieron aislar 900 cepas mutantes que presentaron el fenotipo de resistencia a kanamicina. De éstas, el 30 por ciento presentaron el fenotipo deseado, es decir carecían tanto de filamentos como de IPPs. Algo que debe mencionarse es que todas las mutantes de interés presentaron aparentemente el mismo fenotipo; es decir, en todos los casos se pudieron observar sólo cepas carentes tanto de filamentos como de las IPPs, y en ningún caso se detectó la presencia de sólo filamentos o sólo cristales (IPP). Ahora bien, estos resultados fueron obtenidos cuando las mutantes fueron observadas bajo el microscopio de contraste de fases, ya que al observarlas en el microscopio electrónico de transmisión, se encontró que el fenotipo era ligeramente diferente, debido a que el MET ofrece una mejor resolución. En la figura 24 se presenta una micrografía de las mutantes Bt1-88(148) y Bt1-88(163), donde se puede observar que la primera (figura 24A) no presenta en efecto una IPP; sin embargo, al observar con detalle el entorno de la espora se pueden apreciar algunas fibrillas dispersas, esto sugiere que el gen interrumpido en esta cepa no es propiamente el responsable de la síntesis de la proteína requerida para la formación de los filamentos, sino de alguna otra proteína requerida para mantener unidas a las fibrillas que forman al apéndice. Refiriéndose ahora a la cepa Bt1-88(163) (figura 24B), su fenotipo es claramente diferente al de la cepa mutante Bt1-88(148), pues se puede observar que existe un “primordio” de lo que serán los filamentos; además de que se observa una especie de vaina hueca que emerge de lo que puede ser una IPP. No se puede definir con detalle si en verdad se trata de una IPP, pues la técnica empleada no ofrece ese tipo de detalle. Por otro lado, también se pueden observar en la periferia algunas fibrillas libres, por lo que sería conveniente

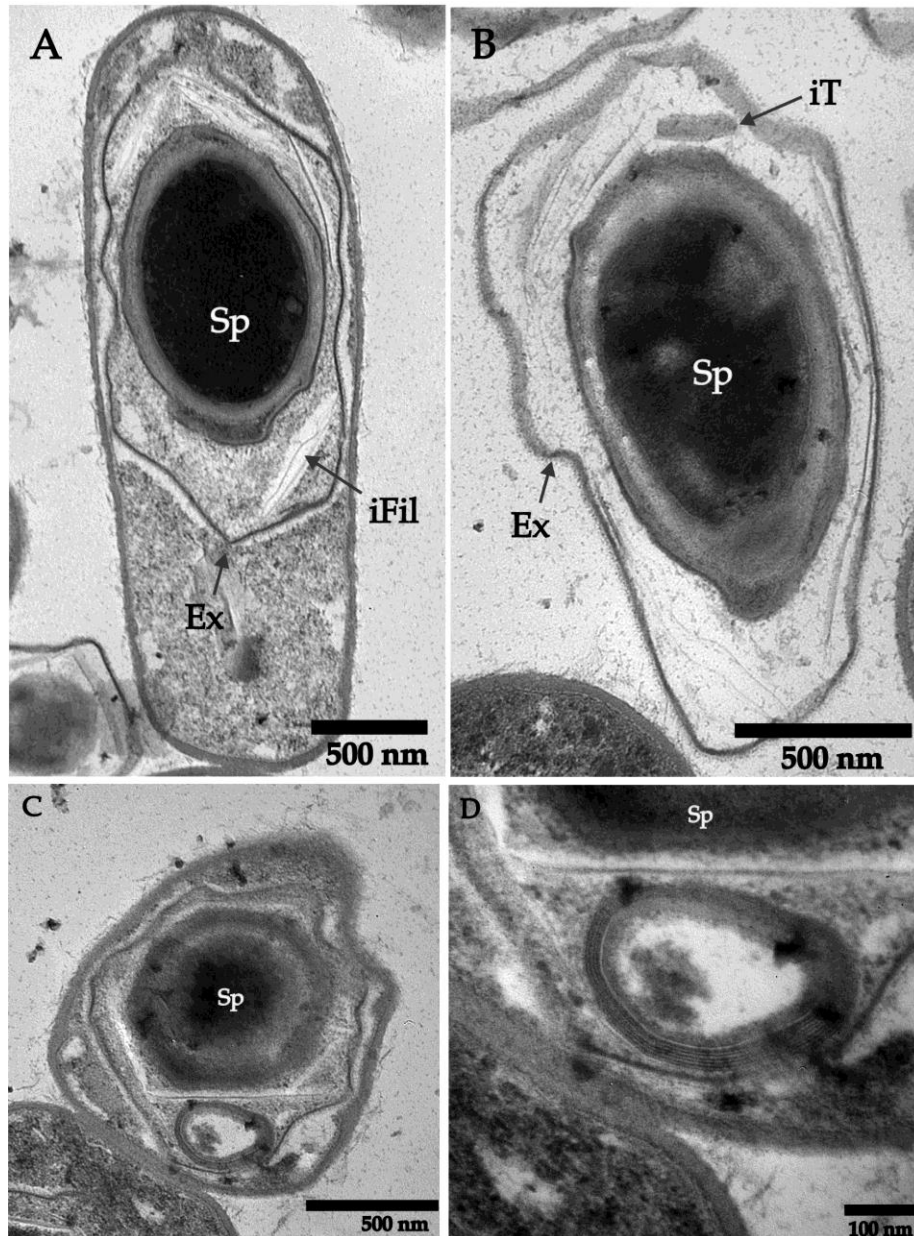
realizar un análisis de éstas en las dos cepas, y compararlas con las fibrillas presentes en la cepa silvestre, con el propósito de comprobar si se trata de la misma proteína.



**Figura 24.** Micrografía electrónica de transmisión (tinción negativa). En A se puede observar a la cepa mutante Bt1-88(148) carente de la IPP. En B se muestra la cepa mutante Bt1-88(163) con evidentes “primordios” de filamentos. Sp, espora; Ex, exosporium; Fib, fibrillas; Va, vaina; IPP, inclusión proteica paraesporal.

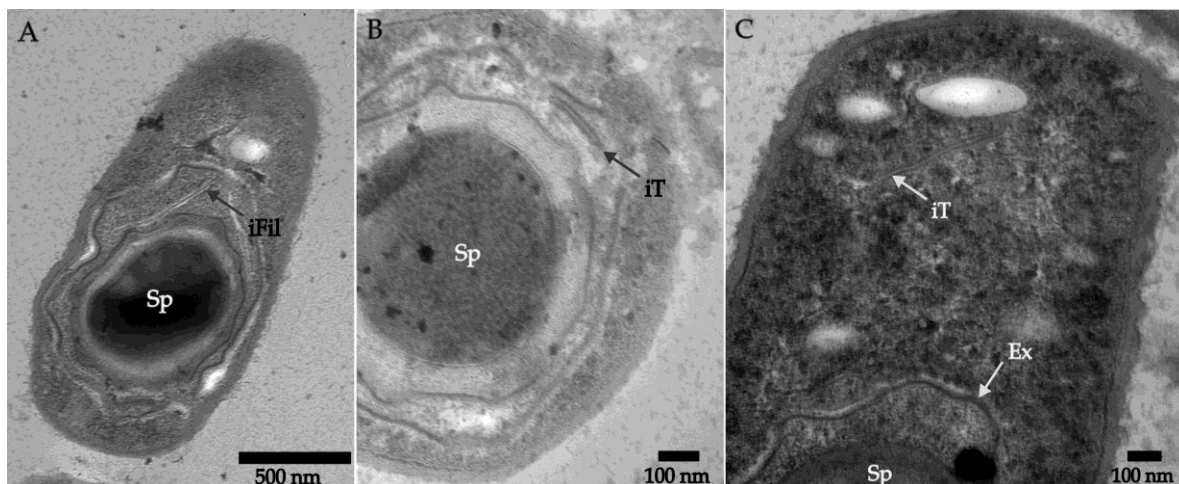
En los análisis realizados mediante cortes ultrafinos, se encontró en la mutante Bt1-88 (148), como ya fue mencionado, que ésta había perdido en efecto, la capacidad de sintetizar tanto la IPP como los apéndices. En la figura 25A se puede observar una espora madura dentro de la célula madre, la cual carece tanto de los filamentos como de las IPPs. Sin embargo, sí se detectó la presencia de estructuras filamentosas dentro del exosporium, las cuales probablemente sean los filamentos o fibrillas que componen los apéndices de la cepa nativa. En otros casos se observó una inclusión de aspecto tubular (figura 25B), la cual mostró tener una forma de anillo (figura 25C). Cuando se realizó una magnificación de esta estructura, se pudo apreciar que está

constituida por fibras (figura 25D) de aspecto muy similar al de los apéndices, cuando éstos fueron observados a grandes magnificaciones (figura 16B).



**Figura 25.** Micrografías electrónicas de la cepa Bt1-88 (148) obtenida por mutación con transposones de la cepa Bt1-88(148). En A se muestra un esporangio maduro, en el que se pueden apreciar unas inclusiones filamentosas (iFil) dentro del exosporium. En B se pone de manifiesto una inclusión de aspecto tubular (iT). En C se observa una inclusión muy similar a la de la figura B, sin embargo, ésta tiene un aspecto de anillo. En D se puede apreciar que la inclusión en forma de anillo, aparentemente está formada por varias fibras unidas paralelamente. Ex, exosporium.

Para el caso de la mutante Bt1-88(163) se observó un fenotipo muy similar al de la cepa Bt1-88(148), pues se aprecian las inclusiones de tipo filamentosas dentro del exosporium (figura 26A), así como la inclusión tubular (figura 26B). Empero, se puede apreciar en la figura 26C una estructura tubular de aproximadamente 400 nm de largo y 8 nm de diámetro, la cual es muy semejante a las estructuras filamentosas que componen los apéndices.

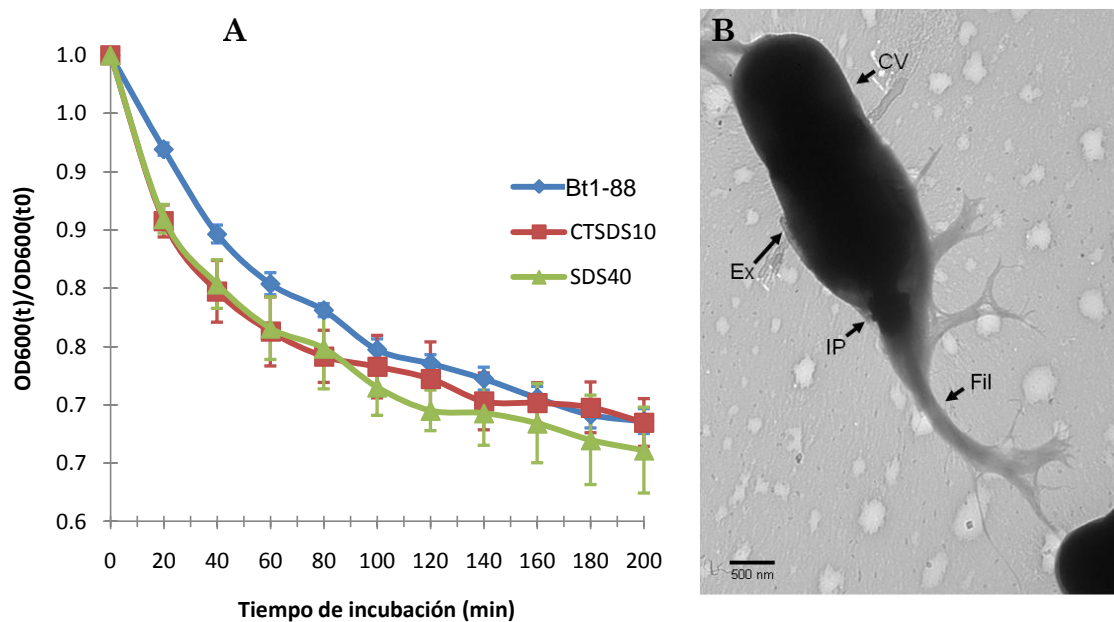


**Figura 26.** Micrografías electrónicas de transmisión de la mutante Bt1-88(163). En A se observa un esporangio maduro, el cual tiene una inclusión filamentosas dentro del exosporium. En B se aprecia la inclusión tubular dentro del exosporium. En C se observa una estructura tubular semejante a las fibrillas que componen el apéndice de la cepa silvestre.

### 5.9 Ensayo de germinación de esporas para determinar si las inclusiones paraesporales afectan la velocidad de germinación

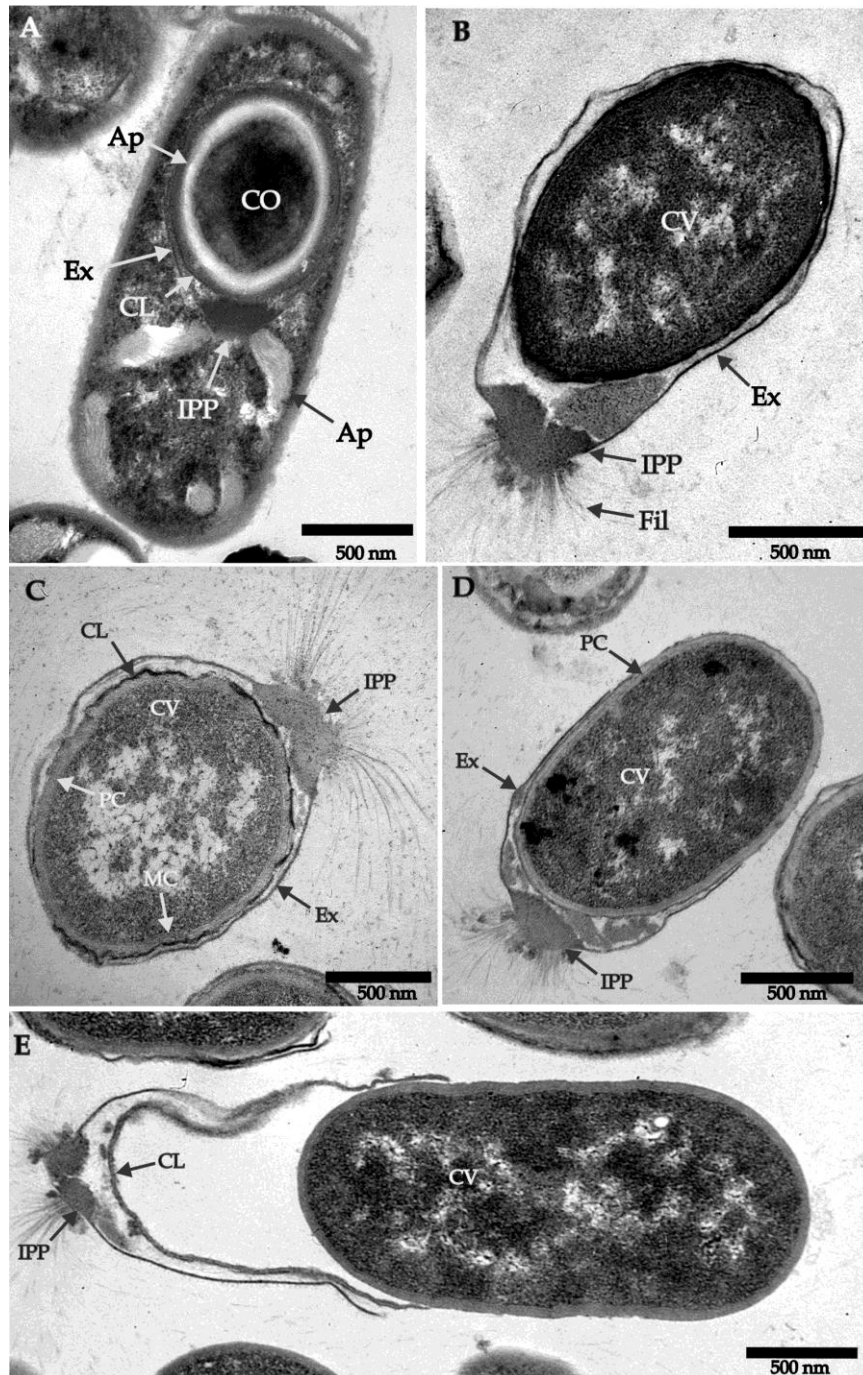
Con el propósito de evaluar si la presencia o ausencia de las IPPs o de los filamentos, podría estar relacionada directamente con la velocidad de germinación de las esporas de Bt1-88, se realizaron ensayos de germinación con ésta y con dos cepas mutantes (CTSDS10 y SDS40) carentes tanto de filamentos como de la inclusión paraesporal. Este tipo de ensayos se basa en la capacidad de la espora para liberar las enzimas líticas que rompen su pared o córtex, facilitando así la liberación de la célula vegetativa. A este proceso se le conoce como fase oscura, pues cuando las esporas son observadas al microscopio de contraste de fases, pasan de ser

refringentes a ser cuerpos oscuros. Sin embargo, debido a la falta de una fuente de carbono en el medio de cultivo, las células vegetativas no llegan a proliferar. En la figura 27A puede observarse que la velocidad de germinación de las cepas mutantes no disminuyó, sino que incluso tales mutantes mostraron una velocidad de germinación más acelerada que la cepa silvestre. Esto puede deberse a que algunos genes relacionados con la velocidad de germinación fueron afectados, pues las mutaciones ocurrieron de manera aleatoria. Por otro lado, en la figura 27B se observa claramente que la IPP permanece intacta durante el proceso de germinación de las esporas, hasta la liberación de las células vegetativas; contrario a lo que se esperaba, es decir, que dichas IPPs, debían ser consumidas durante el proceso de maduración de las células vegetativas. Estos resultados no concuerdan con la hipótesis, al menos en el caso de la cepa Bt1-88, de que los cristales paraesporales o IPPs presentes en *B. thuringiensis* tienen, entre otras funciones, la de servir como fuente de carbono y nitrógeno, para favorecer la germinación de las esporas en medios adversos.



**Figura 27.** En A se muestra la cinética de germinación de las esporas de la cepa silvestres Bt1-88, y de dos de sus mutantes (CTSDS10 y SDS40), carentes de la inclusión paraesporal y los apéndices. En B se muestra el aspecto de la cepa silvestre durante el proceso de germinación de la espóra.

Por otro lado, y con objeto de determinar si la ausencia o presencia de las IPPs afectaba la velocidad de germinación de las esporas, se realizaron estudios de microscopía electrónica referente a los cambios ultraestructurales que ocurren durante la germinación de éstas en medio G, el cual favorece el desarrollo de las células vegetativas. En la figura 28A se muestra el aspecto de Bt1-88 cuando se encuentra en fase de esporangio; es decir, cuando su espora se encuentra madura y lista para ser liberada, tan pronto la célula madre se autolice. En este caso se observan todas las estructuras intactas. En la figura 28B, después de sólo 20 min de incubación, el córtex se adelgaza considerablemente, reduciéndose aproximadamente a un 50% de su grosor original. También se puede observar la presencia de la membrana celular. La IPP no se observa modificada de ninguna forma, al igual que los filamentos. Las capas interna y externa se observan “arrugadas” y ligeramente más electrodensas que en la espora madura mostrada en la figura 28A. En la figura 28C, la célula vegetativa comienza a desarrollarse; la membrana celular se observa con mayor claridad y la pared celular se ha formado completamente. Claramente se observa que lo que una vez fue el córtex de la espora, se ha tornado laxo y se pueden apreciar algunas zonas más claras. En la figura 28D, la célula vegetativa se encuentra un poco más definida. El exosporium se observa roto en uno de sus extremos, permitiendo que la célula vegetativa se libere. En la figura 28E la célula vegetativa se ha desarrollado completamente. El exosporium y las membranas que cubrían el córtex se han desprendido de la célula vegetativa. Queda claro entonces, que la IPP no forma parte del ciclo de germinación de la espora, pues ésta se mantiene intacta durante todo el proceso, y al final se desprende en conjunto con el exosporium. También se puede inferir que la IPP se encuentra fuertemente unida al exosporium, debido a que se desprenden juntos.



**Figura 28.** Micrografías electrónicas de transmisión de Bt1-88 a lo largo del proceso de germinación de la espora. En A se muestra la imagen de una espora madura aún dentro de la célula vegetativa. En B se observa una espora después de 20 min de haberse iniciado el proceso de germinación; puede verse un adelgazamiento del córtex y el core se observa menos electrodenso. C, después de 60 min de incubación en caldo nutritivo, se aprecia la pared celular y las membranas de la espora (coat layers) se tornan irregulares. En D se puede observar a la célula vegetativa emergiendo del exosporium. En E se aprecia una célula completamente madura. CO, core; Cx, córtex; Ex, exosporium; Ap, apéndices; CV, célula vegetativa; IPP, inclusión proteica paraesporal; CL, coat layers (membranas que recubren la espora).

### **5.10 Ensayos de toxicidad**

Dado que las inclusiones paraesporales de Bt1-88 están constituidos por proteínas Cry1A y Cry2A, las cuales se ha demostrado que presentan actividad entomotóxica, se realizaron bioensayos con cristales purificados (IPPs), utilizando larvas de tercer instar de *M. sexta* y *A. aegypti*. En ningún caso se observó mortalidad; tampoco se logró observar algún retraso en el crecimiento de las larvas, lo cual indica que a pesar de que los cristales o IPPs, están constituidos por proteínas potencialmente tóxicas hacia estos insectos, éstas no presentan tal efecto, por lo que su función pudiera ser definitivamente otra, por ejemplo servir de soporte para los filamentos, como se ha mencionado anteriormente.

## 6 DISCUSIÓN

*B. thuringiensis* es una bacteria estudiada ampliamente en todo el mundo, debido a las proteínas Cry que presenta y a la toxicidad de las mismas hacia insectos de interés agrícola. Resulta interesante que a pesar de que existen nuevas y novedosas metodologías para identificar microorganismos, resulte a la fecha prácticamente imposible separar a Bt de los miembros del grupo denominado *B. cereus sensu stricto*. Remitiéndonos a las pruebas clásicas de identificación, para identificar a una cepa como *B. thuringiensis*, es necesaria la presencia de cristales, o en su defecto de los genes que codifican para las llamadas proteínas Cry.

Originalmente la especie bacteriana a la que pertenecía la cepa Bt1-88, permanecía incierta, debido a que los análisis de 16S rRNA y las pruebas de asimilación de carbohidratos, proporcionaron resultados ambiguos (Ventura Suárez 2007). En la práctica, es muy difícil diferenciar a *B. thuringiensis* de *B. cereus*, con los métodos tradicionales y las técnicas más recientes de biología molecular, por eso se ha llegado a mencionar que *B. thuringiensis* debería ser considerado un *B. cereus* con la capacidad de producir una inclusión paraesporal proteica (Carlson *et al.* 1994). Por esta razón, para identificar a Bt1-88, fue necesario realizar ensayos de secuenciación N- terminal de las proteínas constituyentes de sus inclusiones paraesporales. Fue así que se detectaron como componentes principales 3 proteínas de 140, 60 y 31 kDa. Estas proteínas fueron identificadas, con base en la secuencia amino terminal, como Cry1A y Cry2A. La otra resultó ser de carácter desconocido. Si se observa el contenido de proteínas de las IPPs de Bt1-88, se puede apreciar que la intensidad de la banda de 140 kDa es mucho menor, en comparación con aquella de 60 kDa, sugiriendo que el componente principal de las IPPs es una proteína de 60 kDa (Cry2A). El haber confirmado la presencia de proteínas Cry, permitió afirmar que Bt1-88 es *B. thuringiensis*, pues como se refiere en la literatura, la presencia de estas proteínas formando una inclusión paraesporal, es definitiva para establecer que una cepa bacteriana pertenece a la especie *B. thuringiensis* (Baumann *et al.* 1984).

Las cepas de *B. thuringiensis* que han sido aisladas típicamente, presentan en fase de esporangio, una espora localizada en uno de los polos de la célula vegetativa. Dicha espora se encuentra dentro de un saco membranoso denominado exosporium, y

puede estar asociada a una o dos IPPs, a las cuales se les denomina también cristales. Recientemente se ha descrito la presencia de inclusiones paraesporales dentro del exosporium, las cuales se asocian además a una estructura filamentosa (Rampersad *et al.* 2003). Este fenómeno es similar al descrito en la cepa Bt1-88, la cual presenta una IPP muy pequeña ( $479 \pm 67.5$  nm) localizada dentro del exosporium; dicha inclusión se encuentra unida fuertemente a éste, pues cuando se realizaron los ensayos de sonicación y observación posterior mediante TEM, se pudo comprobar la presencia de fragmentos de exosporium unidos a la IPP. Por otro lado, los filamentos mostraron también una estrecha asociación con la IPP, pues en este caso se conservaron fragmentos de los filamentos fuertemente unidos a dicha inclusión paraesporal. Por otra parte, se encontró también que la IPP contenía proteínas de tipo, Cry1A y Cry2A, las cuales generalmente presentan actividad toxica hacia lepidópteros (Cry1A, Cry2A) y hacia dípteros (Cry2A). Estas dos proteínas tienden a organizarse en estructuras cristalinas de tipo bipiramidal y cuboidal, respectivamente. En el caso de las proteínas *Cry* detectadas en la IPP de Bt1-88, no se propició una forma bipiramidal o cúbica como podía esperarse, sino un cuerpo proteico pequeñísimo, plano, de forma hexagonal, que no mostró toxicidad contra *M. sexta* ni contra *A. aegypti*, sugiriendo que estas proteínas podrían tener una función distinta a la descrita en la literatura, por ejemplo servir como ancla para los filamentos, ya que como fue demostrado, no fue posible separar los filamentos de la IPP. Un caso muy semejante se ha reportado en *Clostridium taeniosporum*, el cual presenta una estructura denominada cuerpo basal, de la cual emergen de 8 a 12 apéndices en forma de cinta (Yolton *et al.* 1968; Walker *et al.* 2007). El hecho de que la pequeña inclusión paraesporal de Bt1-88 pudiera servir como una estructura de anclaje o soporte para los filamentos, podría favorecer la adherencia de todo el complejo espora-IPP-apéndices, en un nicho favorable para la germinación de la espora, ayudando así a una mejor sobrevivencia de la bacteria (Sthalteim & Granum 2001; Rampersad *et al.* 2003).

Los análisis realizados con los apéndices de Bt1-88 demostraron que están constituidos al menos por 5 proteínas distintas, Tres de ellas no están glicosiladas, y sus tallas moleculares corresponden a 17, 21 y 24 kDa. Las otras dos sí están

glicosiladas y sus pesos moleculares son 36 y 46 kDa. Estos datos son claramente distintos a los reportados para la cepa Bt2-56, la cual presenta un largo filamento unido a un cristal cúbico, compuesto por tres proteínas de 92, 51 y 55 kDa; además no se reportó que alguna de ellas fuera glicoproteína (Rampersad *et al.* 2003). También se ha informado que el número de proteínas que componen los apéndices filamentosos de *B. cereus*, oscilan entre 3 y 10, con tallas moleculares que oscilan entre 14.5 y 97 kDa (Sthalteim & Granum 2001). Por lo tanto no resulta extraño que los apéndices de Bt1-88 estén constituidos por varias proteínas, a diferencia de sus flagelos, los cuales están constituídos por una sola proteína (Brock *et al.* 2006)). Esta gran diferencia cualitativa en su composición proteica, sugiere que ambas estructuras tienen funciones diferentes y específicas. Además, como se mencionó anteriormente, la presencia de una estructura basal que sirva de soporte para los apéndices puede ser crucial, pues en el caso de *B. cereus* (el cual no presenta una estructura de soporte equivalente), la remoción de los apéndices es relativamente sencilla, pues se requiere un tratamiento de sonicación con un 20% de amplitud (Sthalteim & Granum 2001), mientras que para Bt1-88 fue necesario aplicar una sonicación con una amplitud del 35%, y aún así no fue posible liberar en su totalidad los apéndices de la IPP que les sirve de soporte. Otro aspecto interesante de carácter morfológico, es el diámetro y longitud de los apéndices, ya que se ha reportado que su diámetro promedio oscila entre 6.8 y 20 nm, con longitudes que varían entre 1 y 5  $\mu\text{m}$  (DesRosier & Lara 1981). Las dimensiones de los filamentos de Bt1-88 se encuentran dentro de esos valores, pues sus apéndices tienen 10 nm de diámetro y una longitud de 2-3  $\mu\text{m}$ . Esta variabilidad en cuanto a su composición proteica, contenido cuali y cuantitativo de carbohidratos, así como la longitud y diámetro de los filamentos de Bt1-88, sugieren que estas estructuras podría tener características específicas y particulares para cada cepa, según se ha visto en aquellas que se han aislado y analizado. Esto apoya la hipótesis de Smirnova (1991), en la cual se sugiere que los apéndices podrían tener un gran valor taxonómico.

Por otro lado, cuando se realizó la tipificación molecular de la cepa Bt1-88, utilizando los iniciadores diseñados por Xu & Cote (2006), se amplificó y secuenció un fragmento de 600 pb, el cual correspondía a la región conservada de la flagelina.

Cuando se realizó el análisis bioinformático correspondiente, no fue posible determinar el serovar al cual pertenecía la cepa referida, pues las máximas identidades encontradas fueron de 87.3, 87.1 y 87.2 % para los serovares *rongsenii*, *zhandongiensis* y *azorensis*, respectivamente. Estos valores de identidad tan bajos no permiten determinar con certeza, el serovar al que pertenece Bt1-88, pues se requeriría al menos una identidad del 99%. Cabe agregar que también se realizó una amplificación con un par de iniciadores diseñados por Guzmán Chavez (2011), con los que se pudo amplificar y secuenciar un fragmento de 1200 pb. Este fragmento incluía las regiones conservadas que flanquean la región hipervariable. Cuando se construyó el dendrograma respectivo, se llegó exactamente el mismo resultado que con los iniciadores arriba citados. Esto dejó en claro que un fragmento mayor no proporciona necesariamente mayor información. En suma los resultados hasta ahora obtenidos, sugieren que Bt1-88 pertenece a una nueva serovariedad, dada la baja identidad encontrada con los serovares hasta ahora conocidos.

Debido a sus características únicas, se consideró pertinente secuenciar los genes que codifican tanto para sus filamentos, como para su IPP. Para ello se empleó un sistema diseñado para *B. subtilis*, en el cual se emplea un transposón que contiene un gen de resistencia a kanamicina (Breton *et al.* 2006). En teoría, dicho transposón se inserta en una sola posición en todo el genoma bacteriano. Este sistema permitió seleccionar mutantes de Bt1-88 carentes tanto de filamentos, como de las IPPs. Cabe referir que el porcentaje de mutantes obtenidas fue muy alto, cercano al 30%. Este dato sugiere que los genes involucrados son altamente sensibles, y se pierden con facilidad. Este hecho ya había sido observado con anterioridad en Bt1-88 por Ventura Suarez (2007), utilizando como mutágenos la luz UV y el bromuro de etidio. El porcentaje de mutantes de Bt1-88, carentes de las estructuras referidas, fue semejante al obtenido en el presente trabajo con el transposón referido. El hecho de que ambas estructuras se pierdan simultáneamente, sugiere que sus genes codificantes se encuentran en un solo operón, el cual puede estar bajo la regulación del gen *cry2A*, ya que cuando se realizó la amplificación y secuenciación por PCR inverso, de una de las mutantes (Bt1-88(148)), se encontró que el gen interrumpido pertenecía a la secuencia promotora de dicho gen. Resultaría conveniente amplificar

los genes completos para determinar la posición y el ordenamiento de los genes involucrados, para así establecer el funcionamiento de los mismos. En otro orden de ideas, una hipótesis que se ha manejado, aunque sin aceptación unánime, en referencia a los cristales (IPPs) de *B. thuringiensis*, es que éstos pudieran servir como fuente de carbono y energía, durante el proceso de germinación de la espora, lo cual favorecería la prevalencia de las cepas cristalíferas en el medio ambiente. Cuando en el presente trabajo se realizaron ensayos de germinación con esporas de Bt1-88 en un medio relativamente rico, se encontró que éstas tienen una velocidad de germinación bastante alta, pues en poco minutos las esporas pasan de un aspecto refringente a otro opaco, evento que se vincula con la formación de la célula vegetativa. Además, al realizar el análisis de las imágenes de microscopía electrónica obtenidas durante este evento, se encontró que la IPP no se vió disminuída o modificada durante el proceso de germinación. Tampoco los apéndices sufrieron modificaciones. Por lo tanto, es probable que tanto el exosporium como otras estructuras de Bt1-88, sean en cambio las estructuras utilizadas como fuente de carbono, no tanto para la germinación, como para la proliferación de las células vegetativas, dado que después de varias horas de incubación, ya no fue posible detectar la presencia de esas estructuras.

Tomando en cuenta todos los aspectos mencionados, es indudable que Bt1-88 debe ser considerada una nueva variedad de *B. thuringiensis*. Por otro lado, su peculiaridad morfológica más notable, es la de poseer 6 apéndices unidos a una pequeñísima IPP. Estas peculiaridades la acercan a Bt2-56, una cepa reportada anteriormente (Rampersad *et al.* 2003). Ambos microorganismos podrían representar un nuevo fenotipo de *B. thuringiensis* (Ventura-Suárez *et al.* 2011).

## 7 CONCLUSIONES

- 1) Los cristales o IPPs presentes en Bt1-88 están constituidos por al menos tres proteínas, con un tamaño molecular de 140, 60 y 30 KDa.
- 2) La secuenciación amino terminal de las proteínas de 160 y 60 kDa, mostraron que se trata de las proteínas Cry1A y Cry2A.
- 3) La presencia de una proteína Cry1A, sugiere que Bt1-88 debiera poseer una IPP de forma romboidal, tóxica hacia lepidópteros. Sin embargo ninguna de éstas predicciones ocurrió, lo cual sugiere que la proteína Cry1A de Bt1-88 está modificada y sólo presenta una función estructural.
- 4) El tamaño de los cristales (IPPs) de Bt1-88, es de aproximadamente 497 nm, presentando en algunas ocasiones formas hexagonales a amorfas. Además dichas IPPs están unidas a 6 apéndices o filamentos.
- 5) Los filamentos tienen un diámetro aproximado de 10 nm y una longitud de 2  $\mu$ m aproximadamente.
- 6) Los filamentos por otra parte, están constituidos por al menos 5 proteínas, de 17, 21, 24, 36 y 45 kDa, de las cuales al menos dos son glicoproteínas, pues se detectó la presencia de carbohidratos neutros (glucosa y/o manosa).
- 7) La velocidad de germinación de las esporas no se vió afectada negativamente por la ausencia de los cristales o IPP.}
- 8) La secuenciación del gen *hag* no permitió establecer la serovariedad de Bt1-88, pero demostró indirectamente que podría tratarse de una nueva variedad de *B. thuringiensis*.

---

## PERSPECTIVAS

- Determinar las secuencias completas de los genes codificantes de las proteínas presentes en las inclusiones paraesporales y en los apéndices.
- Determinar si los genes codificantes a ambas estructuras se encuentran bajo una misma secuencia promotora, es decir en un operón, debido a que cuando se realizaron mutaciones, se perdía la capacidad de sintetizar dichas estructuras.
- Realizar estudios comparativos, tanto moleculares como ultraestructurales, de los apéndices reportados por Smirnova y col. (1991); Misuki y col. (1998) y Walker y col. (2007) con la cepa Bt1-88, para saber si existe alguna relación filogenética.
- Probar ensayos de citotoxicidad y adherencia en líneas celulares, para saber si Bt1-88 es capaz de infectar células eucariotes.
- Determinar el antígeno H mediante serología y realizar los ensayos pertinentes para poder registrar a Bt1-88 como una nueva serovariedad de *B. thuringiensis*.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Baumann L, Okamoto K, Unterman BM, Lynch MJ, Baumann P (1984). Phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus*. *J Invertebr Pathol* **44**: 329–341.
- Bavykin SG, Lysov YP, Zakhariev V, Kelly JJ, Jackman J, Stahl DA, Cherni A (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.
- Bechtel BD, Bulla AL Jr (1976) Electron microscope study of sporulation and paraesporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol* **127**: 1472-1481.
- Berliner E (1911) Über die schlaffsucht der Mehmmottenraupe. *Z. Gesamte Getreidewes* **3**: 63-70.
- Black GE, Snyder AP, Heroux KS (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.
- Bravo A (1997) Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin family proteins and their functional domains. *J Bacteriol* **179**: 2793–2801.
- Bravo A, Gill SS, Soberon M (2005) *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use En: Comprehensive molecular insect science. Elsevier BV, Amsterdam, pp. 175–206.
- Bravo A, Gill SS, Soberon M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* **49**: 423-435.
- Breton YL, Mohapatra NP, Haldenwang WG (2006) In vivo random mutagenesis of *Bacillus subtilis* by use of TnYLB-1, a mariner-based transposon. *Appl Environ Microbiol* **72**: 327-333.
- Brody JR, Scott ER (2004) Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *BioTechniques* **36**: 214-216.

- Brosseau R, Saint-Onge A, Préfontaine G, Masson L, Cabana J (1993) Arbitrary primer polymerase chain reaction, a powerful method to identify *Bacillus thuringiensis* serovars and strains. *Appl Environ Microbiol* **59**: 114-119.
- Carlson CR, Caugant DA, & Kolstø AB (1994) Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl Environ Microbiol* **60**: 1719–1725.
- Cherif A, Brusetti L, Borin S, Rizzi A, Boudabous A, Khyami-Horani H, Daffonchio D. (2003) Genetic relationship in the *Bacillus cereus* group by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment. *Appl Environ Microbiol* **94**: 1108-1119.
- Daffonchio D, Raddadi N, Merabishvili M, Cherif A, Carmagnola L, Brusetti L, Rizzi, A, Chanishvili N, Visca P, Sharp R, Borin S (2006) Strategy for identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains closely related to *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1295–1301.
- De Barjac H Bonnefoi A (1962) Essai the classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga* **7**: 5-31.
- De Barjac H, Frachon E (1990) Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga* **35**: 233-240.
- DelVecchio VG, Connolly JP, Aefantis TG, Walz A, Quan MA, Patra G, Ashton JM, Whittington JT, Chafin RD, Liang X, Grewal P, Khan AS, Mujer CV (2006) Proteomic profiling and identification of immunodominant spore antigens of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 6355–6363.
- DesRosier JP, Lara JC (1981) Isolation and properties of pilli from spores of *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* **146**:613-619.
- Dimitt K, Simon MI (1971) Purification and partial characterization of *Bacillus subtilis* flagellar hooks. *J Bacteriol* **108**: 282-286.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorometric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* **28**: 350-356.

- Fedhila S, Nel P, Lereclus D (2002) The InhA2 metalloprotease of *Bacillus thuringiensis* strain 407 is required for pathogenicity in insects infected via the oral route. *J Bacteriol* **184**: 3296-3304.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Giffel MC, Beumer RR, Klijn N, Wagendorp A, Rombouts, FM (1997) Discrimination between *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* using specific DNA probes based on variable regions of 16S rRNA. *FEMS Microbiol Letters* **146**: 47-51.
- González Villa M (2005) Producción, modo de acción y purificación de la quitosanasa de *Bacillus thuringiensis*. Tesis Profesional, ENCB-IPN.
- Goodman NS, Goettfried RJ, Rogoff MH (1967) Biphasic system for separation of spores and crystals of *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol* **94**: 181-185.
- Guzman Chavez A (2011) Caracterización de los genes de la flagelina y análisis filogenético de tres serovariedades de *Bacillus thuringiensis*: *israelensis*, *morrisoni* y *kurstaki*. Tesis profesional CINVESTAV-Irapuato, Gto. En proceso.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user –friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp* **41**: 95-98.
- Ishiwata S (1901) On a kind of severe flacheric (sotto disease). *Dainihon Sanshi Kaiho* **114**: 1-5.
- Joung KB, Lemaire SP, Côté JC (2001) Genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* serovars revealed by RFLP using random DNA probes. *J Basic Microbiol* **41**: 85-95.
- Joung, K.B. , Côté, J. C. 2001. A phylogenetic analysis of *Bacillus thuringiensis* serovars by RFP-based ribotyping. *J Appl Microbiol* **91**: 279-289.
- Laemli JK, Favre M (1973) Maturation of the head of bacteriophage T4 I. DNA packing agents. *J Molec Biol* **80**: 575-599.
- Lecadet MM, Frachon E, Domanoir VC, Ripouteau H, Hamon P, Laurent K, Thiéry I (1999) Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Microbiol* **86**: 660-672.

- Lee MK, Walters FS, Hart H, Palekar N, Chen JS (2003) The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab  $\delta$ -endotoxin. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4648-4657.
- Levinson BL (1990) High-performance liquid chromatography analysis of two betaexotoxins produced by some *Bacillus thuringiensis* strains, p. 115–136. In L. A. Hickie & W. L. Fitch (ed.), *Analytical chemistry of Bacillus thuringiensis*. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Liu M, Cai QX, Liu HZ, Zhang BH, Yan JP, Yuan ZM (2002) Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. *J Appl Microbiol* **93**: 374-379.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Meadows MP, Ellis DJ, Butt J, Jarrett P, Burges HD (1992) Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. *Appl Environ Microbiol* **58**: 1344–1350.
- Mizuki E, Ohba M, Ichimatsu T, Hwang SH, Higuchi K, Saitoh H, Akao T (1998) Unique appendages associated with spores of *Bacillus cereus*. *J Basic Microbiol* **38**: 33-39.
- Morgan WT, Elson LA (1934) A colorimetric method for the determination of N-acetylglucosamine and N-acetylchondrosamine. *Biochem J* **28**: 988-995.
- Nakata HM, Halvorson HO (1960) Biochemical changes occurring during growth and sporulation of *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* **80**: 801-810.
- Nizkanen A, Kiutummo T, Raisanen S, Raevouri S (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.
- Noguera PA, Ibarra JE (2010) Detection of new cry genes of *Bacillus thuringiensis* by use of a novel PCR primer system. *Appl Environ Microbiol* **17**: 6150-6155.
- Plomp M, Leighton TJ, Wheeler KE, Malkin AJ (2005) Architecture and high-resolution structure of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore coat surfaces. *Langmuir* **21**: 7892-7898.

- Poncet S, Dervyn E, Klier A, Rapopor GT (1997) Spo0A represses transcription of the cry toxin genes in *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology* **143**: 2743–2751.
- Pope L, Rode LJ (1969) Spore fine structure in *Clostridium cochlearium*. *J Bacteriol* **100**: 994-1001.
- Pope L, Yolton DP, Rode LJ (1967) Appendages of *Clostridium bifermentans* spores. *J Bacteriol* **94**: 1206-1215.
- Rampersad J, Ammons D (2005) A *Bacillus thuringiensis* isolation method utilizing a novel strain, low selection and high throughput produced atypical results. *BMC Microbiol* **5**: 52-62.
- Rampersad J, Khan A, Ammons D (2003) A *Bacillus thuringiensis* isolate possessing a spore-associated filament. *Curr Microbiol* **47**: 355-357.
- Rasko DA, Altherr MR, Han CS, Ravel J (2005) Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol Rev* **29**:303-29.
- Reissig JJ, Strominger JL, Leloir LF (1955) A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J Bacteriol Chem* 959-966.
- Reyes-Ramirez A, Ibarra JE (2005) Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* type strains and isolates by using *Bacillus cereus* group-specific repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR analysis. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1346–1355.
- Rode LJ, Crawford MA, Williams MG (1967) *Clostridium* spores with ribbon-like appendages. *J Bacteriol* **93**: 1160-1173.
- Rojas Avelizapa LI (1999) Fermentación de productos proteín-quitosos (desechos de camarón), para la producción de proteasas extracelulares y cristales bioinsecticidas. Tesis Doctoral. Instituto Tecnológico de Veracruz.
- Saitho H, Okumura S, Ishikawa T, Akao T, Mizuki E, Ohba M (2006) Investigation of a novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a paraesporal protein, parasporin-4, that preferentially kills human leukemic T cells. *Biosc Biotechnol Biochem* **70**: 2935-2941.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.
- Schauer R (1976) Characterization of sialic acids. *Methods Enzymol* **50**: 65-89.

- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitenson J, Zeigler DR, Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 775–806.
- Schnepf HE, Whiteley HR (1985) Protein toxins of Bacilli. En J. A. Hoch, P. Setlow (ed.), *Molecular biology of microbial differentiation*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. p. 209–216.
- Selvapandiyani A, Arora N, Rajagopal R, Jalali SK, Singh SP, Bhatnaga RK (2001) Toxicity analysis of N- and C- terminus-deleted vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5855-5858.
- Smirnova TA, Kulinich LI, Galperin MY, Azizbekyan RR (1991) Subspecies-specific haemagglutination patterns of fimbriated *Bacillus thuringiensis* spores. *FEMS Microbiol Letters* **90**: 1-4.
- Solis López M (2006) Estudio de las inclusiones proteicas paraesporales presentes en la cepa Bt-107 de *Bacillus thuringiensis*. Tesis de licenciatura. ENCB-IPN.
- Sorokin A, Candelon B, Guilloux K, Galleron N, Wackerow-Kouzova N, Ehrlich SD, Bourguet DB, Sanchis V (2006) Multiple-Locus sequence typing analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* reveals separate clustering and a distinct population structure of psychrotrophic strains. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1569–1578.
- Sthalteim T, Granum PE (2001) Characterization of spore appendages from *Bacillus cereus* strains. *J Appl Microbiol* **91**:839-845.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics análisis (MEGA) software versión 4.0. *Molec Biol Evol* doi:10.1093/molbev/msm092.
- Tautz D, Renz M (1982) An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal Biochem* **132**: 14-19.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673–4680.

- Vardhan S, Kaushik R, Saxena AK, Arora DK (2011) Restriction analysis and partial sequencing of the 16S rRNA gene as index for rapid identification of *Bacillus* species. *Antonie van Leeuwenhoek* **99**: 283-296.
- Ventura Suárez, A. 2007. Caracterización morfológica y genética de la cepa Bt1-88. Tesis de Maestría. ENCB-IPN.
- Ventura-Suárez A, Cruz-Camarillo R, López Villegas EO, Ibarra Rendon JE, Ammons D, Rampersad J, Rojas-Avelizapa LI (2007) Morphological characterization of isolate Bt1-88, a presuntively novel strain of *B. thuringiensis*. *Acta Microscopica* **16** (Supp. 2): 248-249.
- Walker JR, Gnanam AJ, Blinkova AL, Hermandson MJ, Karymov MA, Lyubchenko YL, Graves PR, Haystead TA, Linse KD (2007) *Clostridium taeniosporum* spore ribbon-like appendage structure, composition and genes. *Mol Microbiol* **63**: 629–643
- Wang X, Xiaofang L, Yinxin L (2007) A modified Coomassie brilliant blue staining method at nanogram sensitivity compatible with proteomic analysis. *Biotechnol Lett* **29**: 1599-1603.
- Wray W, Boulikas T, Wray PV, Hancock R (1981) Silver staining of proteins for polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **118**: 197-203.
- Xu D, Côté JC (2006) Sequence diversity of the *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* sensu lato flagellin (H antigen) protein: comparison with H serotype diversity. *Appl Environ Microbiol* **72**: 4653-4662.
- Yolton DP, Huettel RH, Simpson DK, Rode LJ (1968) Isolation and partial chemical characterization of the spores appendages of *Clostridium taenosporium*. *J Bacteriol* **109**: 881-885.
- Yu CG, Mullins MA, Warren GW, Koziel MG, Estruch JJ (1997) The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelial cells of susceptible insects. *Appl Environ Microbiol* **63**: 532–536.
- Zacharius RM, Zell TE, Morrison JH, Woodlock JJ (1969) Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Analyt Biochem* **30**, 148–152.

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