



Universidad del Papaloapan

Terra Ubellima, Mons Aperta

Campus Tuxtepec

Aislamiento e identificación de cepas de *Bacillus thuringiensis* productoras de proteína Cry

TESIS

Para obtener el título de:

Ingeniero en Biotecnología

Presenta:

Alain Cruz Nolasco

Asesor de tesis

Dra. Ana Karin Navarro Martinez

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca. Julio de 2014

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio de Bioprocesos y de Biología Molecular de la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec bajo la dirección de la Dra.

Ana Karin Navarro Martinez en el marco del proyecto

PROMEP - 103.5/10/0246.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, tutora y jefa de carrera, la **Dra. Ana Karin Navarro Martinez**, por guiarme en este camino que apenas comienzo, la investigación; por brindarme su amistad y más que nada, por tenerme mucha paciencia.

A mis revisores, la **Dra. Sandra T. del Moral Ventura**, el **Dr. Enrique Villalobos Amador** y el **Dr. Julián M. Peña Castro**, por haber dedicado su tiempo para presentar este trabajo de la mejor manera.

Al Dr. **José Abad Zavaleta**, por ser más que un profesor, un buen amigo.

A todos los **profesores** que me han enseñado que la generación de conocimiento siempre tiene que ir acompañada de la ética.

A **PROMEPE (Programa de Mejoramiento del Profesorado)** por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto.

A mi *Alma mater*, la **Universidad del Papaloapan**, por traer los rayos de luz que necesita esta tierra fértil.

Índice General

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
I. Introducción	10
1.1. Historia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
1.2. Ecología y distribución geográfica.....	15
1.3 Biología de <i>Bacillus thuringiensis</i>	19
1.3.1. Morfología colonial.....	20
1.3.2. Tinciones microbiológicas	21
1.4. Identificación molecular de <i>Bacillus thuringiensis</i>	22
II. Justificación	27
III. Hipótesis	29
IV. Objetivo General.....	30
V. Objetivos Específicos	31
VI. Metodología.....	32
6.1 Cinética de crecimiento de <i>B. thuringiensis</i>	33
6.2 Aislamiento y selección de cepas	33
6.3 Extracción de ADN genómico	37
6.4 Identificación Genética.....	37
6.5 Análisis de las secuencias	39
6.6 Flujo Metodológico	47
VII. Resultados y Discusión	48
7.1 Cinética de crecimiento de <i>B. thuringiensis</i>	49
7.2 Aislamiento y selección de cepas.....	50

7.3	Extracción de ADN genómico y amplificación de la región 16S ARNr	55
7.4	Secuenciación e identificación molecular	57
VIII.	Conclusiones	67
IX.	Perspectivas	69
X.	Bibliografía	71
XI.	Anexos	82
11.1	Descripción de Técnicas	83
11.2	Preparación de reactivos para SDS-PAGE	84
11.3	Preparación de geles para SDS-PAGE	85
11.4	Técnica para teñir y desteñir los geles de SDS-PAGE	86
	Entre cada paso se deben hacer 3 lavados con agua destilada.....	86
11.5	Preparación de reactivos para electroforesis de agarosa	86
11.6	Metodología para el aislamiento e identificación de <i>B. thuringiensis</i>	87

Índice de Figuras

Figura 1.	Distribución mundial de <i>Bacillus thuringiensis</i> aislados de suelos cultivados, no cultivados, inhabitados y parques	17
Figura 2.	Distribución de <i>Bacillus thuringiensis</i> en las diferentes regiones de México	18
Figura 3.	Micrografía de transmisión electrónica de <i>Bacillus thuringiensis</i>	19
Figura 4.	Esquema del ribosoma bacteriano: su estructura, subunidades y macromoléculas que lo componen.....	23
Figura 5.	Operón Ribosómico	24
Figura 6.	Estructura secundaria del 16S ARNr de <i>E. coli</i>	25
Figura 7.	Geografía de la cuenca del Papaloapan donde se hizo el muestreo	35

Figura 8 Limpieza de las secuencias a partir de sus cromatogramas en base a su nivel de ruido	39
Figura 9. Ensamblado de una secuencia a partir de los amplicones <i>Forward</i> y <i>Reverse</i>	40
Figura 10. Bases de datos de libre acceso.....	41
Figura 11. Parámetros para los alineamientos necesarios para la construcción de árboles filogenéticos.	45
Figura 12. Parámetros utilizados en la construcción de los árboles filogenéticos en el software MEGA.	46
Figura 13. Cinética de crecimiento de <i>B. thuringiensis</i> HD-73 a 30°C en caldo nutritivo	49
Figura 14. Escrutinio morfológico colonial de posibles aislados de <i>B. thuringiensis</i> con una cepa conocida (<i>B. thuringiensis</i> var <i>kurstaki</i> HD-73).....	51
Figura 15. Escrutinio microscópico de los aislados seleccionados mediante las tinciones diferenciales de Gram y Schaeffer y Fulton	53
Figura 16. Geles de SDS-PAGE al 7% con presencia de bandas de entre 60 y 130 kDa.	54
Figura 17. Amplificación de la región ARNr 16S obteniéndose un producto esperado de 1.5 kb en geles de agarosa al 0.8%.	56
Figura 18. Árbol filogenético base tradicional rectangular de cepas de <i>B. thuringiensis</i> utilizando como referencia las secuencias registradas en el GenBank y el IMG de la región 16S ARNr	59
Figura 19. Árbol filogenético temporal tradicional rectangular de aislados de la cuenca del Papaloapan con cepas de <i>B. thuringiensis</i> utilizando como referencia las secuencias registradas en el GenBank y el IMG de la región 16S ARNr	61
Figura 20. Árbol filogenético definitivo circular de aislados de la cuenca del Papaloapan con cepas de <i>B. thuringiensis</i> y otras variedades, utilizando como referencia las secuencias registradas en el GenBank y el IMG de la región 16S ARNr.....	63

Índice de Tablas

Tabla 1. Suelo y ubicación geográfica de los sitios de muestreo en la región del Papaloapan en el estado de Oaxaca.	34
Tabla 2. Especies de <i>Bacillus</i> y cepas utilizadas para la construcción del árbol base.....	43
Tabla 3. Variedades de <i>B. thuringiensis</i> registradas en el GenBank agregadas para la construcción del árbol filogenético definitivo.....	44
Tabla 4. Selección de aislados con base en la metodología para la identificación de aislados de <i>B. thuringiensis</i> de cada muestra colectada	55
Tabla 5. Relación de los resultados obtenidos por filogenia para los aislados de tierra en la cuenca del Papaloapan	65
Tabla 6. Relación de aislados identificados como <i>B. thuringiensis</i> por medio de análisis filogenéticos	66

RESUMEN

Bacillus thuringiensis (*B. thuringiensis*) es una bacteria cosmopolita, Gram positiva, aerobia, formadora de esporas y productora de la proteína Cry de diferentes pesos moleculares. La proteína Cry se utiliza como insecticida en campos agrícolas por su alta toxicidad en contra de insectos de los órdenes Lepidóptera, Díptera y Coleóptera. Recientemente se ha reportado que algunas proteínas Cry son capaces de inducir apoptosis en contra de diferentes líneas celulares cancerígenas humanas. En el presente trabajo se identificaron 23 aislados de *B. thuringiensis* a partir de suelos cultivados con caña, café, plátano y no cultivados en la región oaxaqueña de la cuenca del Papaloapan. Los aislados se compararon macro y microscópicamente con una cepa conocida (*B. thuringiensis* HD-73). Por medio de tinciones diferenciales se verificó que fueran Gram positivas y formadoras de esporas, además por SDS-PAGE se comprobó que produjeran inclusiones proteicas parasporales de entre 60 y 130 kDa. Posteriormente se realizaron estudios filogenéticos comparando el marcador molecular evolutivo 16S ARNr con los de cepas de *B. thuringiensis* reportadas en las bases de datos de todo el mundo. Los estudios filogenéticos fueron hechos con el software MEGA 6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Con base en el escrutinio morfológico, a la producción de proteína Cry y al análisis filogenético, se identificaron como *B. thuringiensis* a 2 aislados de suelo no cultivado, 2 aislados de suelo de plátano y 19 aislados de suelo de caña.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis (*B. thuringiensis*) is a Gram positive, aerobic, spore-forming cosmopolitan bacteria. It produces a protein named Cry. This bacteria is extensively studied and used as insecticide in agricultural fields due to the high toxicity of Cry protein against insects (Lepidoptera, Diptera and Coleoptera). Recently it has been reported that some Cry proteins are capable of inducing apoptosis against human cancer cell lines. In this study it was identified 23 isolates of *B. thuringiensis* from crops of sugar cane, coffee, banana and uncultivated soils from the Papaloapan region at Oaxaca. The isolates were compared macroscopically and microscopically with a known strain (*B. thuringiensis* HD-73). Using differential staining, it was determined if the isolates were Gram positive and spore forming bacteria. Using SDS-PAGE, it was detected the presence of parasporal protein inclusions between 60 and 130 kDa. The isolates were phylogenetically studied comparing the molecular chronometer 16S rRNA from the isolates with 16S rRNA from *B. thuringiensis* strains reported in databases. Phylogenetic studies were done with MEGA 6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Two isolates from uncultivated soil, two isolates from banana crop and 19 isolates from sugar cane crop soil were identified by morphological screening, production of Cry protein and phylogenetic analysis.

I. Introducción

Bacillus thuringiensis (*B. thuringiensis*) es una bacteria cosmopolita, Gram positiva con forma de bacilo, tamaño promedio de 2 - 5 µm por 1 µm y se caracteriza por la formación de un cristal proteico de diferentes pesos moleculares, en el momento de la esporulación (Schnepf *et al.*, 1998). Este cristal está compuesto por proteínas tóxicas contra insectos de los órdenes Lepidóptera, Díptera y Coleóptera (Hofte y Whiteley, 1989). Los genes *cry* y *cyt* codifican a las proteínas que componen a los cristales parasporales.

B. thuringiensis es un miembro del grupo de *Bacillus cereus*, el cual también incluye a *B. cereus* y *B. anthracis*. *B. thuringiensis* está tan genéticamente relacionado a *B. cereus*, que es distinguible solamente por la presencia de una inclusión parasporal proteica durante su esporulación (Rowe y Margaritis, 1987).

B. thuringiensis se ha aislado de diferentes ambientes naturales, como es el suelo, filoplanos de diversos granos y productos almacenados (Martin y Travers, 1989). Hasta el momento más de doscientos genes de cristales proteicos con actividad insecticida se han clonado, secuenciado y con base en la homología aminoacídica se han clasificado en treinta y dos grupos de genes *cry* y dos grupos de genes *cyt* (Crickmore *et al.*, 1998). Las proteínas Cry también se han clasificado de acuerdo a su toxicidad contra órdenes de insectos específicos. Las proteínas Cry que son tóxicas para lepidópteros pertenecen a los grupos Cry1, Cry9, y Cry2, las toxinas activas contra coleópteros son las proteínas Cry3, Cry7, y Cry8, las cuales tienen doble actividad. Las proteínas Cry5, Cry12, Cry13, y Cry14 actúan contra nemátodos, y las proteínas Cry2, Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19 y proteínas Cyt son tóxicas para dípteros (Crickmore *et al.*, 1998). Debido a

que las inclusiones parasporales producidas por *B. thuringiensis* son biodegradables, y que no contaminan ni suelos, ni aguas, se han utilizado como insecticida ecológico para controlar plagas agrícolas, plagas forestales y vectores de enfermedades (Yasutake, 2006).

Debido a la importancia comercial de *B. thuringiensis*, continuamente se busca aislar nuevas cepas de *B. thuringiensis* en distintas partes del mundo con la finalidad que produzcan nuevas proteínas Cry con mayor potencia insecticida o un espectro de huéspedes más amplio que las actuales (Armengol *et al.*, 2007; van Frankenhuyzen, 1993).

Mizuki (1999) reportó que algunas proteínas producidas por *B. thuringiensis* que no presentan actividad insecticida, son capaces de inducir apoptosis en células humanas cancerígenas. A estas proteínas se les conoce como parasporinas y han sido estudiadas debido a su selectividad ya que sólo actúa contra células humanas no sanas. Las parasporinas son proteínas parasporales no hemolíticas de *B. thuringiensis* capaces de matar células cancerígenas (Katayama *et al.*, 2007).

En 2006 se estableció un sistema de clasificación para las parasporinas con base en la identidad aminoacídica de las inclusiones parasporales. Hasta la fecha se han descubierto y clasificado 18 parasporinas. Las parasporinas se clasifican en 6 grupos: PS1, PS2, PS3, PS4, PS5, PS6. Los mecanismos de acción de las PS1 y PS2 son los más estudiados, en contraste con los de PS3, PS4, PS5 y PS6, pero aún no se conoce el mecanismo completo (Rebecca, 2010).

Las PS1, PS2, PS3 y PS4 fueron designadas, por el Comité de Clasificación y Nomenclatura de δ -endotoxinas de *B. thuringiensis*, como Cry31Aa, Cry46Aa, Cry45Aa, and Cry41Aa, respectivamente (Crickmore *et al.*, 1998). La morfología del cristal parasporal también es diferente; PS1 esférico, PS2 y PS4 forma irregular y PS3 bipiramidal (Kitada *et al.*, 2005)

Dada la abundancia en la naturaleza e inocuidad al humano, las parasporinas producidas por *B. thuringiensis* son candidatas potenciales para el tratamiento contra cáncer.

En este trabajo se obtuvieron aislados de *B. thuringiensis* productores de inclusiones parasporales de entre 60 y 130 kDa. Dichos aislados se obtuvieron de suelos cultivados y no cultivados en la región de la cuenca del Papaloapan. Se amplificó la región 16S ARNr de los aislados y se realizaron análisis filogenéticos comparándolos con distintas cepas de *B. thuringiensis* disponibles en las bases de datos.

1.1. Historia de *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis se descubrió en Japón como patógeno del gusano de seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae) (Ishiwata, 1901). En Alemania se aisló la misma bacteria a partir de larvas del lepidóptero *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae) (Berliner, 1911). Se describió como un bacilo Gram positivo, que presenta un cristal parasporal de naturaleza proteica, endospora y

flagelos peritricos. Se le denominó *Bacillus thuringiensis*, en honor a Thuringia, la región alemana de donde se aisló (Berliner, 1915).

El uso de *B. thuringiensis* para el control de insectos se inició en los años 30 del siglo pasado contra el barrenador europeo del maíz, (*Ostrinia nubilalis*). El primer producto comercial salió en Francia en 1938 bajo el nombre de Sporeine. En EEUU se comercializó por primera vez en 1957, bajo el nombre de Thuricide (Whalon y Wingerd, 2003).

En 1970 en EEUU Dulmage descubrió la cepa HD-1 de *B. thuringiensis* variedad *kurstaki*. Esta variedad es entre 2 y 200 veces más tóxica que las variedades anteriormente utilizadas en la producción comercial de estos bioinsecticidas (van Frankenhuyzen, 1993).

En 1977, dos entomólogos israelíes aislaron una variedad de *B. thuringiensis* de larvas del mosquito *Culex sp*, la cual fue nombrada *israeliensis*. La variedad *israeliensis* fue considerada útil en salud pública para el control de vectores de enfermedades tropicales por ser patógeno de larvas del mosquito *Aedes aegypti* (Díptera, Culicidae), vector del dengue (Golberg y Margalit, 1977).

Otros estudios mostraron que *B. thuringiensis* también podría ser utilizado contra insectos de otros órdenes Hymenoptera, Homoptera y Mallophaga, nemátodos, ácaros y protozoos (Drummond *et al.*, 1995)

En la actualidad se ha usado el gen Cry11a (codificante para una proteína activa contra dípteros) de *B. thuringiensis* para desarrollar bacterias acuáticas recombinantes que forman parte de la dieta de larvas de insectos (Armengol *et al.*,

2005). Además, mediante métodos de transferencia de genes de *B. thuringiensis* se generan plantas de maíz, tabaco y tomate con resistencia a los insectos plaga, estas variedades transgénicas de *B. thuringiensis* reducen sustancialmente el uso de insecticidas en algunos cultivos por ser un fuerte componente de control biológico (Romeis *et al.*, 2006). Las plantas transgénicas resistentes a insectos diseñadas con genes de *B. thuringiensis* representan la primera generación de cultivos transgénicos vegetales (Estruch *et al.*, 1997).

Algunas proteínas Cry de cepas de *B. thuringiensis*, que no tienen actividad insecticida, presentan actividad citotóxica contra varios tipos de células de vertebrados incluso contra células cancerígenas humanas (Mizuki, 1999), así el término de parasporinas se usa para describir a las proteínas Cry con actividad citotóxica en contra de células humanas cancerígenas (Mizuki *et al.*, 2000) .

Las proteínas parasporales de *B. thuringiensis var shandogiensis* presentan actividad citotóxica contra células humana leucémicas T (MOLT-4) (Lee *et al.*, 2001) así como las de *B. thuringiensis var dakota* y adicionalmente, son moderadamente citotóxicas contra células humanas de cáncer cérvico uterino (HeLa) (Kim *et al.*, 2000).

1.2. Ecología y distribución geográfica

Por las múltiples fuentes donde puede ser aislado, *B. thuringiensis* se considera un microorganismo cosmopolita. Históricamente *B. thuringiensis* se considera una

bacteria del suelo en donde persiste principalmente en forma de endospora (Yara *et al.*, 1997) y donde se ha encontrado abundantemente por todo el mundo (Martin y Travers, 1989; Bernhard *et al.*, 1997; Bravo *et al.*, 1998; Iriarte *et al.*, 1998; Uribe *et al.*, 2003; Armengol *et al.*, 2006).

B. thuringiensis también se encuentra en partículas de polvo en suspensión (Martin y Travers, 1989), cuerpos de insectos enfermos o muertos (Porcar y Caballero, 2000), productos almacenados (Meadows *et al.*, 1992; Kaelin y Gadani, 2000), alimentos (Damgaard *et al.*, 1996), piel de animales (Akhurst *et al.*, 1997), sedimentos marinos (Maeda *et al.*, 2000), e incluso como patógeno humano oportunista (Damgaard *et al.*, 1997a). Además, se ha encontrado en hojas de plantas (Nair *et al.*, 2002; Collier *et al.*, 2005).

B. thuringiensis ha sido aislado del suelo en todos los continentes [Figura 1] y todos los climas. En Oceanía se encontró *B. thuringiensis* en áreas desérticas de Nueva Zelanda. En Asia se encontró en Nepal, Pakistán, India, República de Corea, Vietnam y China. En Europa se encontró en España, Portugal, Francia, Alemania, Holanda, Inglaterra, Irlanda, Polonia, Noruega, Suecia e Islandia. En África se ha encontrado en Egipto, Marruecos y Camerún. En América se ha encontrado en México, Guatemala, Jamaica, Honduras, Nicaragua, Perú, Brasil, Argentina, Colombia, Bolivia, Venezuela, Ecuador y Estados Unidos (Martin y Travers, 1989; Kreoger *et al.*, 1995; Hernández *et al.*, 2005).



Figura 1. Distribución mundial de *Bacillus thuringiensis* aislados de suelos cultivados, no cultivados, inhabitados y parques (Martin y Travers, 1989; Kreoger *et al.*, 1995; Hernández *et al.*, 2005).

En México se ha aislado *B. thuringiensis* de cinco macroregiones [Figura 2]. Los suelos muestreados han sido de campos de cultivo de maíz, sorgo, arroz, caña de azúcar, frijol, chícharos, café, cacao, nuez, alfalfa, pimiento, higo, planta de agave, durazno, mango, papaya, melón, tomate, col, calabaza, cebolla, brócoli y zanahoria (Bravo *et al.*, 1998). También se han muestreado de ambientes naturales (bosques de pinos, bosques tropicales, bosques templados y pastizales) donde nunca se han aplicado las toxinas que produce *B. thuringiensis*. Las elevaciones donde se han realizado estos aislados varían desde el nivel del mar hasta 2900 m sobre el mismo. En la región Pacífico-Norte del país se ha encontrado *B. thuringiensis* en los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit; en la región Norte en los estados de Durango, Zacatecas y San Luis Potosí; en ambas regiones en estepas semiáridas. En la región central se ha aislado *B. thuringiensis*

en los estados de Jalisco, Guanajuato, Morelos y Puebla en climas fríos. En la región del Golfo de México los estados que reportan presencia de *B. thuringiensis* son Veracruz y Tabasco; y en la región Pacífico-Sur se encuentra en Oaxaca y Chiapas; ambas regiones son de climas húmedos tropicales (Bravo *et al.*, 1998).

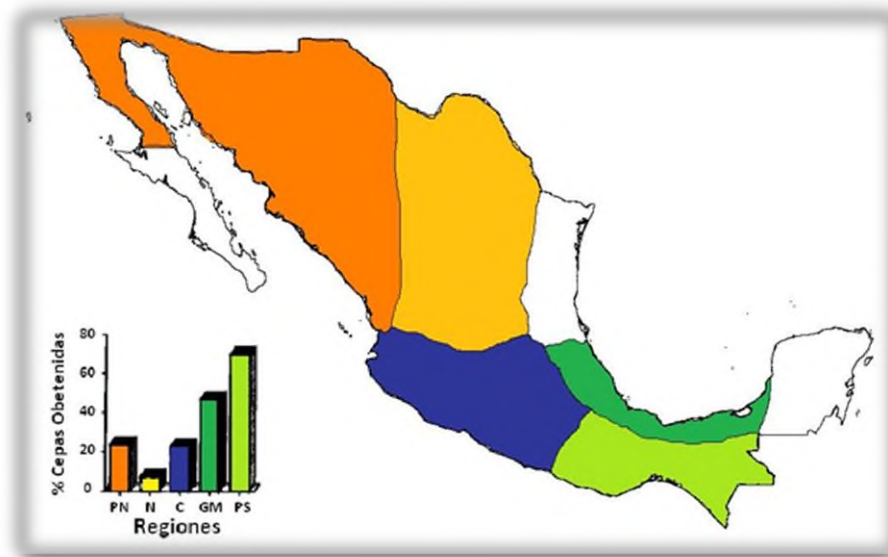


Figura 2. Distribución de *Bacillus thuringiensis* en las diferentes regiones de México. PN, región Pacífico-Norte; N, región Norte. Ambas regiones de climas semiáridos. C, región de la Meseta Central correspondiente a clima frío. GM, región del Golfo de México; PS, región Pacífico-Sur. Estas últimas dos regiones pertenecen a climas tropicales y húmedos. La gráfica muestra el porcentaje de aislamientos positivos de *B. thuringiensis* por muestras de suelo recolectadas (Bravo *et al.*, 1998).

Como se puede apreciar en la Figura 2, en la región Pacífico Sur y del Golfo de México se ha observado el mayor número de aislamiento de *B. thuringiensis*, por lo que es muy probable poder aislarla dicha bacteria de suelos de la región del Papaloapan.

1.3 Biología de *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis tiene un ciclo de vida que comprende la formación de endosporas cuando las condiciones del medio en el que se encuentra son adversas. La endospora es una forma de resistencia frente a situaciones de estrés ambiental como la desecación o la falta de nutrientes, entre otros. Junto con la endospora, *B. thuringiensis* forma un cristal paraesporal constituido por δ -endotoxinas (Schnepf *et al.*, 1998; de Maagd *et al.*, 2001; Whalon y Wingerd, 2003), estas inclusiones parasporales tienen diferentes pesos moleculares y se denominan proteína Cry debido a que forman cristales proteicos.[Figura 3]

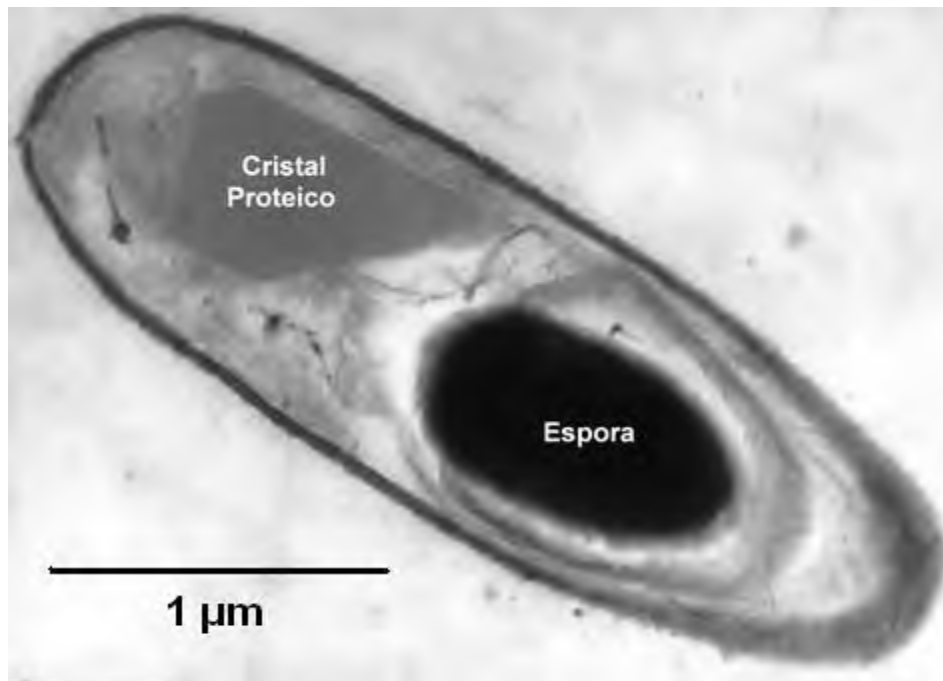


Figura 3. Micrografía de transmisión electrónica de *Bacillus thuringiensis*. Se muestra espora bacteriana y cristal proteico (Sanchis, 2010).

Las proteínas producidas por *B. thuringiensis* son insolubles salvo a pH mayor a 9 en el que se solubilizan e hidrolizan. Todas las especies de insectos poseen un jugo intestinal alcalino, el cual disuelve la proteína. Las proteasas alcalinas del insecto hidrolizan la proteína a fragmentos tóxicos (Heimpel y Angus, 1959). Los síntomas que se observan a partir de que las larvas de insectos susceptibles ingieren los cristales de *B. thuringiensis* son: cese de la ingesta, parálisis del intestino, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte de la larva (Bravo y Soberón, 2007).

1.3.1. Morfología colonial

La morfología colonial de *B. thuringiensis* en agar nutritivo se caracteriza por formar colonias circulares con borde irregular, perfil plano y color marfil claro, su textura es seca y cerosa. En colonias maduras de *B. thuringiensis* se aprecia una superficie brillante y lisa en su parte central, mientras que el halo externo presenta un color mate. La diferencia de tonalidades entre las partes interna y externa de las cepas de *B. thuringiensis*, se debe a la esporulación de las células centrales, más adelantadas en el ciclo (Medrano *et al.*, 2000).

B. thuringiensis crece en agar nutritivo entre 15 y 45°C. La temperatura óptima de crecimiento se sitúa de 26 a 30°C. *B. thuringiensis* tiene un pH óptimo entre 6.5 y 7.5 (Medrano *et al.*, 2000).

1.3.2. Tinciones microbiológicas

Para hacer el reconocimiento de *B. thuringiensis* se han utilizado diversas pruebas como la tinción de Gram y la de Schaeffer y Fulton.

La tinción de Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para la visualización de bacterias. Debe su nombre al bacteriólogo danés Christian Gram, que desarrolló la técnica en 1884. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana. Las bacterias Gram positivas se visualizan de color violeta y las Gram negativas se visualizan de color rosa (Medrano *et al.*, 2000). Si es aerobio, esporulado y Gram positivo, es del género *Bacillus* (Brock, 2004). Las células de *B. thuringiensis* se tiñen de violeta debido a su ancha membrana de peptidoglicanos, por lo cual se permea debido a solventes utilizados quedando teñidas de violeta (Brock, 2004).

La tinción de Schaeffer y Fulton es una técnica utilizada para identificar endoesporas, las cuales se tiñen de verde y el resto del cuerpo bacteriano de rojo (Schaeffer y Fulton, 1993). En *B. thuringiensis* se aplica esta técnica tomando un frotis del cultivo bacteriano durante la fase de esporulación. Hoy en día ambas técnicas microbiológicas, con ayuda de las características macroscópicas se siguen utilizando para la identificación de *B. thuringiensis*.

1.4. Identificación molecular de *Bacillus thuringiensis*

Los ácidos nucleicos pueden considerarse como cronómetros moleculares o documentos de la historia evolutiva. Los cambios en la secuencia de los ácidos nucleicos se producen al azar y aumentan con el tiempo, por lo tanto, las diferencias en la secuencia de los nucleótidos que integran macromoléculas homólogas, presentes en dos formas de vida, reflejan la distancia evolutiva existente entre ellas (Zuckerlandl *et al.*, 1965). El ADN que codifica para el ARN ribosomal (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese a principios de la década de 1970 (Olsen *et al.*, 1993). Desde entonces, el análisis de los ARNr 16S se ha utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota (Rodicio y Mendoza, 2004).

Los ribosomas son macromoléculas complejas, altamente especializadas para el proceso de síntesis de proteínas. El ribosoma bacteriano tiene un coeficiente de sedimentación de 70S (expresado en unidades Svedberg), y puede disociarse en dos subunidades, la subunidad mayor (50S) y la subunidad menor (30S). Cada subunidad es un complejo ribonucleoproteico constituido por proteínas ribosómicas y moléculas de ARNr específicas. La subunidad 30S contiene el ARNr 16S y 21 proteínas diferentes (numeradas desde S1-S21, donde S procede de *small*), mientras que la subunidad 50S contiene los ARNr 5S y 23S junto con unas 34 proteínas (L1-L34; L, *large*) [Figura 4].

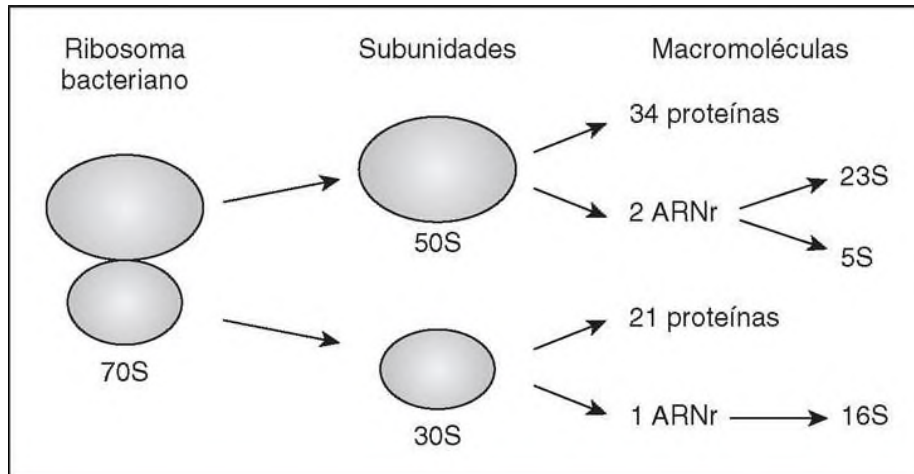


Figura 4. El ribosoma bacteriano. Esquema de su estructura, subunidades y macromoléculas que lo componen (Rodicio y Mendoza, 2004).

En bacterias, los genes que codifican los ARN ribosomales están organizados en operones, es decir son un conjunto de genes que se transcriben a partir de la misma región promotora. Cada operón ribosómico (*rrn*) incluye genes para los ARNr 23S (*rrl*), 16S (*rrs*) y 5S (*rrf*), separados por regiones espaciadoras o intergénicas (IG), y contiene además genes para uno o más ARN de transferencia (ARNt) [Figura 5]. El producto de la transcripción del operón a partir de dos promotores, P1 y P2, situados en la región anterior a *rrs*, es procesado por la enzima ARNasa III mediante cortes en sitios específicos que separan las tres clases de ARNr, el/los ARNt y las dos IG (Rodicio y Mendoza, 2004).

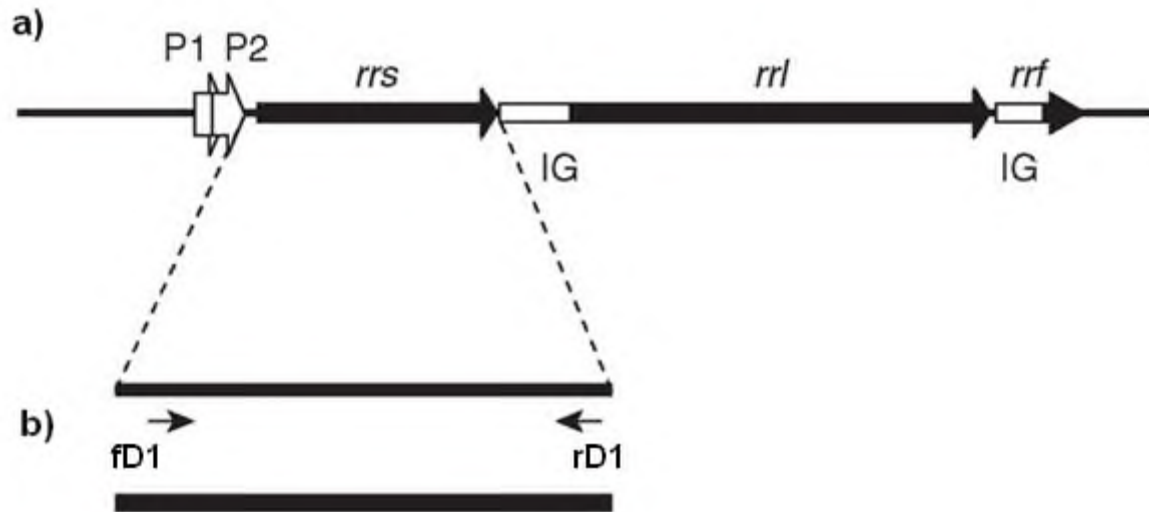


Figura 5. El operón ribosómico (*rrn*). a) representación esquemática del operón, donde se muestran los genes estructurales de los tres tipos de ARNr (*rrs*, *rrl* y *rrf*), los promotores P1 y P2, y las regiones intergénicas (IG) (Rodicio y Mendoza, 2004). b) estrategia de amplificación del gen *rrs* (ADNr 16S). Se indica la posición de los oligonucleótidos fD1 (*forward*) y rD1 (*reverse*) utilizados para la amplificación (y posterior secuenciación) del gen completo (fD1 y rD1; amplicón de 1542 pb, aproximadamente) (Weisburg *et al.*, 1991).

El ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 b, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el ARNr 16S se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla [Figura 6] (Neefs *et al.*, 1990). El ARNr 16S procede de las subunidades pequeñas de los ribosomas (ARNr SSU, del inglés, *small subunit*), estas subunidades pequeñas se encuentran altamente conservados, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero además contienen variaciones que se concentran en zonas específicas.

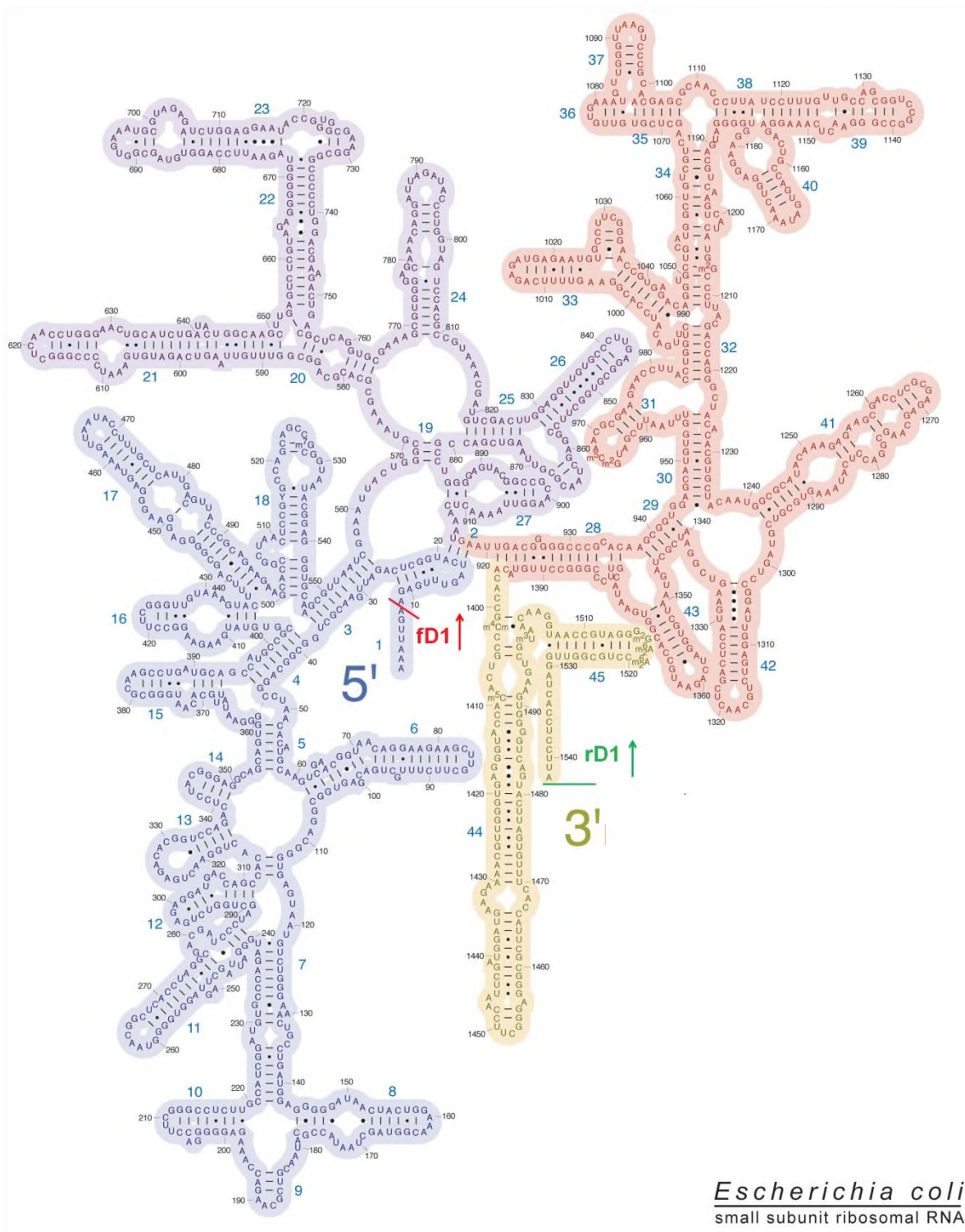


Figura 6. Estructura secundaria del ARNr 16S de *E. coli*. En rojo se muestra desde donde empieza a amplificar el *primer* fd1. En verde se indica desde donde amplifica el *primer* rd1 (Weisburg *et al.*, 1991).

El ARNr 16S presenta una serie de características, con base en las cuales fue considerado por Woese (1987) como cronómetro molecular definitivo ya que se trata de una molécula presente en todas las bacterias actuales, por tanto, se considera una diana universal para su identificación. La estructura y función del ARNr 16S han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios. Dichos cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas a lo largo de toda la escala evolutiva. Los ARNr SSU contienen, sin embargo, suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos. El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S (1.5 kb) minimiza las fluctuaciones estadísticas. La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ARNr 16S existen amplias bases de datos y en continuo crecimiento. No obstante hay que tener presente que actualmente en taxonomía se recomienda la identificación que utiliza criterios fenotípicos junto con datos de secuenciación. Esto implica que la secuenciación del ARNr 16S no aportará siempre una identificación definitiva a nivel especie (Patel, 2001).

II. Justificación

Uno de los objetivos de la biotecnología agrícola es reducir la dependencia del uso intensivo de insecticidas químicos sin afectar la productividad del campo, teniendo como consecuencia la reducción tanto en el costo de insumos como de los problemas ambientales. Una alternativa para estos problemas es el control biológico de plagas con el uso de patógenos para mantener reducidas las poblaciones. Uno de los patógenos más utilizados es *Bacillus thuringiensis*, capaz de producir una δ -endotoxina altamente tóxica y específica, utilizada para formular bioinsecticidas denominada proteína Cry. En México, desde 1999, la venta de bioinsecticidas a base de *Bacillus thuringiensis* se incrementó en un 15-20% anual, mientras que en el mercado internacional representa de 120-140 millones de dólares (Tamez, *et al.*, 2001).

Algunas proteínas Cry que no tienen actividad insecticida, presentan actividad citotóxica contra varios tipos de células de vertebrados incluso contra células cancerígenas humanas (parasporinas).

Bacillus thuringiensis es una bacteria cosmopolita que se puede aislar de suelo, hojas, insectos muertos, etc. Esta característica ha generado la constante búsqueda de nuevas cepas productoras de proteínas Cry para usarse en el control biológico de plagas. Así como de cepas productoras de parasporinas como potencial tratamiento contra el cáncer.

Por lo tanto, en el presente trabajo se propone obtener aislados de *B. thuringiensis* de suelos de la región del Papaloapan productoras de proteínas Cry o parasporinas.

III. Hipótesis

Es posible aislar cepas de *Bacillus thuringiensis* productoras de proteína Cry en suelos de la región de la cuenca del Papaloapan.

IV. Objetivo General

Obtener e identificar aislados de *Bacillus thuringiensis* que produzcan proteína Cry (130 kDa) o parasporinas (90 kDa) en suelos de la región de la cuenca del Papaloapan.

V. Objetivos Específicos

1. Establecer y estandarizar una metodología para obtener aislados de *B. thuringiensis* en suelos de la región de la cuenca del Papaloapan.
2. Determinar las condiciones para la extracción y amplificación del gen 16S ARNr de los aislados seleccionados.
3. Realizar el estudio bioinformático con base en el gen 16S ARNr para la construcción de árboles filogenéticos mediante la clasificación taxonómica de los aislados seleccionados.

VI. Metodología

6.1 Cinética de crecimiento de *B. thuringiensis*

En experimentos previos del grupo de trabajo se observó que la tinción de Gram puede dar un falso negativo si la muestra para realizar el frotis se colecta en una etapa que no sea de crecimiento exponencial. Por otro lado, se observó que los tiempos y la velocidad de crecimiento de *B. thuringiensis* cambia con respecto a las condiciones del cultivo utilizado. Por lo tanto, se realizó una cinética de crecimiento de la cepa *B. thuringiensis* HD-73 (ATCC-3566) donada por el laboratorio de Bioprocesos del CINVESTAV Zacatenco para determinar el momento de toma de muestra para la realización de las pruebas de identificación microscópica y extracción de ADN. El cultivo se realizó en un matraz de 1 L con 200 ml de caldo nutritivo inoculando con un disco de esporas. Se cultivó por 25 h a 30°C a 180 rpm en una agitadora New Brunswick. Cuando el cultivo alcanzó más del 85% de esporulación se dio por terminado. El conteo de bacilos y esporas se realizó cada hora en una cámara Neubauer usando un microscopio. Las muestras de mosto fermentado se sometieron a diluciones decimales por duplicado hasta 1:100. Posteriormente, se calculó la concentración de biomasa en términos de gramos de células por litro considerando que el peso de la célula es de 2.3 pg (Rodríguez y de la Torre, 1996).

6.2 Aislamiento y selección de cepas

Se realizó un muestreo al azar en suelos no cultivados y cultivados con caña de azúcar, café y plátano en la región de la cuenca del Papaloapan [Tabla 1]

[Figura 7]. Se tomó 1 g de muestra de suelo a una profundidad de 15 cm, estas muestras se refrigeraron a 5°C por 24 h en el laboratorio de Bioprocesos en la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec. Se realizaron diluciones seriales a las muestras de suelo hasta 1×10^{-3} con agua estéril, posteriormente se sembraron por vaciado en placas con agar nutritivo y se incubaron por 24 h a 30°C.

Tabla 1. Suelo y ubicación geográfica de los sitios de muestreo en la región del Papaloapan en el estado de Oaxaca.

Suelo	Ubicación Geográfica	Coordenadas	Altura sobre el nivel del mar (m)
No cultivado	San Bartolo Tuxtepec, Oax.	N 18° 00'.744" WO 96° 10'.146"	55
Caña	Carretera Tuxtepec-Palomares	N 31° 37'.514" W 131° 21'.293"	89
		N 45° 03'.5044" W 1115° 52'.022"	92
		N 17° 59'.597" W 96° 06'.895"	45
		N 17° 59'.597" W 96° 06'.882"	53
		N 17° 59'.597" W 96° 06'.884"	49
		N 18° 06'.342" W 96° 15'.249"	50
		N 18° 06'.349" W 96° 15'.264"	59
		N 18° 06'.357" W 96° 15'.291"	61
		N 18° 06'.366" W 96° 15'.241"	66
		N 18° 06'.402" W 96° 15'.234"	35
Café	Armadillo Chico Valle Nacional	N 17° 50'.764" WO 96° 18'.992"	605
Plátano	San Bartolo Tuxtepec, Oax.	N18°05'.924" WO 96°06'.767"	53



Figura 7. Geografía de la cuenca del Papaloapan donde se marcan los sitios de muestreo

Después de incubar el cultivo se compararon macroscópicamente las colonias de los aislados con la cepa *B. thuringiensis* HD-73 y se seleccionaron las más parecidas. Para aislar las cepas seleccionadas, se realizaron subcultivos por

estriado en agar nutritivo y se incubaron por 24 h a 30°C. Se repitió el procedimiento hasta tener un solo aislado por caja.

La tinción de Gram se realizó haciendo un frotis del caldo de cultivo a las 8 horas de iniciado el mismo ya que a este tiempo el cultivo se encuentra en crecimiento exponencial. La tinción de Schaeffer y Fulton se realizó tomando un frotis después de 24 h, a este tiempo, el cultivo está en fase de esporulación. De esta forma se seleccionaron los aislados Gram positivos y formadores de esporas. A estos aislados se les determinó la presencia de las proteínas insolubles de entre 60 y 130 kDa al final del cultivo líquido de *B. thuringiensis* mediante geles de SDS-PAGE. Para la determinación por SDS-PAGE (electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio) las cepas seleccionadas se cultivaron en caldo nutritivo a 30°C a 180 rpm por 48 h. Al término de la fermentación, se centrifugó el mosto a 5500 rpm por 30 min. Se lavó el precipitado resultante, que contenía las proteínas insolubles, con una solución de agua acidulada a un pH de 2.5 y con una solución isotónica de NaCl al 0.85% (P/V). Posteriormente se solubilizaron las proteínas resultantes según el método de Laemmli (Laemmli, 1970). El gel SDS-PAGE al 7% se corrió con el *buffer* de corrida Tris Glicina por 1 h a 100 V según lo reportado por Navarro (2001). Como marcador de peso molecular se utilizó suero albúmina de bovino (63 kDa) y *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 productora de sólo una proteína Cry (Cry1Ac, 133kDa).

6.3 Extracción de ADN genómico

Se realizaron cultivos con los aislados Gram positivos, formadoras de esporas y que produjeron proteínas insolubles al final de su cultivo líquido de 130 y 60 kDa por 8 h a 180 rpm. A las 8 horas del cultivo se tomó una muestra de células para la extracción de ADN mediante el Kit comercial Ultraclean™ Microbial DNA Isolation Kit según las recomendaciones del proveedor. Posteriormente se realizó una electroforesis de agarosa al 0.8% (P/V) a 100 V por 1 h para verificar la extracción de ADN de las cepas seleccionadas.

6.4 Identificación Genética

El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S incluyó tres etapas:

- a) amplificación del gen completo;
- b) determinación de la secuencia de nucleótidos del amplificado, y
- c) análisis de la secuencia

La amplificación del gen ARNr 16S de cada aislado seleccionado se realizó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las regiones conservadas de las bacterias facilitan el diseño de oligonucleótidos o *primers* iniciadores (20 nucleótidos aproximadamente). Para amplificar el ARNr

16S prácticamente completo, se utilizaron *primers* diseñados con base en secuencias conservadas próximas a los extremos 5' y 3' del gen, que originan amplificadores de 1.5 kb, aproximadamente. Los *primers* utilizados para la amplificación fueron los universales para eubacterias y logran amplificar casi por completo el gen 16S ARNr. El par de *primers* utilizado fue *forward* fD1 (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGC-3') y *reverse* rD1 (5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg *et al.*, 1991). La polimerasa utilizada para la PCR fue *DreamTaq Green PCR Master Mix* de *Thermo Scientific*, las concentraciones de la mezcla utilizada aforada a 25 µl fue la siguiente: 12.5 µl de *GreenTaq* Polimerasa, 2.5 µl a 10 µM de fD1 y rD1, 1 µl a 30 ng/µl de ADN, y 6.5 µl de agua libre de nucleasas. Las condiciones de la PCR, programadas de acuerdo al fabricante de la polimerasa, fueron un paso sencillo de desnaturalización por 5 min a 95°C, una programación de 35 ciclos (cada ciclo consistente de desnaturalización a 95°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 40 s, y extensión a 72°C por 1.5 min), y un paso extra de extensión a 72°C por 10 min. Los productos de PCR fueron almacenados a -20°C. Para estos productos de PCR se realizó una electroforesis de agarosa disuelta en TAE al 0.8% (P/V) para verificar la amplificación. Los productos de PCR se purificaron mediante el uso del kit comercial *Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit #K0701, #K0702* y se mandaron a secuenciar a la compañía biotecnológica MacroGen Korea Inc. bajo el servicio *16S rRNA Full Sequencing*.

6.5 Análisis de las secuencias

Las secuencias de los amplicones se analizaron mediante la evaluación de los cromatogramas. Los cromatogramas de las secuencias que presentaron ruido se redujeron para tener solamente el fragmento de la secuencia con mayor fiabilidad. En la figura 8a se aprecia la región eliminada por alto nivel de ruido, la flecha indica el punto a partir de donde la secuencia es fiable. En la figura 8b se aprecia un cromatograma fiable ya que sus picos están bien definidos. En la figura 8c se muestra hasta qué punto de la secuencia puede tomarse como fiable. Después de la línea roja no se toma en cuenta.

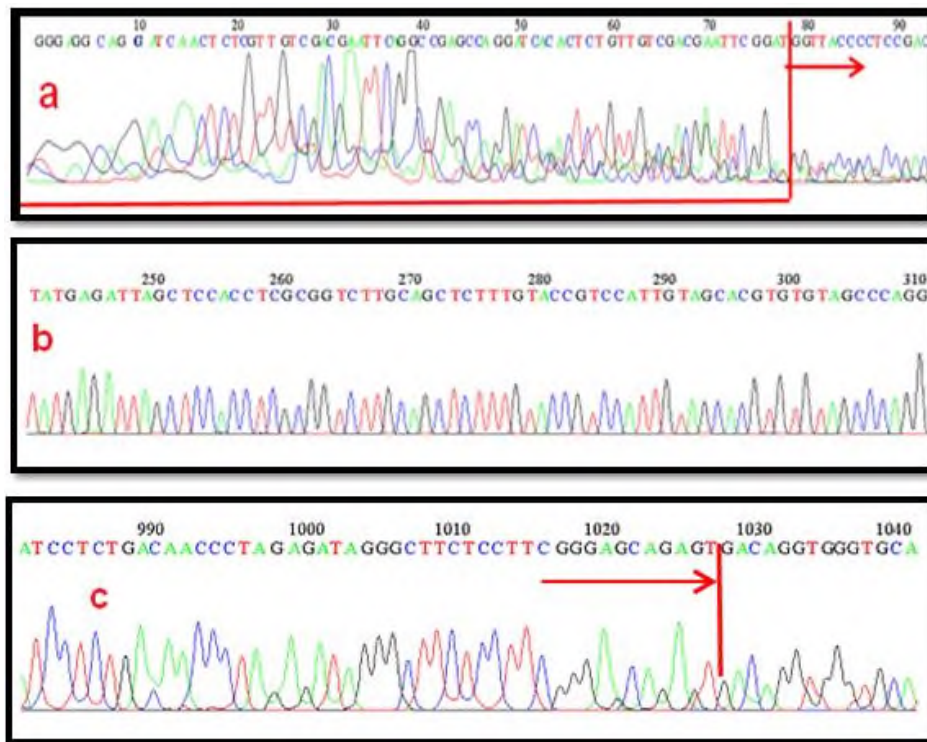
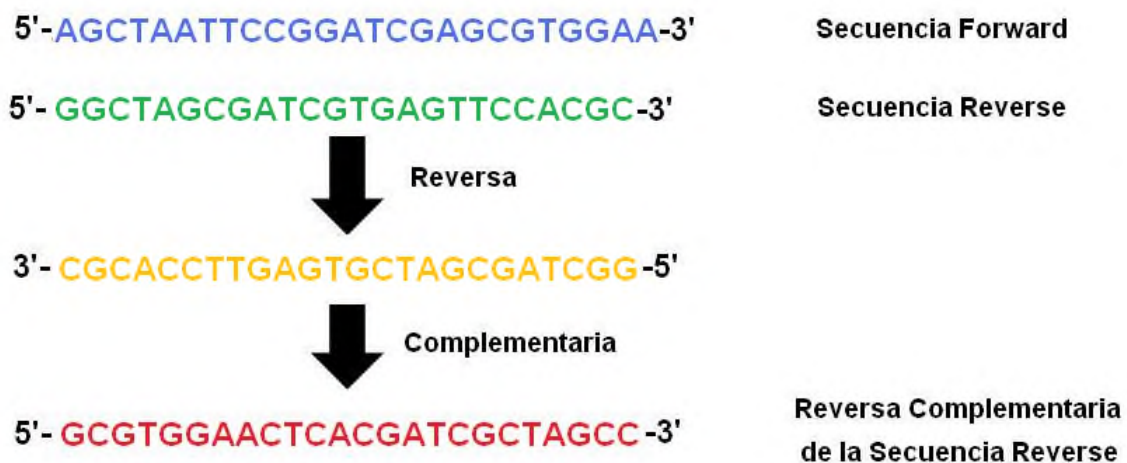


Figura 8. Limpieza de las secuencias a partir de sus cromatogramas en base a su nivel de ruido. a) región eliminada por presentar ruido y ser una secuencia no fiable. b) región de cromatograma fiable. c) región hasta donde un cromatograma puede tomarse como fiable.

Posterior a la limpieza de las secuencias de los amplicones, se hizo el ensamble de los productos *forward* y *reverse*. Para esto, se obtuvieron la secuencias reversas complementarias de todas las *reverse* para que estuvieran en dirección 5'-3'. Posteriormente con un alineamiento de la secuencia *forward* y la reversa complementaria se obtuvo la secuencia consenso [Figura 9]. Esto se hizo con el software MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*).



Se alinea la Sec. Forward con la Reversa Complementaria de la Sec. Reverse



Se ensambla la nueva Secuencia



Figura 9. Ensamblado de una secuencia a partir de los amplicones *Forward* y *Reverse*.

La última etapa fue la comparación de la secuencia del ARNr 16S con las depositadas en bases de datos como GenBank NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (National Center for Biotechnology Information) y RDP <http://rdp.cme.msu.edu/> (Ribosomal Database Project) [Figura 10].



Figura 10. Bases de datos de libre acceso. a) portal de la RDP (Ribosomal Database Project). b) portal de la NCBI, con la base de datos específica para secuencias de ARNr 16S.

Finalmente, a partir del análisis del gen ARN 16s de nuestros aislados y las secuencias completas obtenidas de las base de datos IMG <http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/edu/main.cgi> (*Integrated Microbial Genome*) y NCBI se construyeron árboles filogenéticos.

Un árbol filogenético muestra las relaciones evolutivas entre varias especies u otras entidades que se cree que tienen una ascendencia común y mediante comparaciones se pueden identificar y clasificar organismos.

Las secuencias utilizadas para la elaboración del primer árbol filogenético se muestran en la Tabla 2. Dicho árbol fue considerado como árbol base ya que se construyó con secuencias de distintas especies de *Bacillus* así como las especies pertenecientes al grupo de *B. cereus*.

Se hicieron más construcciones filogenéticas comparando nuestros aislados con un mayor número de secuencias de distintas variedades de *B. thuringiensis* contenidas en las bases de datos antes mencionadas. El árbol resultante se denominó árbol definitivo. Las secuencias utilizadas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 2 Especies de *Bacillus* y cepas utilizadas para la construcción del árbol base.

Base de Datos	Especie	No. de acceso
IMG	<i>Bacillus anthracis</i> CI	NC_014335
	<i>Bacillus cereus</i> E33L	NC_006274
	<i>Bacillus cereus</i> NC7401	NC_016771
	<i>Bacillus subtilis</i> QB928	CP003783
	<i>Bacillus subtilis spizizenii</i> DSM 15029	NC_016047
	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> str. W23	NC_014479
	<i>Bacillus thuringiensis</i> BMB171	NC_014171
	<i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407	CP003889
	<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-771	CP003752
	<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-789	CP003763
	<i>Bacillus thuringiensis</i> MC28	CP003687
	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>chinensis</i> CT-43	CP001907
	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>konkukian</i> str. 97-27	NC_005957
	<i>Bacillus thuringiensis</i> str. <i>Al Hakam</i>	NC_008600
NCBI	<i>Bacillus anthracis</i> str. Ames	NR_074453
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	NC_004722
	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 = ATCC 14580	NC_006322
	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 6051-HGW	NC_020507
	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i> str. HD73	NC_020238
	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077	NR_043403
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. <i>Sakai</i>	NC_002695

Tabla 3. Variedades de *B. thuringiensis* registradas en el GenBank agregadas para la construcción del árbol filogenético definitivo.

<i>Bacillus thuringiensis</i> variedad	No. de acceso al GenBank
<i>finitimus</i>	EF210290
<i>aralesti</i>	EF210300
<i>fukuokaensis</i>	EF210301
<i>sotto</i>	EF210309
<i>kenyae</i>	EF210315
<i>entomocidus</i>	EF210312
<i>ostriniae</i>	EF210314
<i>tolworthi</i>	EF210288
<i>thompsoni</i>	EF210310
<i>tohokuensis</i>	EF210294
<i>shandongensis</i>	EF210287
<i>seoulensis</i>	EF210286
<i>oswaldocruzi</i>	EF210284
<i>higo</i>	EF210308
<i>roskildiensis</i>	EF210304
<i>wratislaviensis</i>	EF210311
<i>poloniensis</i>	EF210305
<i>zhaodongensis</i>	EF210289
<i>bolivia</i>	EF210299
<i>pulsiensis</i>	EF210285
<i>graciosensis</i>	EF210302
<i>vazensis</i>	EF210293

Los parámetros utilizados para hacer los alineamientos necesarios para la elaboración de los árboles fueron los que ofreció el software MEGA [Figura 11].

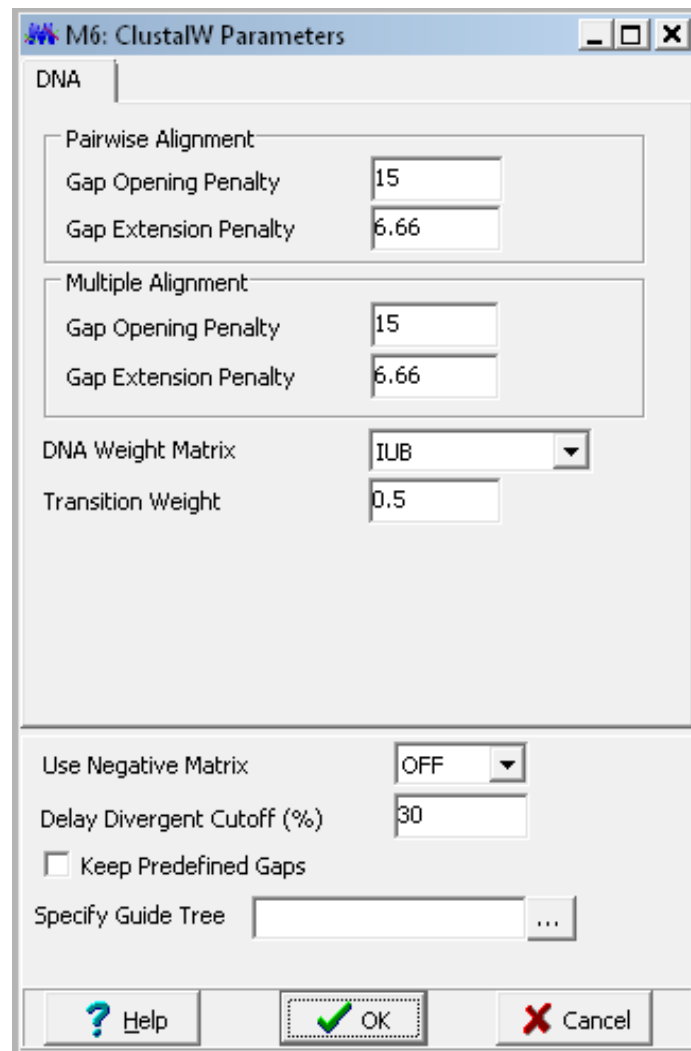


Figura 11. Parámetros para los alineamientos necesarios para la construcción de árboles filogenéticos.

Se utilizó el portal FIND MODEL para la elección del modelo de construcción de los árboles (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/findmodel/findmodel.html>). La construcción se realizó con el software MEGA y el modelo matricial Tamura Nei con los parámetros que el software ofreció por default [Figura 12].

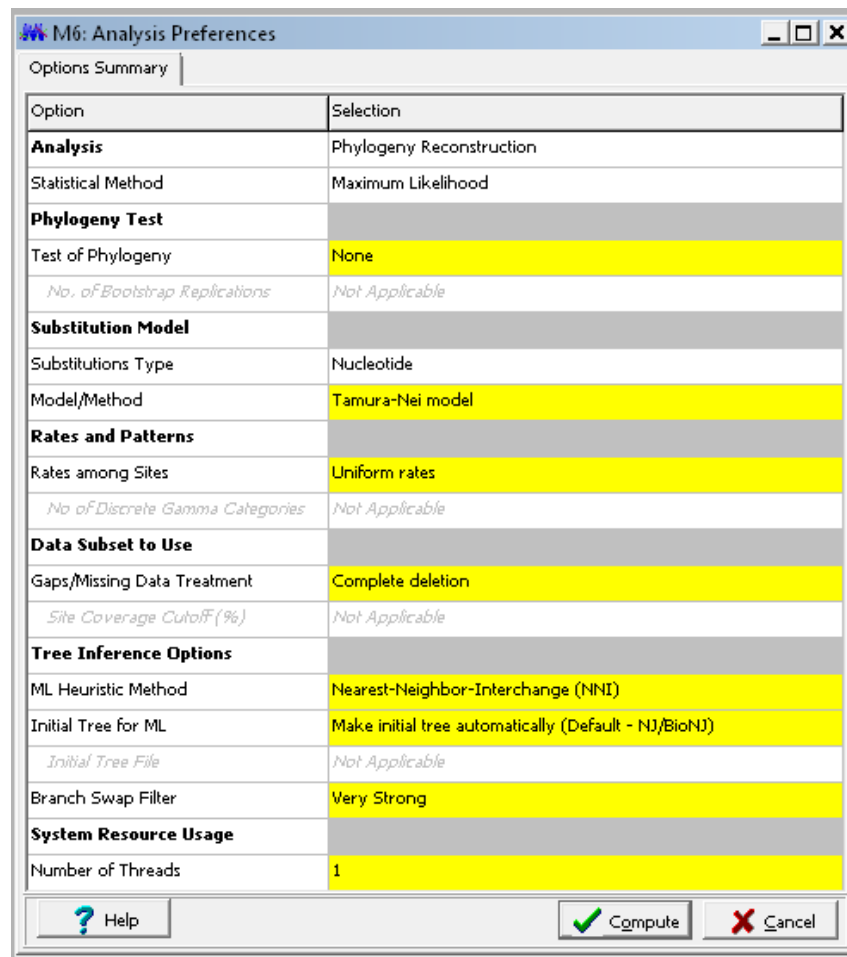
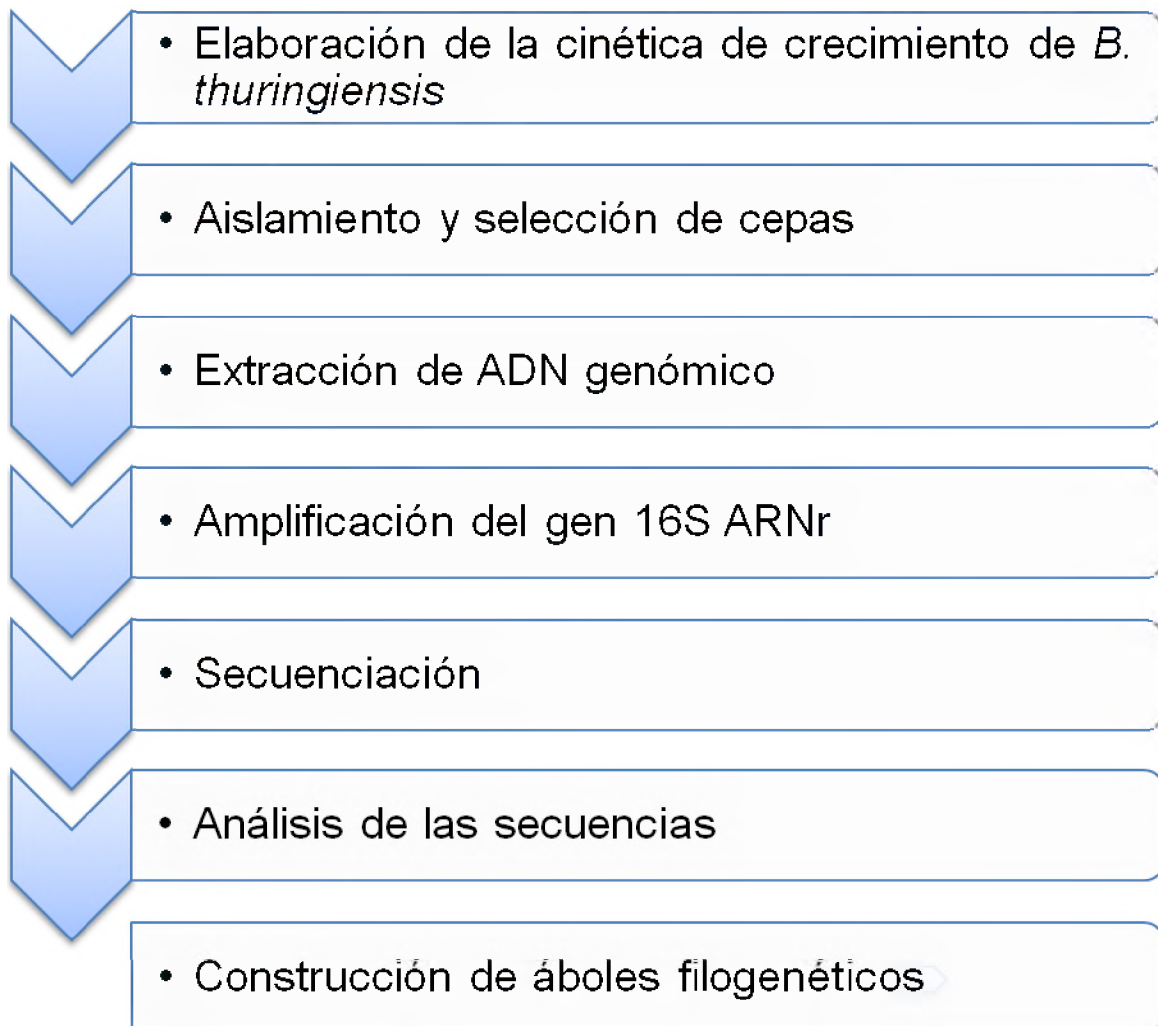


Figura 12. Parámetros utilizados en la construcción de los árboles filogenéticos en el software MEGA.

6.6 Flujo Metodológico



VII. Resultados y Discusión

7.1 Cinética de crecimiento de *B. thuringiensis*

Se realizó la cinética de crecimiento de la cepa de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 mediante fermentación en caldo nutritivo. Los resultados de la fermentación se muestran en la Figura 13. Como se observa, la fase exponencial abarca de la hora 6 a la hora 11 de cultivo y la fase de muerte inicia en las 15 h. La producción de esporas aumenta de manera inversa que la concentración de biomasa, por lo que al final del cultivo se tuvo una mayor presencia de esporas. Con base en la cinética de la figura 13 se decidió tomar la muestra para la tinción de Gram y para la extracción de ADN a las 8 h de iniciado el cultivo y para la tinción de Schaeffer y Fulton después de las 24 h.

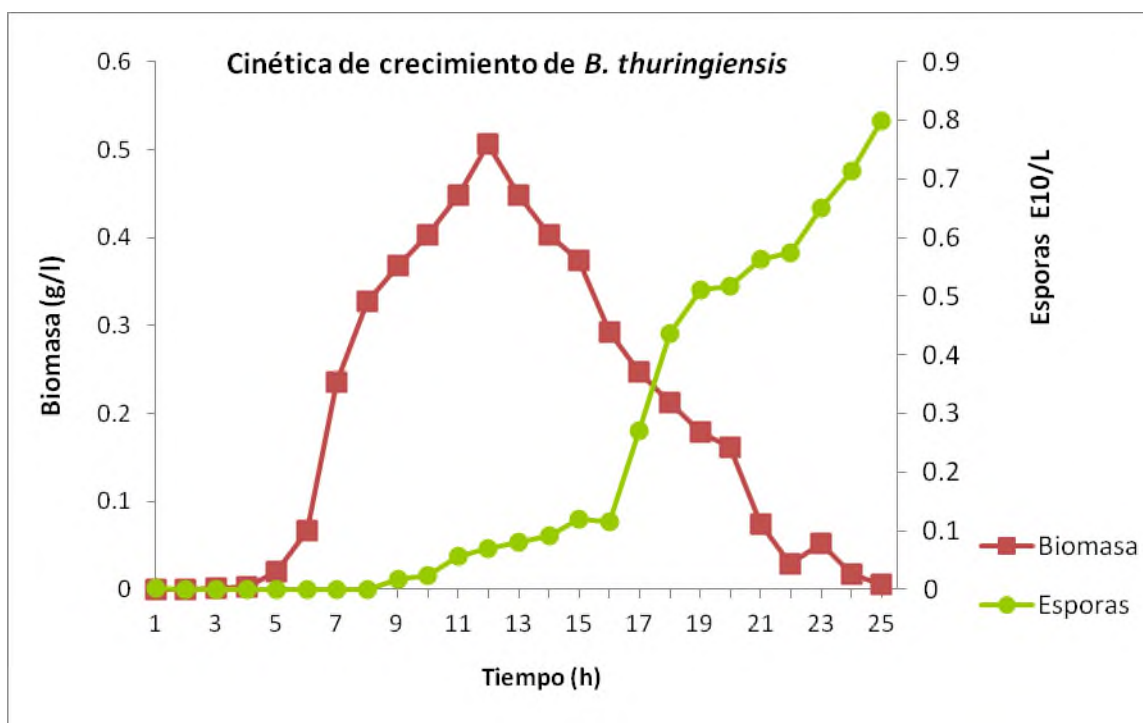


Figura 13. Cinética de crecimiento de *B. thuringiensis* HD-73 a 30°C en caldo nutritivo.

7.2 Aislamiento y selección de cepas

Mediante el plaqueo de las diluciones seriales en agar nutritivo se compararon los posibles aislados de *B. thuringiensis* [Figura 14]. En la fig. 14a se muestra la morfología de una cepa de *B. thuringiensis* conocida (colonias circulares con borde irregular, perfil plano y color marfil claro, su textura es seca y cerosa) cultivada en agar nutritivo, ésta fue considerada como la cepa control. En la fig. 14b se puede apreciar el crecimiento de la cepa control cultivada por vaciado en placa en agar nutritivo, nótese la homogeneidad morfológica entre sus colonias. En la fig. 14c se muestran las colonias presentes en la dilución 1×10^{-3} y se seleccionaron las más parecidas a la cepa control; con flechas se indican las colonias más parecidas morfológicamente a *B. thuringiensis*. Dichas colonias se sembraron en agar nutritivo por estriado. En la fig. 14d se hace la comparación de estos cultivos (lado izquierdo) y la cepa control (lado derecho). Sembrada por la técnica de estriado, se pudo apreciar la uniformidad y consistencia de las colonias sembradas. Siguiendo la comparación macroscópica antes mencionada, se seleccionaron 65 aislados con morfología colonial parecida a la cepa control.

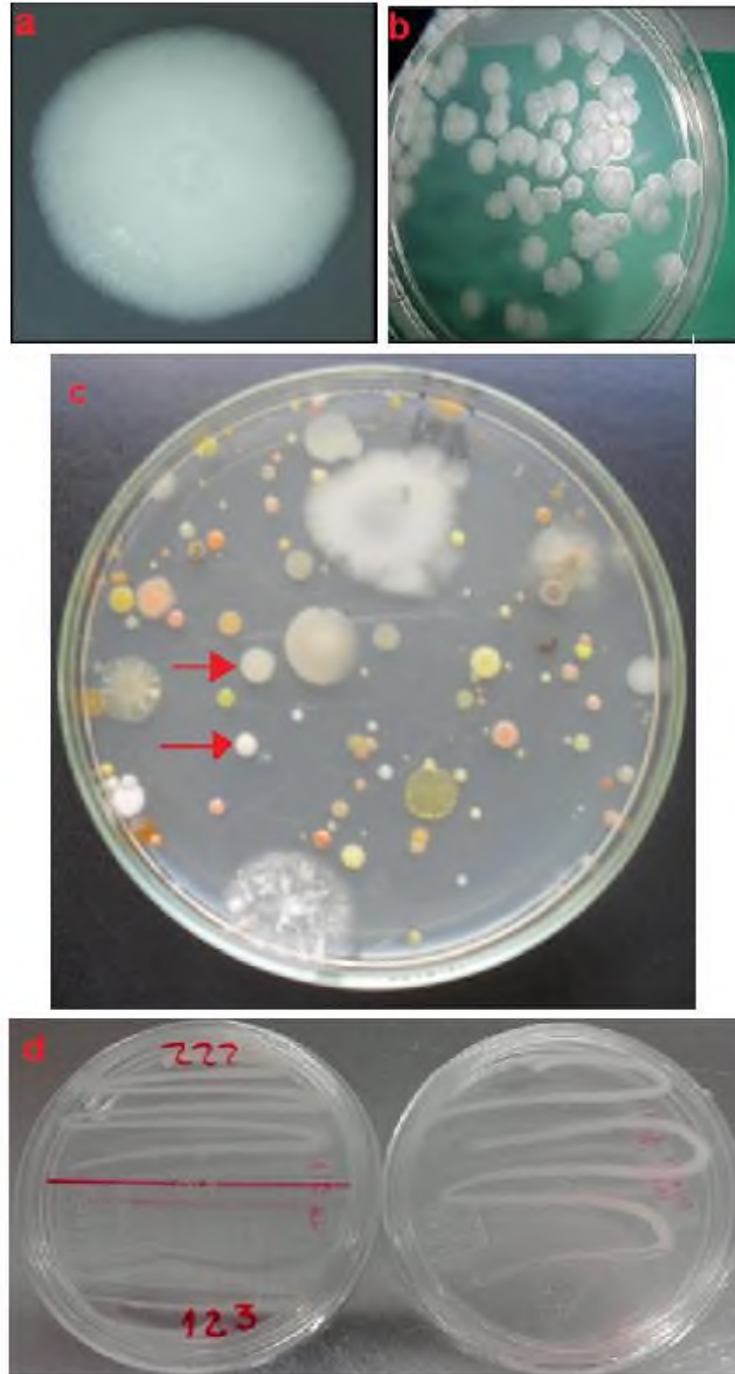


Figura 14. Escrutinio morfológico colonial de posibles aislados de *B. thuringiensis*. a) morfología de una cepa control de *B. thuringiensis* (HD-73 var *kurstaki*) cultivada en agar nutritivo. b) crecimiento de la cepa control cultivada por vaciado en placa en agar nutritivo. c) colonias presentes en la dilución 1×10^{-3} y se seleccionaron las más parecidas a la cepa control; con flechas se indican las colonias más parecidas morfológicamente a *B. thuringiensis*. d) comparación de estos cultivos (lado izquierdo) y la cepa control (lado derecho).

A los aislados seleccionados por morfología colonial se les realizó tinción de Gram y de Schaeffer y Fulton [Figura 15]. En la figura 15a se observa la tinción de la cepa control de *B. thuringiensis* teñida como Gram positiva. La figura 15b muestra un aislado seleccionado a las 8 h de iniciado su cultivo dando como resultado Gram positivo. El tiempo en el cual se toma la muestra es determinante para *B. thuringiensis* ya que aproximadamente a las 15 h de iniciado el cultivo líquido, el microorganismo entra en su fase de muerte por lo que su membrana celular se debilita y si se aplica la tinción de Gram, el bacilo se teñirá de rosa en vez de azul. La figura 15c muestra la cepa control después de la tinción de Schaeffer y Fulton, nótese que las esporas están teñidas de verde y los restos celulares en rosa. Esto se debe a que el frotis fue tomado después de 24 h de iniciado el cultivo del aislado, en este momento se sabe que *B. thuringiensis* está en su fase de esporulación [Figura 13]. La figura 15d muestra la tinción de esporas de un aislado donde se nota la presencia de esporas y restos celulares. En la figura 15e se observa un aislado después de la tinción de esporas donde no hay presencia de las mismas. Posterior al análisis microscópico se seleccionaron 45 aislados, los cuales fueron conservados en glicerol al 30% a -20°C.

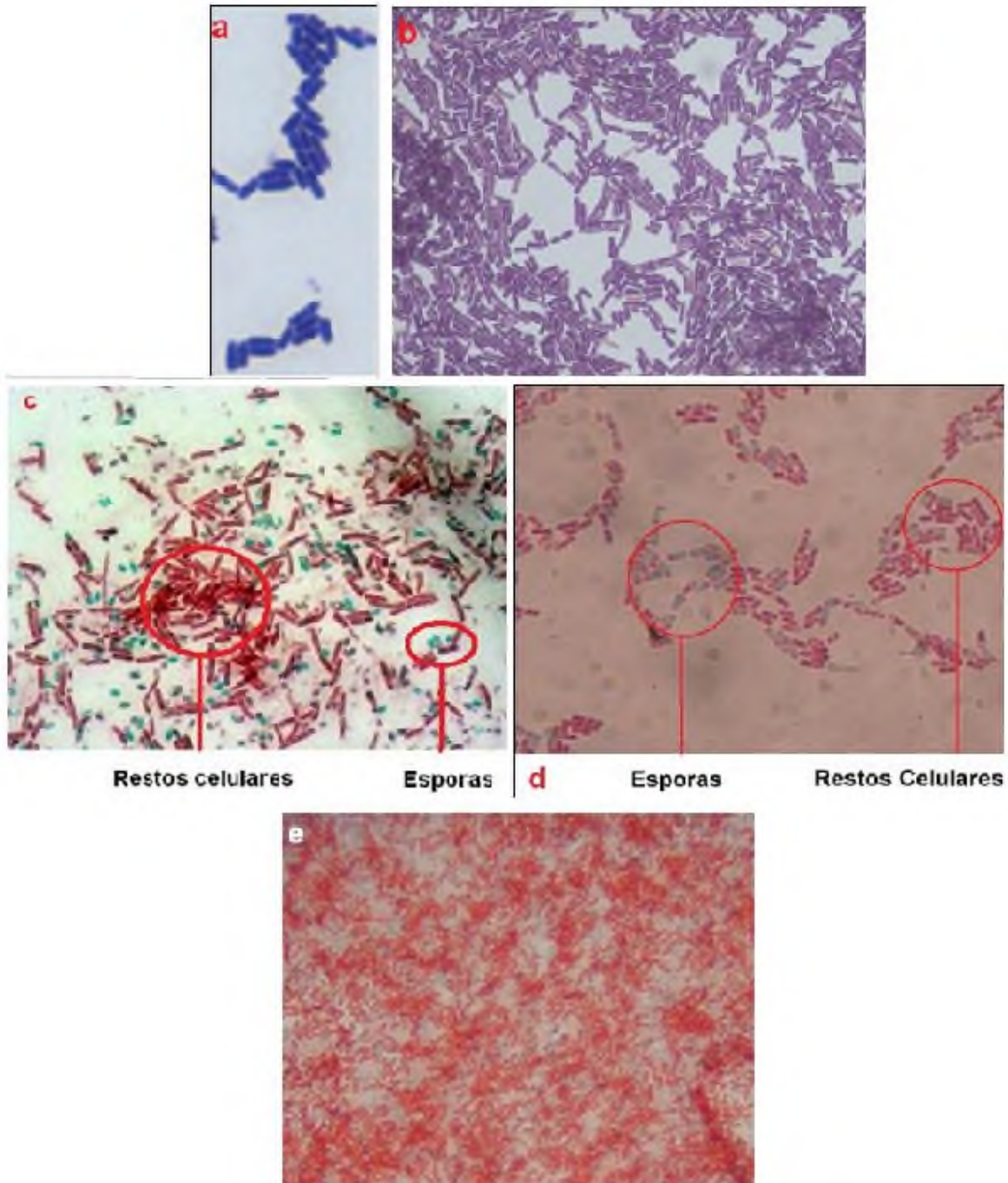


Figura 15. Escrutinio microscópico de los aislados seleccionados mediante las tinciones diferenciales de Gram y Schaeffer y Fulton. a) tinción de la cepa control de *B. thuringiensis* teñida como Gram positiva. b) aislado seleccionado a las 8 h de iniciado su cultivo dando como resultado Gram positivo. c) cepa control después de la tinción de Schaeffer y Fulton, nótese que las esporas están teñidas de verde y los restos celulares en rosa. d) tinción de esporas de un aislado donde se nota la presencia de esporas y restos celulares. e) aislado después de la tinción de esporas donde no hay presencia de las mismas.

Posterior a la selección macroscópica y microscópica, a los aislados se les determinó la presencia de proteínas insolubles al final del cultivo líquido. El resultado del escrutinio para cada aislado seleccionado para la presencia de inclusiones parasporales por medio de SDS-PAGE [Figura 16] nos indican que 41 aislados presentan inclusiones proteicas de entre 60 y 130 kDa. Estos resultados se resumen en la tabla 2.

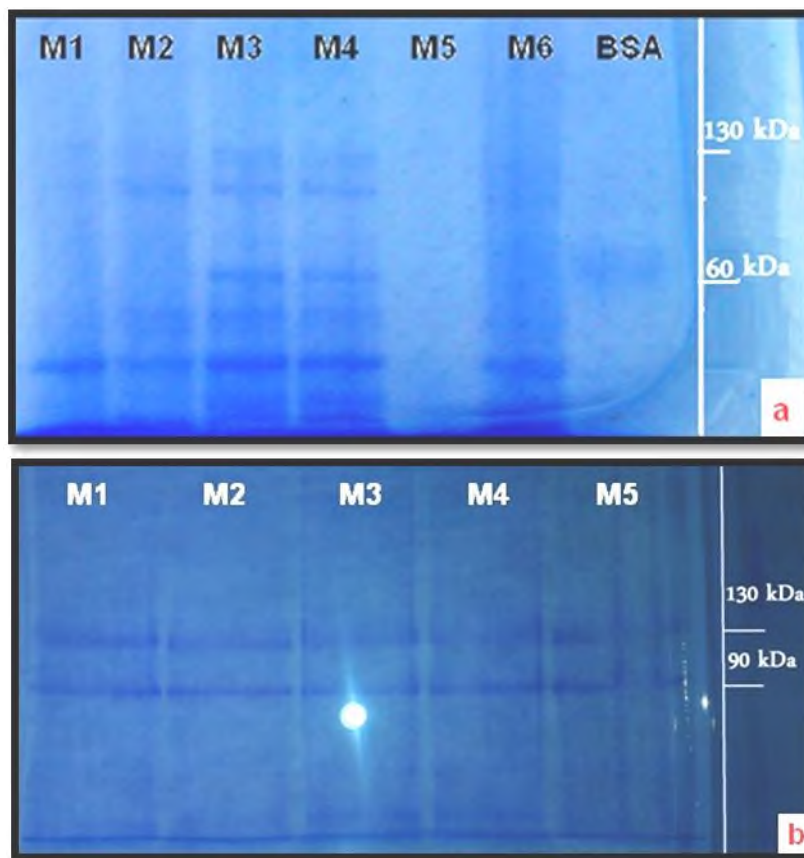


Figura 16. Geles de SDS-PAGE al 7% con presencia de bandas de entre 60 y 130 kDa. En la fig. 16a se aprecia en el carril M1 la presencia de inclusiones proteicas de entre 60 y 130 kDa además de inclusiones menores de 60 kDa. En los carriles M2 y M6 se aprecian inclusiones de entre 60 y 130 kDa, además de 2 bandas menores a 60 kDa. En los carriles M3 y M4 se muestra el mismo patrón: bandas de entre 90 y 130 además de bandas menores a 60 kDa. En el carril M5 se tiene una muestra negativa, no presenta ninguna banda. En la fig. 16b se aprecian muestras que presentan bandas de entre 90 y 130 kDa en los 5 carriles.

Tabla 4. Selección de aislados con base en la metodología para la identificación de aislados de *B. thuringiensis* de cada muestra colectada

Suelo	Número de aislados seleccionados por etapa		
	Morfología Macroscópica	Gram (+) y Esporulación	Síntesis de Proteínas de 60-130 kDa
No cultivado	2	2	2
Plátano	6	4	4
Café	5	3	3
Caña	52	36	32

7.3 Extracción de ADN genómico y amplificación de la región 16S ARNr

Se extrajo ADN genómico de las 41 cepas seleccionadas con el kit comercial Ultraclean™ Microbial DNA Isolation y posteriormente se amplificó la región 16S del ADN utilizando los primers específicos fD1 y rD1. En la Figura 15 se muestran geles con los resultados de la amplificación.

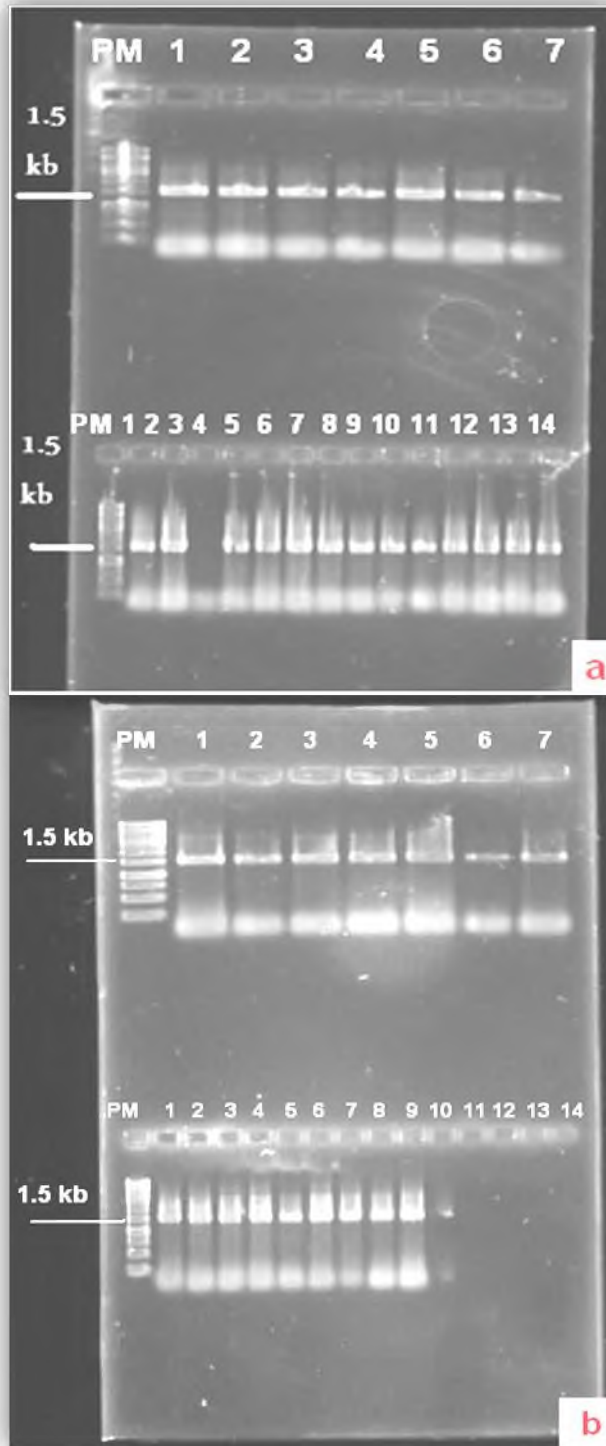


Figura 17. Amplificación de la región ARNr 16S obteniéndose un producto esperado de 1.5 kb en geles de agarosa al 0.8%. a) carriles superiores del 1 al 7 amplificaciones positivas obteniendo productos de 1.5 kb aproximadamente. En los carriles inferiores se obtuvieron amplificaciones positivas del 1 al 14 (excepto el carril 4) con un producto de 1.5 kb aproximadamente. b) productos amplificados de en los carriles superiores del 1 al 7 y en los inferiores del 1 al 10 con longitudes aproximadas de 1.5 kb. Los carriles del 11 al 14 no fueron cargados con ninguna muestra.

7.4 Secuenciación e identificación molecular

Los productos de PCR amplificados y purificados se secuenciaron según la técnica de Sanger por fluorescencia. Cada producto se secuenció con dos primers *forward* y *reverse* en la compañía biotecnológica MacroGen Korea bajo el servicio de 16S rRNA Full Sequencing. Los resultados de la secuenciación fueron el cromatograma y la secuencia en formato FASTA. De los 41 productos de PCR secuenciados se recibieron 29 con ambas secuencias (*forward* y *reverse*), 8 con sólo la secuencia *reverse* y 4 tuvieron problemas de secuenciación. Los problemas de secuenciación más probables son una purificación deficiente de los productos de PCR o una degradación por efectos de temperatura de los mismos. Los productos de PCR que no tuvieron ambas secuencias no fueron tomados en cuenta para los análisis posteriores por no representar un amplicón de aproximadamente 1.5 kb.

Posteriormente se realizó el análisis de los cromatogramas de las 29 secuencias completas. Todas las secuencias presentaban ruido al principio y al final, esto pudo deberse a que no se eliminaron todos los *primers* que no se utilizaron en la amplificación y provocaron interferencia; por lo tanto, se hizo una reducción en la longitud de las secuencias eliminando las regiones con ruido.

Posterior a la limpieza de las secuencias, por medio del software MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Kumar *et al.*, 2004) se hizo el ensamble de las 29 secuencias que tenían sus secuencias *forward* y *reverse*.

Al terminar el ensamblado de cada secuencia, se hicieron análisis BLAST para todas ellas en las bases de datos NCBI (en el apartado de región de ARNr 16 para bacterias) y RDP (base de datos específica de regiones ribosomales) por separado.

Conforme al análisis de los resultados del BLAST todas las secuencias ensambladas tienen relación con cepas de *B. thuringiensis*, pero de igual forma pueden ser *B. cereus* o *B. anthracis*. Por lo tanto, se realizó un análisis filogenético con las secuencias ensambladas.

Por lo tanto, se construyó un árbol filogenético comparando las regiones 16S de nuestros aislados (secuencias ensambladas) con las de *B. thuringiensis* ya contenidas en las bases de datos del GenBank del NCBI y en el IMG (Integrated Microbial Genomes, <http://img.jgi.doe.gov>). Además se compararon con otros microorganismos del grupo de *cereus* como *B. cereus* y *B. anthracis*, por ser muy similares genéticamente con *B. thuringiensis*; con otros microorganismos del género *Bacillus* como *B. subtilis* y *B. licheniformis* y con *E. coli* por ser una bacteria no relacionada con el género *Bacillus*.

Posteriormente con las secuencias del gen 16S ARNr de las cepas conocidas, se realizó un multialineamiento CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) para identificar una secuencia consenso que fuera compartida por todos los microorganismos. Una vez identificada la región común entre todas las secuencias, se cortaron las regiones fuera de la secuencia consenso y con ese alineamiento se construyó el árbol filogenético [Figura 18].

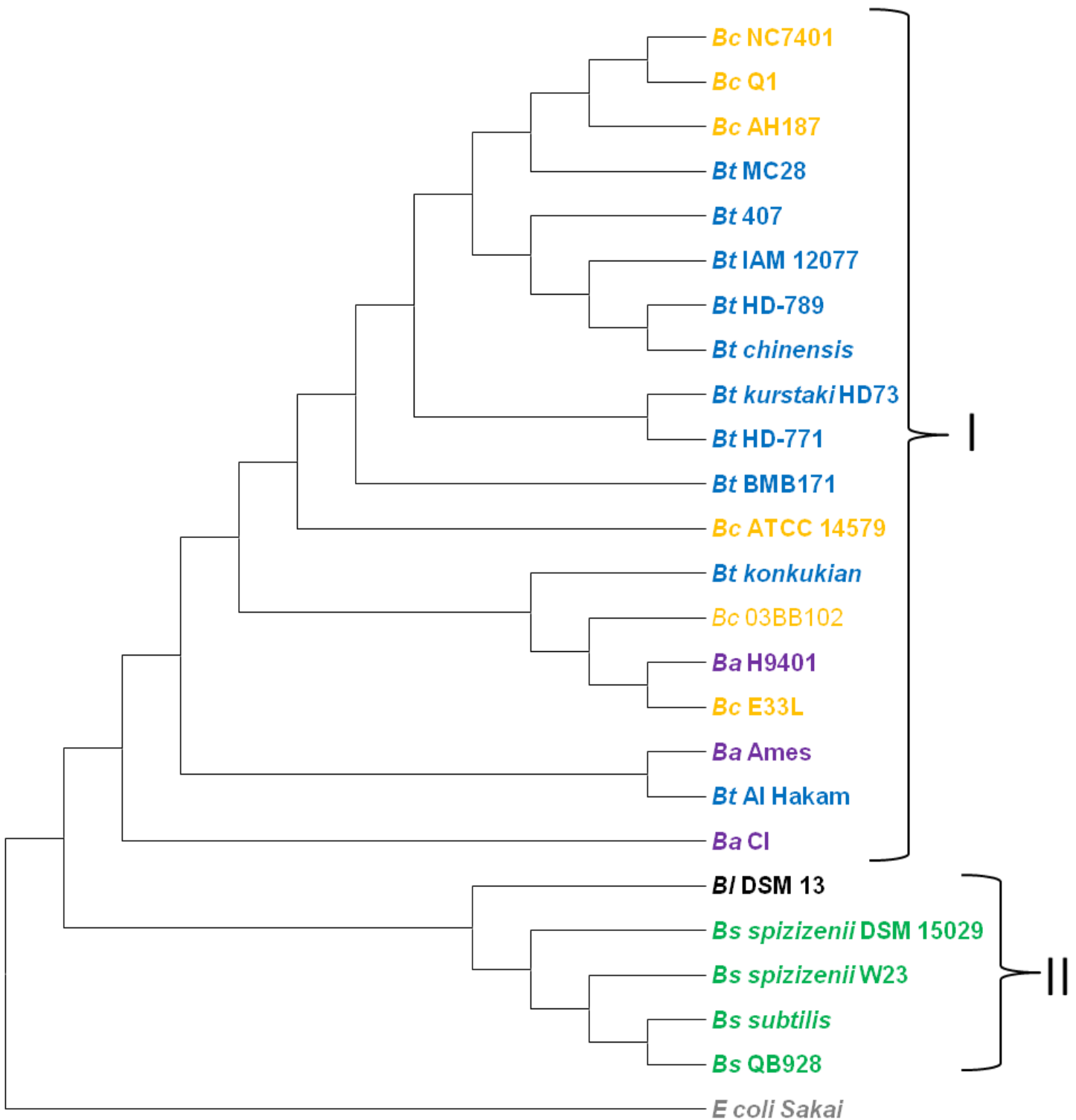


Figura 18. Árbol filogenético base tradicional rectangular de cepas de *B. thuringiensis* utilizando como referencia las secuencias registradas en el GenBank y el IMG de la región 16S ARNr. Abreviaciones: *Bt*: *B. thuringiensis* (azul), *Bc*: *B. cereus* (naranja), *Ba*: *B. anthracis* (morado), *Bt*: *B. licheniformis* (negro), *Bs*: *B. subtilis* (verde). el grupo I que comprende a los organismos del grupo *cereus*, los cuales son *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. anthracis*. El grupo II que está compuesto por otros *Bacillus* (*B. subtilis* y *B. licheniformis*).

El árbol filogenético base [Figura 18] muestra 2 grupos bien definidos, el grupo I que comprende a los organismos del grupo *cereus*, los cuales son *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. anthracis*. El grupo II que está compuesto por otros *Bacillus* (*B. subtilis* y *B. licheniformis*). Además de los dos grupos mencionados, se muestra a *E. coli* que es muy distante filogenéticamente del grupo *Bacillus*.

Para poder comparar filogenéticamente nuestros aislados con las bases de datos, se realizó un análisis CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) con el software MEGA 6.0 entre las secuencias ensambladas de nuestros aislados con el alineamiento previo de las secuencias del árbol base eliminando las secuencias de *B. licheniformis* y *E. coli* por ser muy distantes al grupo de *B. cereus*. De esta forma se obtuvo el árbol filogenético temporal con una filogenia más específica para nuestros aislados. De igual manera, después del alineamiento, se buscó la secuencia consenso [Figura 17] y se eliminaron las partes sobrantes. Dicho árbol fue elaborado con la misma metodología que el árbol base, usando el modelo Tamura Nei.

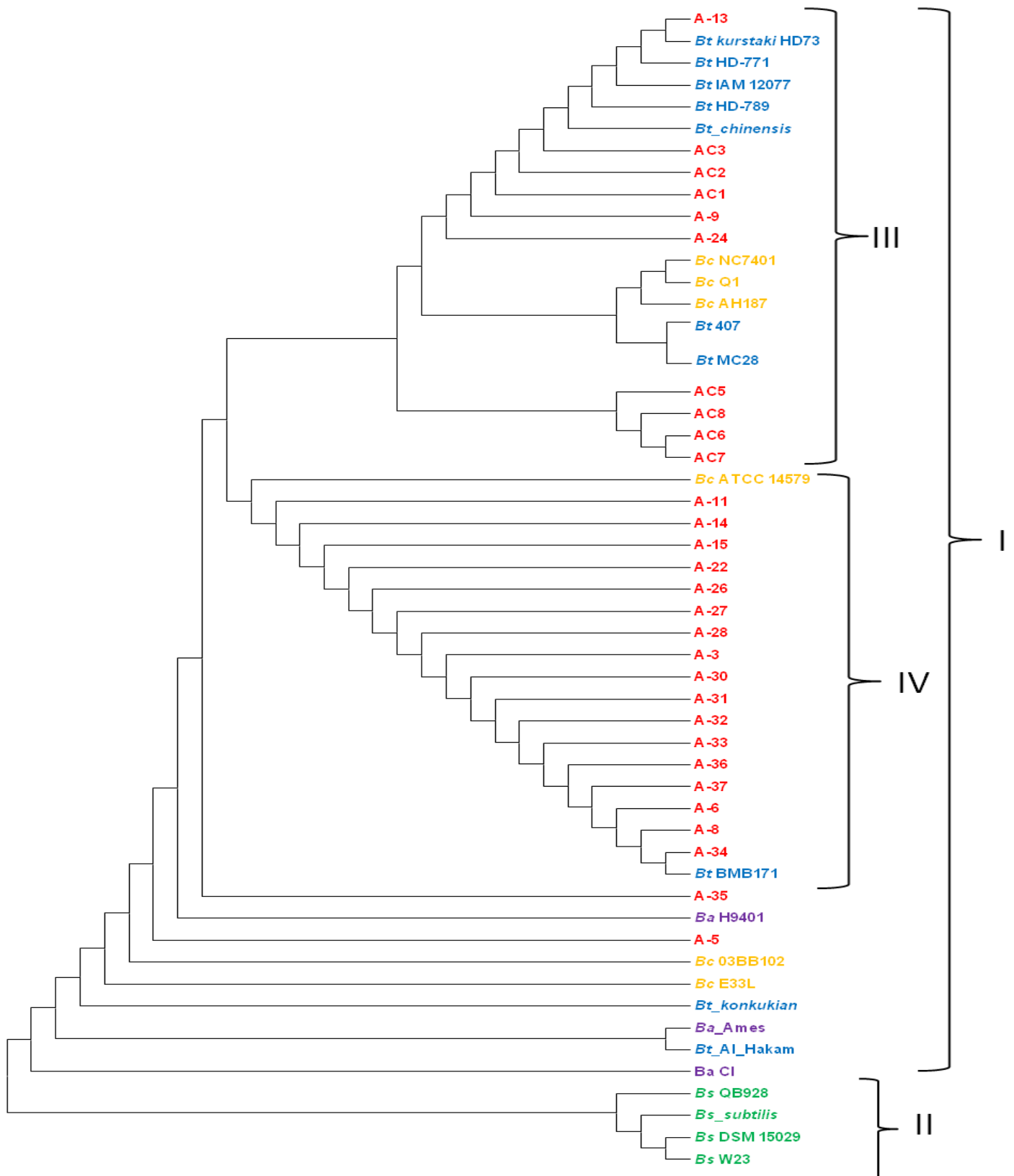


Figura 19. Árbol filogenético temporal tradicional rectangular de aislados de la cuenca del Papaloapan con cepas de *B. thuringiensis* utilizando como referencia las secuencias registradas en el GenBank y el IMG de la región 16S ARNr. *Bt*: *B. thuringiensis* (azul), *Bc*: *B. cereus* (naranja), *Ba*: *B. anthracis* (morado), *Bs*: *B. subtilis* (verde) y aislados problema (rojo). I) grupo de *B. cereus*. II) otros *Bacillus*. III) grupo mayoritario de *B. thuringiensis*. IV) grupo de aislados con similitud con *B. thuringiensis* y *B. cereus*.

Como se observa en la Figura 19 hay dos grandes grupos, el grupo *Bacillus cereus* (I) y el de otros *Bacillus* (II). Dentro del grupo *cereus*, se nota el gran parecido de los aislados AC1, AC2, AC3, A-9 y A-24 con el grupo III mayoritario de *B. thuringiensis* comprendido por las variedades *chinensis*, HD-789, IAM, HD-711 y HD-73. El aislado A-13 presenta gran similitud con la variedad *kurstaki*. Los aislados AC5, AC6, AC7 y AC8 están dentro del mismo grupo pero no están directamente relacionados con variedades de *B. thuringiensis* utilizadas en este árbol, aunque no dejan de tener alta probabilidad de ser *B. thuringiensis* ya que producen inclusiones proteicas insolubles al final de su cultivo. En el grupo IV, nuestros aislados comparten similitud con una variedad de *B. cereus* y una de *B. thuringiensis*. Además se muestra una configuración tipo peine con A-8, A-6, A-37, A-36, A-33, A-32, A-31, A-30, A-3, A-28, A-27, A-26, A-22, A-15, A-14 y A-11, lo que indica que probablemente representan a la misma especie de *Bacillus*. Para comprobar esto se realizó un alineamiento entre ellos. El resultado del alineamiento confirmó que los aislados representan a la misma especie de *Bacillus* por lo que para análisis posteriores a este grupo se le nombrará como A-X.

Considerando al grupo A-X se construyó el árbol definitivo [Figura 20]. Al árbol definitivo, además se le agregaron otras secuencias conocidas de 16S ARNr de *B. thuringiensis*. Estas secuencias fueron utilizadas para diferenciar genéticamente distintas variedades de *B. thuringiensis* (Soufiane et al., 2008). El árbol fue construido con el software MEGA 6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) con un modelo Tamura Nei.

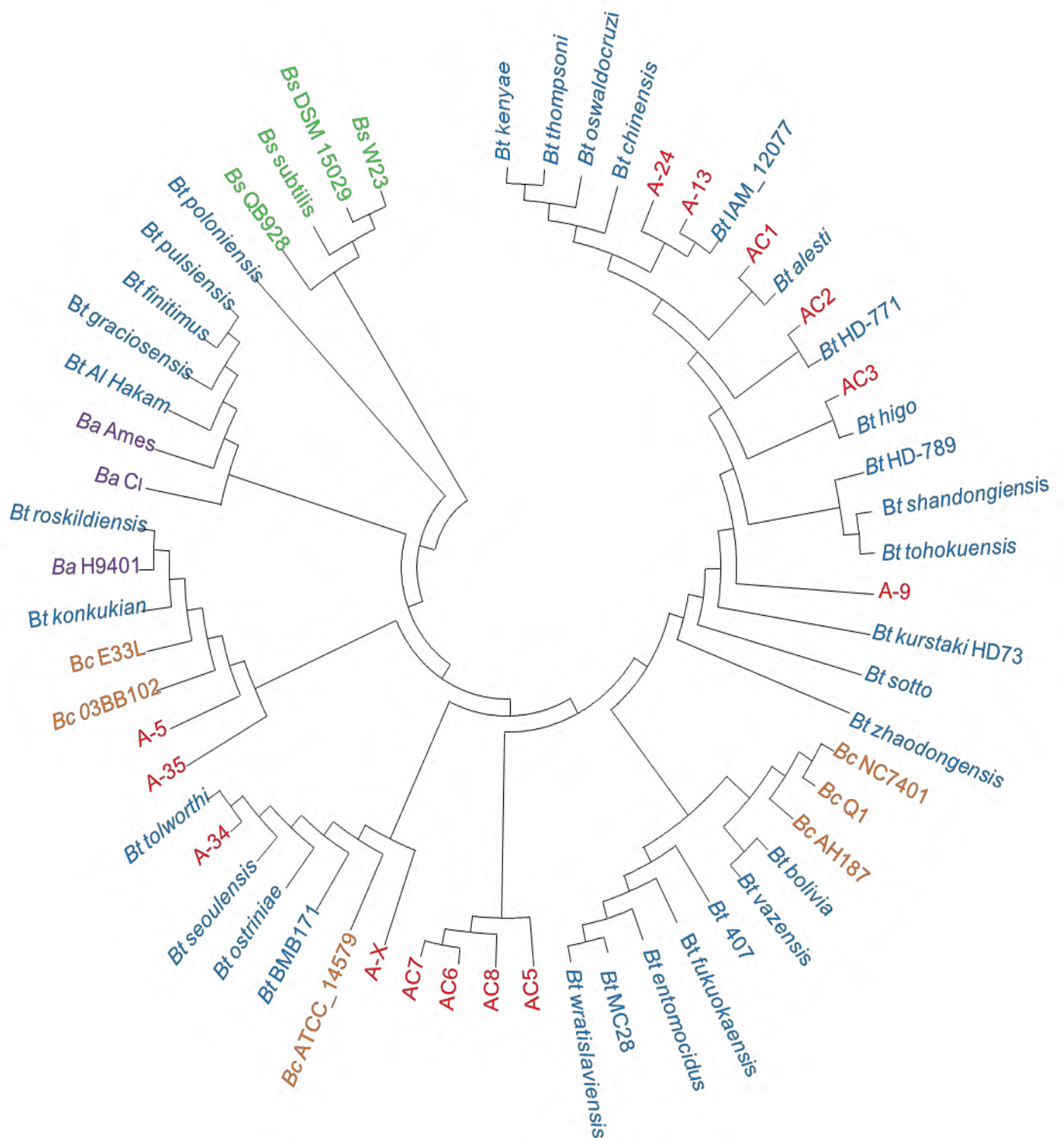


Figura 20. Árbol filogenético circular de aislados de la cuenca del Papaloapan con cepas de *B. thuringiensis* y otras variedades, utilizando como referencia las secuencias registradas en el GenBank y el IMG de la región 16S ARNr. Abreviaciones: *Bt*: *B. thuringiensis* (azul), *Bc*: *B. cereus* (naranja), *Ba*: *B. anthracis* (morado), *Bs*: *B. subtilis* (verde), A-X: grupo de aislados A-8, A-6, A-37, A-36, A-33, A-32, A-31, A-30, A-3, A-28, A-27, A-26, A-22, A-15, A-14 y A-11 y demás aislados en rojo.

En el árbol filogenético definitivo [Figura 20] se pueden apreciar las similitudes entre *B. thuringiensis* y otros *Bacillus* del grupo *cereus*. El aislado AC1 muestra gran similitud con *B. thuringiensis alesi*, AC2 con *B. thuringiensis* HD-771, AC3 con *B. thuringiensis higo*, A-13 con *B. thuringiensis* IAM 12077. A-24 presenta gran similitud con *B. thuringiensis* IAM 12077 y un grupo de distintas variedades de *B. thuringiensis* como *chinensis*, *oswaldocruzi*, *thompsoni* y *kenyae*. A-9 presenta similitud con todas las variedades de *B. thuringiensis* que se acaban de nombrar, por lo que se considera de la misma especie.

Los aislados AC5, AC6, AC7 y AC8 presentan una gran similitud con un grupo especies comprendido por *B. thuringiensis*, y *B. cereus*; estos aislados también presentan similitud con un grupo robusto de *B. thuringiensis* por lo que si no es posible afirmar por filogenia que pertenecen a la especie *thuringiensis*, tampoco se pueden descartar ya que producen inclusiones proteicas insolubles al final de su cultivo, por lo tanto se consideran como *Bacillus spp.*

El grupo de interés por el cual se volvió a construir el árbol (A-X), no sufrió grandes cambios, los aislados comparten mucha información con otras variedades de *B. thuringiensis* (*ostrinae*, *seoulensis* y BMB) y con una cepa de *B. cereus* (ATCC 14579). Con esta información no podemos afirmar que estos aislados son de la especie *thuringiensis* pero no podemos descartarlos ya que producen inclusiones proteicas insolubles al final de su cultivo, por lo que se consideran como *Bacillus spp.* con altas probabilidades de ser *B. thuringiensis*. El aislado A-34 muestra similitud con la variedad *tolworthi* de *B. thuringiensis* por lo que se afirma su especie como *thuringiensis*.

El aislado A-35 presenta gran similitud con todo el grupo de *B. thuringiensis*, por lo que no podemos descartarlo para identificarlo como parte de la especie.

El aislado A-5 comparte información genética con diversas especies del grupo *cereus*, por lo que su identificación filogenética es *Bacillus spp* sin olvidar que produce inclusiones proteicas insolubles al final de su cultivo.

En la tabla 5 se presentan los resultados resumidos de la identificación de los aislados de suelo en la cuenca del Papaloapan.

Tabla 5. Resultados de la comparación filogenética para los aislados de suelo en la cuenca del Papaloapan. El aislado A-X representa al grupo comprendido por los siguientes aislados: A-8, A-6, A-37, A-36, A-33, A-32, A-31, A-30, A-3, A-28, A-27, A-26, A-22, A-15, A-14 y A-11; los cuales fueron extraídos de suelo cultivado con caña de azúcar.

Aislado	Tipo de suelo	Especie
AC-1	No Cultivado	<i>thuringiensis</i> var <i>alesti</i>
AC-2	No Cultivado	<i>thuringiensis</i> HD-771
AC-3	Plátano	<i>thuringiensis</i> var <i>higo</i>
AC-5	Café	<i>spp</i>
AC-6	Plátano	<i>spp</i>
AC-7	Café	<i>spp</i>
AC-8	Plátano	<i>spp</i>
A-X	Caña	<i>thuringiensis</i>
A-5	Caña	<i>spp</i>
A-9	Plátano	<i>thuringiensis</i>
A-13	Caña	<i>thuringiensis</i> IAM 12077
A-24	Caña	<i>thuringiensis</i>
A-34	Caña	<i>thuringiensis</i> var <i>tolworthi</i>
A-35	Caña	<i>spp</i>

En la Tabla 6 se resume la relación de aislados identificados en este proyecto.

Tabla 6. Relación de aislados identificados como *B. thuringiensis* por medio de análisis filogenéticos.

Tipo de Suelo	Aislados amplificados (16S ARNr)	Secuenciación positiva de <i>Forward</i> y <i>Reverse</i>	Identificación a nivel especie de <i>B. thuringiensis</i> por filogenia	<i>spp</i>
No cultivado	2	2	2	-
Plátano	4	4	2	2
Café	3	2	-	2
Caña	32	21	19	2

El grupo de *Bacillus cereus* (*B. cereus*, *B. anthracis*, y *B. thuringiensis*) está muy relacionado genéticamente por lo que no basta la construcción filogenética, con base en la región 16S ARNr. Sin embargo, *B. thuringiensis* es el único del grupo de *B. cereus* que se puede diferenciar de los demás por la presencia de inclusiones parasporales insolubles al final de su ciclo de vida. Por lo tanto, para tener mayor certeza en la diferenciación de estas especies es necesario utilizar la amplificación de otros genes como el gen *rpoB*, que codifica para la sub-unidad β de la ARN polimerasa en bacterias (Zasada *et al.*, 2006); y/o el gen *gyrB*, que codifica para la sub-unidad β de la ADN girasa (Bavykin *et al.*, 2004).

Sin embargo la construcción de árboles filogenéticos utilizando como referencia la región conservada en bacterias 16S ARNr, es de gran ayuda para poder elucidar la especie dentro del grupo de *Bacillus cereus*, para dar un respaldo bioinformático a las pruebas morfológicas y fenotípicas realizados previamente a los aislados problema y para la elección de genes para su identificación.

VIII. Conclusiones

Por su particularidad cosmopolita, *B. thuringiensis* puede ser aislado del suelo en la región de la cuenca del Papaloapan de suelos cultivados y no cultivados.

Con base en los estudios morfológicos macroscópicos y microscópicos, en la evaluación de presencia de inclusiones proteicas y en la filogenia utilizando como referencia la región conservada 16S ARNr:

- Los aislados de suelo No cultivado AC-1 y AC-2 se identificaron como *B. thuringiensis* var *alesti* y HD-771, respectivamente.
- Los aislados de suelo cultivado de plátano se identificaron como *B. thuringiensis* (A-9) y *B. thuringiensis* var *higo* (AC-3).
- Los aislados de suelo de caña se identificaron como *B. thuringiensis* (A-9 y A-24), *B. thuringiensis* var *tolworthi* (A-34), *B. thuringiensis* IAM 12077 y el grupo A-X se pudo identificar como especie *thuringiensis*.
- La construcción de árboles filogenéticos utilizando como referencia la región conservada en bacterias 16S ARNr, sirve como referencia para poder identificar la especie dentro del grupo de *Bacillus cereus*.

IX. Perspectivas

Este trabajo presenta las bases para el aislamiento y la identificación de *B. thuringiensis*, esto de pie a las siguientes actividades:

- Construir nuevos árboles filogenéticos utilizando genes homólogos unicopia como: el gen *rpoB*, que codifica para la sub-unidad β de la ARN polimerasa en bacterias y/o el gen *gyrB*, que codifica para la sub-unidad β de la ADN girasa y que ha comprobado su utilidad para la discriminación entre bacterias que forman parte del grupo de *B. cereus*.
- Realizar bioensayos en insectos y en líneas celulares cancerígenas con las proteínas producidas por los aislados para identificar las cepas que presenten actividad insecticida y anticancerígena
- Caracterizar las proteínas de los aislados que presenten actividad anticancerígena.

X. Bibliografía

Akhurst, R., Lyness, E., Zhang, Q., Y., Cooper, D. y Pinnock, D. (1997) A 16S rRNA gene oligonucleotide probe for identification of *Bacillus thuringiensis* isolates from sheep fleece. *J Invertebr Pathol* 69:24-30.

Armengol, G., Escobar, M., Maldonado, M., y Orduz, S. (2007) Diversity of Colombian strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against dipteran and lepidopteran insects. *J Appl Microbiol* 102:77-88.

Armengol, G., Guevara, O., Orduz, S. y Crickmore, N. (2005) Expression of the *Bacillus thuringiensis* mosquitocidal toxin Cry11Aa in the aquatic bacterium *Asticcacaulis excentricus*. *Curr Microbiol* 51:430-433.

Armstrong, J., Rohrman, G. y Beaudreau, G. (1985) Delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J Bacteriol* 161:37–46.

Bavykin, S., Lysov, Y., Zakhariev, V., Kelly, J., Jackman, J., Stahl, D. y 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.

Berliner, E. (1915) About the flacherie the flour moth caterpillar (*Ephestia kuhniella*) and its pathogen *Bacillus thuringiensis*, n.sp., *Z. Applied Entomology* 2:29-56.

Bernhard, K., Jarrett, P., Meadows, M., Butt, J., Ellis, D. J., Roberts, G. M., Pauli, S., Rodgers, P. y Burges, H. (1997) Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *J Invertebr Pathol* 70:59-68.

Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina, L., Villalobos, F., Peña, G., Nuñez-Valdez, M., Soberon, M. y Quintero, R. (1998) Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol* 64:4965-4972.

Brock, T. (2004). *Biología de los microorganismos*. P. Hall. Pp. 58, 59, 78.

Collier, F., Elliot, S. y Ellis, R. (2005) Spatial variation in *Bacillus thuringiensis/cereus* populations within the phyllosphere of broad-leaved dock (*Rumex obtusifolius*) and surrounding habitats. *FEMS Microbiol Ecol* 54:417-425.

Crickmore, N., Zeigler, D., Feitelson, J., Schnepf, E., Van-Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. y Dean, D. (1998) *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature <http://www.biols.susx.ac.uk/Home/NeilCrickmore/Bt/index.html>

Damgaard, P., Abdel-Hameed, A., Eilenberg, J. y Smits, P. (1998) Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* on grass foliage. *World J Microbiol Biotechnol* 14:239-242.

Damgaard, P., Granum, P., Bresciani, J., Torregrossa, M., Eilenberg, J. y Valentino, L. (1997a) Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from infections in burn wounds. *FEMS Immunol Med Microbiol* 18:47-53.

Damgaard, P., Hansen, B., Pedersen, J. y Eilenberg, J. (1997b) Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* on cabbage foliage and in insects associated with cabbage crops. *J Appl Microbiol* 82:253-258.

de Maagd, R., Bravo, A. y Crickmore, N. (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends Genet 17:193-199.

Drummond, J., Kotze, A., Levot, G. y Pinnock, D. (1995) Increased susceptibility to *Bacillus thuringiensis* associated with pyrethroid resistance in *Bovicola (Damalinia) ovis (Phthiraptera Mallophaga)*: possible role of mono oxygenases. J Econ Entomol 88:1607-1610.

Estruch, J., Carozzi, N., Desai, N., Duck, N., Warren, G. y Koziel, M. (1997) Transgenic plants: An emerging approach to pest control. Nat Biotech 15:137-141.

Golberg, L. y Margalit, J. (1977) A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosq. News 37:355-358.

Hansen, B., Damgaard, P., Eilenberg, J. y Pedersen, J. (1998) Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. J Invertebr Pathol 71:106-114.

Heimpel, A., y Angus, T. (1959) The site of Action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larval J of Insect Path 1:152-170.

Hernández, C., Andrew R. y Bel, Y. (2005) Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from potato-growing areas in Bolivia. J of Inv Path 88:8-16.

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

Iriarte, J., Bel, Y., Ferrandis, M., Andrew, R., Murillo, J., Ferre, J. y Caballero, P. (1998) Environmental distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain. Syst Appl Microbiol 21:97-106.

Ishiwata, S. (1901) On a kind of severe flacherie (sotto disease). Dainihon Sanshi Kaiho 114:1-5.

Kaelin, P. y Gadani, F. (2000) Occurrence of *Bacillus thuringiensis* on cured tobacco leaves. Curr Microbiol 40:205-209.

Katayama, H., Kusaka, Y., Yokota, H., Akao, T., Kojima, M., Nakamura, O., Mekada, E. y Mizuki, E. (2007) Parasporin-1, a novel cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*, induces Ca_2^+ influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca_2^+ concentration in toxin-sensitive cells. J Biol Chem 282:7742-7752.

Kim, H. S., Yamashita, S., Akao, T., Saitoh, H., Higuchi, K., Park, Y. S., Mizuki, E. y Ohba, M. (2000) In vitro cytotoxicity of non-cyt inclusion proteins of a *Bacillus thuringiensis* isolate against human cells, including human cancer cells. J Appl Microbiol 89:16-23.

Kitada, S., Abe, Y., Shimada, H., Kusaka, Y., Matsuo, Y., Katayama, H., Okumura, S., Akao, T., Mizuki, E., Kuge, O., Sasaguri, Y., Ohba, M. e Ito, A. (2006) Cytocidal actions of parasporin-2, an anti-tumour crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. J Biol Chem 281:26350-26360.

Kroeger, A., Horstick, O., Riedl, C., Kaiser, A., Becker N., (1995) The potential for malaria control with the biological larvicide *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) in Peru and Ecuador. *Acta Tropica* 60:47–57.

Kumar, S., Tamura, K. (2004) MEGA3: integrated soft-ware for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5:150–163.

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

Lee, D. W., Akao, T., Yamashita, S., Katayama, H., Maeda, M., Saitoh, H., Mizuki, E y Ohba, M. (2000) Non insecticidal parasoral proteins of a *Bacillus thuringiensis serovar shandongiensis* isolate exhibit a preferential cytotoxicity against human leukaemic T cells. *Bioche Biophys Res Comm* 272:218-223.

Lee, D., Katayama, H., Akao, T., Maeda, M., Tanaka, R., Yamashita, S., Saitoh, H., Mizuki, E. y Ohba, M. (2001) A 28 kDa protein of *the Bacillus thuringiensis serovar shandongiensis* isolate 89-T-34-22 induces a human leukemic cell-specific cytotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1547:57-63.

Maeda, M., Mizuki, E., Nakamura, Y., Hatano, T. y Ohba, M. (2000) Recovery of *Bacillus thuringiensis* from marine sediments of Japan. *Curr Microbiol* 40: 418-422.

Martin, P. y Travers, R. (1989) Worlwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol* 55:2437-2442.

Meadows, M., Ellis, D., Butt, J., Jarrett, P. y Burges, H. (1992) Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. Appl Environ Microbiol 58:1344-1350.

Medrano, O. (2000) Supervivencia de células vegetativas de *Bacillus thuringiensis* en la espermosfera-rizosfera de fríjol. TERRA 18:333-337.

Mizuki, E., Ichimatsu, T., Hwang, S., Park, S., Saitoh, H., Higuchi, K. y Ohba, M. (1999) Ubiquity of *Bacillus thuringiensis* on phylloplanes of arboreous and herbaceous plants in Japan. J Appl Microbiol 86:979-984.

Mizuki, E., Ohba, M., Akao, T., Yamashita, S., Saitoh, H. y Park, Y.S. (1999) Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. J Appl Microbiol 86:477-486.

Nair, J., Singh, G. y Sekar, V. (2002) Isolation and characterization of a novel *Bacillus* strain from coffee phyllosphere showing antifungal activity. J Appl Microbiol 93:772-780.

Navarro, K. (2001) Modelo termodinámico: Producción de proteína Cry por *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Maestría. CINVESTAV. México.

Neefs J., van de Peer Y., Hendriks L., y de Wachter R. (1990) Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. Nucl Acids Res 18: 2237-2330.

Ohba, M. (1996). *Bacillus thuringiensis* population naturally occurring on mulberry leaves: a possible source of the populations associated with silkworm-rearing insectaries. *J Appl Bacteriol* 80:56-64.

Olsen G. y Woese C. (1993) Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB* 7:113-123.

Patel J. (2001) 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn* 6:313- 321.

Patel J., Leonard D., Pan X., Musser J., Berman R. y Nachamkin I. (2000) Sequence-based identification of *Mycobacterium* species using the MicroSeq500 16S rDNA bacterial identification system. *J Clin Microbiol.* 38:246-51.

Porcar, M. y Caballero, P. (2000) Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic. *J Appl Microbiol* 89:309-316.

Rebecca, S. (2010) *Bacillus thuringiensis* parasporal proteins and their effect on human cancer cells: an overview. *leJSME.* 4:3-9.

Rodicio, M. y Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 22: 238-245.

Romeis, J., Meissle, M. y Bigler, F. (2006) Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nat Biotechnol* 24:63-71.

Rodríguez, M. y de la Torre, M. (1996). Effect of the dilution rate on the biomass yield of *Bacillus thuringiensis* and determination of its rate coefficients under steady-state conditions. 45:456-550.

Rowe, G., y Margaritis, A. (1987) Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *B. thuringiensis*. CRC Crit Rev in Biotech 6:87-127.

Sanchis, V. (2010) Vincent Sanchis - Researcher in life sciences. Día de consulta 3 de julio de 2014 <http://www.komunich.de/vincent-sanchis/france/bacillus-thuringiensis.html>

Schägger, H. y von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Biochem 166:368-379.

Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. y Dean, D. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev 6:775–806.

Soberón, M. y Bravo, A. (2007) Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. Biotecnología V14 CS3. 303-314.

Soufiane, B. y Cote J. (2008) Discrimination among *Bacillus thuringiensis* H serotypes, serovars and strains based on 16S rRNA, *gyrB* and *aroE* gene sequence analyses. Antonie van Leeuwenhoek. 95:33–45.

Tamez, P., Galan, J., Medrano, H., García, C., Rodríguez, C., Gomez, A. y Tamez, R. (2001) Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL*. 2:143-152.

Thomas, W. y Ellar, D. (1983) *B. thuringiensis* serovar *israelensis* crystal δ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Sci* 60:181–197.

Thompson J., Higgins D., Gibson T. (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.

Uribe, D., Martinez, W. y Ceron, J. (2003) Distribution and diversity of *cry* genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. *J Invertebr Pathol* 82:119-127.

Van Frankenhuyzen, K. (1993) The challenge of *Bacillus thuringiensis*. *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. P.Entwistle, Ed. London, UK, John Wiley and Sons. pp:1-35.

Weisburg, W., Barns, Pelletier, S. y Lane, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J of Bact.* 173:697-703.

Whalon, M. y Wingerd, B. (2003). *Bacillus thuringiensis*: mode of action and use. *Arch Insect Biochem Physiol* 54:200-211.

Woese C. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev*; 51:221-227.

Yara, K., Kunimi, Y. y Iwahana, H. (1997) Comparative studies of growth characteristic and competitive ability in *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in soil. *Appl Entomol Zool* 32:625-634.

Yasutake, K. (2006) Occurrence of parasporin-producing *Bacillus thuringiensis* in Vietnam. *Can J Microbiol* 52:365–372.

Zasada. A. y Gierczyński, R., (2006) Some *Bacillus thuringiensis* Strains Share *rpoB* Nucleotide Polymorphisms Also Present in *Bacillus anthracis*. *J Clin Microbiol* 44:1606-1607.

Zuckerandl, E. y Pauling, L. (1965) Molecules as documents of evolutionary history. *J Theor Biol* 8:357-366.

XI. Anexos

11.1 Descripción de Técnicas

- Tinción de Gram

1. Preparar los frotis bacterianos.
2. Teñir con cristal violeta por 1 min.
3. Lavar con abundante agua el exceso de colorante.
4. Cubrir con lugol.
5. Lavar con agua el exceso de lugol.
6. Decolorar con alcohol-cetona hasta que la preparación deje de perder color (30 s).
7. Lavar con abundante agua para eliminar el resto del disolvente.
8. Teñir con safranina 1 min.
9. Lavar con abundante agua para eliminar el colorante de contraste.
10. Secar la preparación.
11. Observar al microscopio.

- Tinción de Schaeffer y Fulton

1. Preparar los frotis bacterianos.
2. Teñir con verde de malaquita 5 min colocando el portaobjeto encima de una llama de mechero para que el colorante humee. Evitar que el colorante hierva. Añadir más colorante si se seca.
3. Lavar con agua el resto del colorante
4. Teñir con safranina 1 min.
5. Lavar con agua el resto del colorante.
6. Secar la preparación.
7. Observar al microscopio.

11.2 Preparación de reactivos para SDS-PAGE

- *Buffer* Tris pH 6.8

6 g de Tris Base en 100 ml de agua destilada ajustando el pH a 6.8 con HCl.

- *Buffer* Tris pH 8.8

18.5 g de Tris Base en 100 ml de agua destilada ajustando el pH a 8.8 con HCl.

- Acrilamida 30%

43.8 g de acrilamida, 1.2 g de bis-acrilamida y se afora a 150 ml. Refrigerar en frasco ámbar.

- *Buffer* Laemmli para solubilizar proteínas

Componente	Volumen (ml)
<i>Buffer</i> Tris pH 6.8	5
SDS (10% P/V)	2
Glicerol	2
2-Mercaptoetanol	1
Azul de bromofenol (1% P/V)	1

- *Buffer* de electroforesis Tris-Glicina 5X para proteínas aforado a 600 ml

Componente	Cantidad (g)
Tris Base	9
SDS	3
Glicina	43.2

- Solución de trabajo de azul brillante de Coomasie R250

Disolver 0.25 g de azul brillante de Coomasie R250 en 90 ml de metanol:H₂O (v/v 1:1) y 10 mL de ácido acético glacial. Filtrar la solución a través de un papel Whatman N°1 para eliminar los residuos extraños. Antes de usar dejar en reposo por una semana en un frasco oscuro.

11.3 Preparación de geles para SDS-PAGE

- Gel Separador al 7% (para 2 geles)

Componente	Volumen (ml)
<i>Buffer</i> Tris pH 8.8	2.3
Agua destilada	5.11
Acrilamida (30%)	2.7
TEMED (8.4% V/V)	0.05
Persulfato de Amonio (12.5% P/V)	0.092

- Gel concentrador (para 2 geles)

Componente	Volumen (ml)
<i>Buffer</i> Tris pH 6.8	1.5
Agua destilada	1.8
Acrilamida (30%)	1
TEMED (8.4% V/V)	0.03
Persulfato de Amonio (12.5% P/V)	0.06

11.4 Técnica para teñir y desteñir los geles de SDS-PAGE

Solución	Tiempo de agitación (min)
Ácido Tricloro acético (12.5% P/V)	30
Azul de Coomasie R250	60
Etanol (50%)	10
Etanol/Ác. Acético/Agua (3:1:6)	30
Metanol/Ác. Acético/Agua (5:2:13)	10

Entre cada paso se deben hacer 3 lavados con agua destilada

11.5 Preparación de reactivos para electroforesis de agarosa

- TAE 10X

Componente	Volumen (1000 ml)
Tris Base	48.5 g
Ácido Acético Glacial	11.4 ml
EDTA (0.5M)	20 ml
Agua desionizada	Aforar a 1000 ml

- Agarosa 0.8%

Componente	Volumen (100 ml)
Agarosa	0.8 g
TAE 1X	100 ml

11.6 Metodología para el aislamiento e identificación de *B. thuringiensis*

Además de la identificación de los aislados, el presente trabajo también propone una metodología para el aislamiento e identificación de *B. thuringiensis*. La metodología es la siguiente.

1. Tomar muestras de suelo a 15 cm de profundidad.
2. Hacer diluciones seriales con las muestras.
3. Sembrar por vaciado en placa en agar nutritivo la dilución 1×10^{-3} e incubarla por 24 h a 30°C.
4. Seleccionar por morfología las más parecidas a *B. thuringiensis* y resembrarlas por separado incubándolas a las mismas condiciones.
5. Comprobar por tinciones de Gram y Schaeffer y Fulton que los aislados son Gram positivos en la primeras horas del cultivo y producen esporas al final del mismo.
6. Comprobar la presencia de inclusiones parasporales de entre 60 y 130 kDa.
7. Extraer su material genético y amplificar la región conservada 16S ADNr.
8. Secuenciar el amplicón.
9. Hacer multialineamientos entre las secuencias obtenidas y las reportadas en las bases de datos.
10. Eleboración de filogenia con los multialineamientos.
11. Analizar las construcciones filogenéticas.
12. Identificar los aislados obtenidos.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

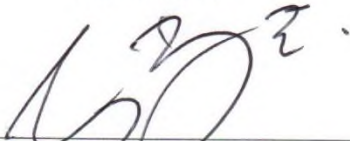
En la Ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 1 de Julio del 2014 a las **12:00 hr**, se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la jefatura de la carrera de **Ingeniería en Biotecnología** de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada **Aislamiento e identificación de cepas de *Bacillus thuringiensis* productoras de proteína Cry** presentado por el alumno **Alain Cruz Nolasco**, con número de matrícula **08090014**, aspirante al grado de **Licenciatura**.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron QUE LA TESIS **SATISFACE** LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES, OTORGANDO SU **APROBACIÓN** PARA QUE EL ASPIRANTE PUEDA PROCEDER CON EL PROCESO DE TITULACIÓN.

Tuxtepec, Oax., a 2 de Julio del 2014.

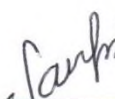
ATENTAMENTE. LA COMISIÓN REVISORA

Asesor de Tesis




Dra. Ana Karín Navarro Martínez
Profesor-Investigador

Presidente



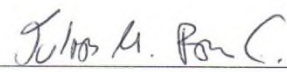
Dra. Sandra Trinidad del Moral Ventura
Profesor-Investigador

Secretario



Dr. Enrique Villalobos Amador
Profesor-Investigador

Vocal



Dr. Julián Mario Peña Castro
Profesor-Investigador