



UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA  
URUGUAY

**Caracterización fenotípica y genotípica de  
aislamientos pertenecientes al grupo  
*Bacillus subtilis*.**

**Fernanda Gorgoroso**

**Tesina de grado para la obtención del título de  
Licenciada en Bioquímica.**

**Tutor: Jorge Bermúdez  
Co-Tutora: Marcela González**

**2012**

## **AGRADECIMIENTOS**

*Agradezco a mi tutor Jorge Bermúdez y a mi co-tutora Marcela González, por darme la oportunidad de trabajar y aprender con ellos, y por toda la ayuda que me brindaron durante el desarrollo y escritura de este trabajo.*

*También agradezco a todos los integrantes de la Unidad de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Agronomía: Stella Reginensi, Jorge Olivera y Nancy, y también a Adriana y Analía (que fueron pasantes en la UTA mientras yo estuve); gracias por los meses que compartimos trabajando juntos, que fueron una experiencia muy grata, con un grupo de gente que me hizo sentir como en casa.*

*Agradezco a mis padres, que siempre me han dado su confianza y su apoyo incondicional, este logro es tan mío como de ellos.*

*Quiero agradecer también a mis amigas: Cecilia, Diana, Soledad, Stephanie y Tatiana. Gracias chicas por estar en mi vida y darme su apoyo siempre, en todo.*

# ÍNDICE

---

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. La leche como medio de cultivo .....	1
1.2. Microorganismos presentes en la leche.....	1
1.2.1. Bacterias lácticas.....	1
1.2.2. Microorganismos psicrótrofos.....	2
1.2.3. Microorganismos termodúricos y termófilos .....	2
1.2.4. Enterobacterias.....	3
1.2.5. Microorganismos patógenos .....	3
1.2.6. Otros .....	3
1.3. Importancia de las bacterias termodúricas esporuladas en la leche .....	3
1.4. El género <i>Bacillus</i> .....	4
1.4.1. Taxonomía del género <i>Bacillus</i> .....	5
1.4.2. El grupo <i>Bacillus subtilis</i> .....	6
1.4.2.1. <i>Bacillus subtilis</i> .....	6
1.4.2.2. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	7
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>8</b>
2.1. Objetivo general .....	8
2.2. Objetivos específicos .....	8
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>9</b>
3.1. Microorganismos .....	9
3.2. Esterilización .....	9
3.3. Caracterización fenotípica.....	10
3.3.1. Pruebas bioquímicas .....	10
3.3.1.1. Ensayo de sulfuro-indol-motilidad (SIM).....	10
3.3.1.2. Triple azúcar hierro (TSI).....	10
3.3.1.3. Fermentación de azúcares .....	10
3.3.1.4. Ensayo de rojo de metilo y Voges-Proskauer.....	11
3.3.1.5. Reducción de nitrato .....	11
3.3.1.6. Utilización de citrato .....	11
3.3.1.7. Hidrólisis de urea .....	11
3.3.2. Crecimiento a 55°C.....	11
3.3.3. Crecimiento en agar papa.....	12
3.3.4. Crecimiento en presencia de NaCl .....	12
3.3.5. Actividad proteolítica, lipolítica y amilolítica en placa.....	12
3.3.6. Análisis de proteínas totales por SDS-PAGE .....	12
3.4. Caracterización genotípica .....	13
3.4.1. Extracción de DNA genómico .....	13
3.4.2. Análisis de la secuencia del gen 16S rDNA .....	13
3.4.3. Análisis RAPD-PCR.....	13
3.4.3.1. Cebador OPR13 .....	13
3.4.3.2. Cebador BOXA1R.....	14
3.4.4. Análisis de la región intergénica 16S-23S rDNA (ITS) .....	14

3.4.5.	Amplificación con cebadores específicos para el gen <i>ytcP</i> de <i>B. subtilis</i>	15
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>16</b>
4.1.	Análisis filogenético	16
4.2.	Caracterización fenotípica	18
4.2.1.	Descripción macroscópica	18
4.2.2.	Descripción microscópica	18
4.2.3.	Pruebas bioquímicas	19
4.2.4.	Crecimiento a 55°C	20
4.2.5.	Crecimiento en agar papa	22
4.2.6.	Crecimiento en presencia de NaCl	22
4.2.7.	Actividad proteolítica, lipolítica y amilolítica en placa	23
4.2.8.	Análisis de proteínas totales por SDS-PAGE	24
4.3.	Caracterización genotípica	25
4.3.1.	Amplificación con cebadores específicos para el gen <i>ytcP</i> de <i>B. subtilis</i>	25
4.3.2.	Análisis RAPD-PCR	26
4.3.3.	Análisis de la región intergénica 16S-23S rDNA (ITS)	28
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>30</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>31</b>

## **1. INTRODUCCIÓN**

---

La leche es un producto de gran importancia a nivel nacional y mundial, por la amplia gama de productos que de ella derivan y su importancia en la nutrición humana.

La producción lechera es muy importante en Uruguay, las regiones lecheras constituyen un 4,5% de la superficie total del país, repartida en 4.519 establecimientos lecheros (DIEA 2011). En 2009/10 la producción comercial de leche en Uruguay fue de 1.766 millones de litros, con un total de 764.000 animales lecheros (DIEA 2011). En 2010 solamente un 7% del total de litros de leche fue destinado al consumo directo, como leche pasteurizada o de media o larga vida, mientras que el restante 93% se destinó a la industria (DIEA 2011). La leche en polvo es uno de los derivados lácteos de mayor producción en el país, en 2010 se produjeron 66.144 toneladas, para lo cual se destinaron 590.086 miles de litros de leche, constituyendo un 42% del total de los productos lácteos elaborados, sólo superada por los quesos, con un 43% (DIEA 2011).

### **1.1. La leche como medio de cultivo**

La leche constituye un buen medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos, ya que contiene glúcidos, lípidos, proteínas, sales y factores de crecimiento (Alais, 1985). Sin embargo, no es un medio de cultivo universal por varias razones: hay pocos aminoácidos y péptidos libres, el único azúcar presente es la lactosa y además la leche cruda tiene mecanismos antimicrobianos intrínsecos (Alais, 1985). A pesar de todo esto, en la leche pueden proliferar varios tipos de microorganismos, ya sean microorganismos benéficos e inocuos, como potenciales patógenos o causantes de degradación de la leche por enzimas (Pinzón, 2006).

### **1.2. Microorganismos presentes en la leche**

#### **1.2.1. Bacterias lácticas**

Este grupo de bacterias lácticas es morfológicamente muy diverso, pero todas son capaces de fermentar la lactosa de forma anaerobia, resultando como principal producto de dicho proceso el ácido láctico (Alais, 1985). Pueden ser homofermentativas, cuando más del 90% de su metabolismo resulta en ácido láctico; o heterofermentativas, cuando producen además otros ácidos y gases (Pinzón, 2006). Son Gram positivas, microaerófilas, mesófilas y termófilas, de crecimiento exigente (Pinzón, 2006). Dentro de este grupo se encuentran bacterias

pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragonococcus*, *Alloiococcus*, *Bifidobacterium* (Pinzón, 2006) y *Propionibacterium* (Alais, 1985). Se dice que las bacterias lácticas conforman la flora benéfica de la leche, dado que al acidificar el medio impiden la proliferación de otras especies bacterianas, además de ser necesarias para la elaboración de ciertos productos lácteos a nivel industrial y artesanal.

### **1.2.2. Microorganismos psicrótrofos**

Se incluye en este grupo a microorganismos mesófilos capaces de crecer a temperaturas próximas a 0oC (Ellner, 2000). Están comprendidos en este grupo diversos géneros bacterianos, como ser *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, ciertas especies del género *Bacillus* y de Enterobacterias (Ellner, 2000). Los microorganismos psicrótrofos son responsables en la mayor parte del deterioro de la leche. Durante el almacenamiento de la leche principalmente cruda en condiciones de refrigeración, éstos microorganismos son capaces de crecer y secretar grandes cantidades de enzimas termoestables, principalmente lipasas y proteasas, que afectan en gran medida la calidad de la leche (Alais, 1985).

### **1.2.3. Microorganismos termodúricos y termófilos**

Los microorganismos termodúricos son, por definición, los que soportan el tratamiento térmico de la leche (pasteurización) (Anand, 2011). Por otro lado, los microorganismos termófilos son aquellos capaces de crecer activamente a altas temperaturas (>50oC) (Anand, 2011). Los microorganismos termodúricos pueden ser o no termófilos (Anand, 2011).

Dentro de los microorganismos termófilos no esporulados, se encuentran especies de los géneros *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Coryneformes*, *Arthrobacter*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Alcaligenes* (Anand, 2011). Las bacterias termófilas esporuladas pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Clostridium* (Anand, 2011), incluyendo especies patógenas como *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium botulinum*.

La pasteurización ejerce una selección a favor de los microorganismos termodúricos, ya que una vez realizado el proceso pueden proliferar en la leche sin flora de competencia (Ellner, 2000). Las bacterias termodúricas esporuladas en ciertos casos hasta soportan el proceso UHT (Ultra High Temperature) (Ellner, 2000).

#### **1.2.4. Enterobacterias**

Son bacterias Gram negativas poco abundantes en la leche y su presencia se asocia a contaminación de origen fecal (Pinzón, 2006). Tienen importancia a nivel higiénico y tecnológico, ya que algunas especies son patógenas (*Salmonella*) o causantes de trastornos gastrointestinales (*Shigella* sp., *Yersinia* sp., algunas cepas de *Escherichia coli*); y además son microorganismos heterofermentativos, productores de gases y sustancias de sabor desagradable, lo cual altera la leche y sus derivados (Pinzón, 2006). Las enterobacterias más comunes en la leche son *E. coli*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Serratia* sp. y *Proteus* sp. (Pinzón, 2006).

#### **1.2.5. Microorganismos patógenos**

Además de los microorganismos patógenos ya nombrados, existen otros patógenos que pueden encontrarse en la leche. *Staphylococcus aureus* produce toxinas termoestables, produciendo intoxicación alimenticia al ser ingeridas en dosis suficiente (Núñez, 2000). *Streptococcus* de los grupos C y G han causado faringitis asociadas a leche contaminada, además de intoxicaciones alimentarias (Núñez, 2000). La zoonosis producida por *Brucella* sp. también puede adquirirse por ingestión de leche contaminada (Núñez, 2000). *Listeria monocytogenes* puede estar presente en leche y quesos, produciendo enfermedad invasiva, la cual puede ser mortal (Núñez, 2000). También pueden encontrarse en la leche especies de *Micobacterium* sp. causantes de tuberculosis en humanos (Núñez, 2000).

#### **1.2.6. Otros**

Pueden encontrarse en la leche *Staphylococcus* sp. no patógenos que no producen niveles considerables de enzimas, por lo cual no afectan la calidad de la leche (Alais, 1985). También pueden encontrarse bacterias de los géneros *Corynebacterium* y *Brevibacterium* (Alais, 1985).

### **1.3. Importancia de las bacterias termodúricas esporuladas en la leche**

Los microorganismos esporulados pueden encontrarse tanto en la leche como en polvos lácteos y quesos (Hinton, 2003). Dado que la mayoría no producen toxinas, la importancia de su presencia en estos alimentos es su capacidad de deterioro de los mismos (Hinton, 2003). Las especies termodúricas esporuladas más comúnmente aisladas de leche y productos lácteos

son *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans* y *Bacillus subtilis* (Hinton, 2003).

Estos microorganismos son capaces de resistir la pasteurización y proliferar si la leche no es correctamente refrigerada (Ellner, 2000). *Bacillus cereus* puede incluso deteriorar leche pasteurizada refrigerada, ya que presenta también características psicrótrofas (Ellner, 2000) y *G. stearothermophilus* es tan termorresistente que soporta el proceso UHT (Ellner, 2000). Las bacterias del género *Clostridium* son esporulados anaerobios estrictos y afectan la calidad de los quesos, ya que producen hinchazón tardía en quesos madurados (Ellner, 2000).

Gran parte de la contaminación de los polvos lácteos con estas especies bacterianas se debe a que las mismas son capaces de formar biofilms en las paredes de la maquinaria industrial, pudiendo proliferar allí cuando la temperatura es la adecuada (35 – 65°C), y contaminando el producto por desprendimiento de bacterias desde el biofilm (Hinton, 2003). Tanto las células vegetativas como las esporas de estos microorganismos son capaces de formar biofilms, incluso se ha reportado que las esporas serían más aptas para adherirse a superficies que las células vegetativas (Palmer, 2008), además de brindarles protección frente a los químicos de limpieza a las células vegetativas una vez constituido el biofilm (Palmer, 2008). La especie más comúnmente aislada de polvos lácteos en Uruguay es *Bacillus licheniformis*, seguida por *Anoxybacillus flavithermus* (Reginensi y col., 2011). Ésta última se ha hallado en polvos lácteos de todas partes del mundo, y parece ser un microorganismo ubicuo en las plantas de manufactura de los mismos (Palmer, 2008).

#### **1.4. El género *Bacillus***

El género *Bacillus* pertenece a la familia *Bacillaceae* del orden *Bacillales*, clase *Bacilli*, phylum *Firmicutes* (Fritze, 2004) y cuenta con 88 especies a la fecha. El género *Bacillus* fue descubierto por Cohn en 1872 (Márquez, 2007). Estos microorganismos fueron de los primeros en ser caracterizados, siendo de gran importancia en el desarrollo de la microbiología (Márquez, 2007).

Las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* son bastones Gram positivos, catalasa positivos, capaces de formar endosporas y pueden ser aerobios o anaerobios facultativos (Cuervo, 2010). Su tamaño puede variar entre 0,5 - 2,5 µm x 1,2 – 10 µm y generalmente son móviles, con flagelos peritricos (Cuervo, 2010). Pueden crecer en un amplio rango de temperaturas, pudiendo ser psicrófilas y hasta termófilas (Márquez, 2007). Su hábitat primario es el suelo, pero se encuentran también en alimentos, plantas y agua fresca o estancada (Cuervo, 2010).



Existen especies de *Bacillus* que son patógenas para el ser humano, de las cuales las más significativas son *B. cereus* y *B. anthracis*. *B. cereus* puede causar intoxicación alimentaria debido a la germinación de esporas y posterior producción de enterotoxinas en alimentos tales como cereales o granos mal cocidos, o carnes con salsas (Leiva, 2001), además de lácteos. También esta especie puede causar infecciones oculares y otras infecciones de tipo oportunista (Murray y col., 2007). *B. anthracis* produce varias toxinas y es causante de ántrax, que es una zoonosis, la cual puede ser cutánea, digestiva o por inhalación, y puede ser mortal si no se trata (Murray y col., 2007). Otras especies de *Bacillus* patógenos son *B. mycoides* y *B. thuringiensis*, causantes de gastroenteritis e infecciones oportunistas (Murray y col., 2007).

Las bacterias del género *Bacillus* han sido, y son actualmente muy estudiadas por diversas razones. Muchas de las enzimas y productos metabólicos de este grupo de bacterias son utilizados en la industria alimentaria, farmacéutica, textil, papelera, cosmética, y en la fabricación de detergentes y plásticos (Zeigler and Perkins, 2009). Hay varias especies endófitas de plantas con propiedades antifúngicas (Poveda y col., 2010). También hay especies productoras de toxinas que afectan larvas de insectos, por lo cual son usadas en agricultura (Márquez, 2007). Incluso se ha estudiado *B. subtilis* como posible probiótico en bovinos, para aumentar la producción de leche (Sierra, 2008).

#### **1.4.1. Taxonomía del género *Bacillus***

La taxonomía del género *Bacillus* ha variado mucho con los años, dada la gran cantidad de especies dentro del mismo y su diversidad. Estudios secuenciales han permitido la separación de ciertos grupos de especies para formar nuevos géneros de bacterias aerobias esporuladas diferentes a *Bacillus* (Fritze, 2004). En base a estos estudios el género *Bacillus* también fue dividido en varios grupos, de los cuales los más importantes son el grupo *B. cereus* y el grupo *B. subtilis* (Fritze, 2004), del cual se hablará en este trabajo.

El análisis de secuencia del 16S rDNA es el método de identificación bacteriano por excelencia, sin embargo su aplicación a la identificación de especies dentro de estos grupos es de poca utilidad, dado que las mismas están muy relacionadas y su similitud de secuencia del 16S rDNA es muy grande (Wang y col., 2007). Por esto se han comenzado a utilizar otras técnicas moleculares como RAPD-PCR, hibridación DNA-DNA, perfiles de restricción, secuenciación de la región hipervariable del 16S rDNA (Goto y col., 2000) y la utilización de genes codificantes de proteínas específicas como marcadores filogenéticos (Wang y col., 2007), así como métodos no moleculares como perfiles cromatográficos de metil-ésteres de ácidos grasos (perfiles

FAME) (Parvathi y col., 2009). Estos métodos han permitido caracterizar a nivel de especie, y en algunos casos de subespecie, estos microorganismos altamente relacionados.

#### **1.4.2. El grupo *Bacillus subtilis***

Este grupo contiene varias especies muy relacionadas entre sí, que son indistinguibles una de otra mediante el análisis de secuencia del gen del 16S rRNA (Wang y col., 2007), ellas son: *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus vallismortis*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *Bacillus sonorensis* y *Bacillus pumilus* (Fritze, 2004; Wang y col., 2007).

Los organismos pertenecientes a este grupo no suelen medir más de 1µm, sus esporangios no son hinchadas y las esporas maduras son elipsoidales. Generalmente son mesófilos y neutrófilos, aunque resisten niveles más altos de pH (Fritze, 2004).

Dentro de este grupo, las especies *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* son las más similares entre sí, lo que acarrea problemas al momento de identificar aislamientos de estas especies, además de que no hay criterios claros establecidos para su identificación.

##### **1.4.2.1. *Bacillus subtilis***

*B. subtilis* es el microorganismo Gram positivo más ampliamente estudiado (Espinosa de los Monteros, 2005), tanto por ser un modelo de estudio de fisiología y desarrollo bacterianos como por sus aplicaciones industriales (Zeigler and Perkins, 2009).

*B. subtilis* es un bacilo mediano de aproximadamente 0,7 a 0,8µm por 2 a 3µm, móvil, con flagelos largos peritricos. Las endoesporas son elipsoidales y terminales o sub-terminales y se liberan por lisis de la célula madre (Zeigler and Perkins, 2009). Ha sido caracterizado como mesófilo, aunque puede crecer tanto a temperaturas bajas (de 5 a 20oC) como altas (de 45 a 55oC) (Zeigler and Perkins, 2009). Realiza fermentación por vía del 2,3-butanodiol, produciendo también glicerol como producto de fermentación y no produce endotoxinas (Sierra, 2008). Produce gran variedad de enzimas extracelulares como α-amilasa, proteasas, lipasas y DNAsas (Hirose y col., 2000), además de antibióticos como bacitracina, polimixina, gramicidina y circulina (Cuervo, 2010). Durante mucho tiempo se consideró como estrictamente aerobio, pero se ha reportado que puede crecer en condiciones anaerobias mediante respiración de nitrato (Espinosa de los Monteros, 2005).

#### 1.4.2.2. *Bacillus amyloliquefaciens*

El nombre *Bacillus amyloliquefaciens* fue propuesto por Fukumoto en 1943, y no fue publicado hasta 1980 (Priest y col., 1987). Comparte las características fenotípicas de *B. subtilis* y su similitud con dicha especie es tan grande que durante mucho tiempo fue considerada como una subespecie (*Bacillus subtilis* subsp. *amyloliquefaciens*) (Priest y col., 1987) o como una variedad dentro de la especie *B. subtilis*, productora de grandes cantidades de enzimas extracelulares (Priest y col., 1987). Finalmente en 1987, *B. amyloliquefaciens* fue reconocido como especie distinta de *B. subtilis* (Priest y col., 1987).

En 1967 Welker y Campbell realizaron un estudio comparativo entre *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, en el cual concluyen que *B. amyloliquefaciens* realmente difiere de *B. subtilis*, por lo cual debe ser reconocido como especie separada, y no como una subespecie de *B. subtilis*. Las diferencias fenotípicas más relevantes reportadas por Welker y Campbell (1967) fueron la capacidad de *B. amyloliquefaciens* de crecer en presencia de un 10% de NaCl, crecimiento característico en agar papa, mayor producción de  $\alpha$ -amilasa y fermentación de lactosa. Además, se reportó un mayor porcentaje C+G para *B. amyloliquefaciens* y una homología de DNA de solamente 15% entre ambos (Welker y Campbell, 1967).

Por otra parte, O'Donnel y col. (1981) caracterizaron varios aislamientos del grupo *B. subtilis* utilizando sistemas API, además de pruebas bioquímicas, cromatografía de pirólisis líquido-gas e hibridación DNA-DNA, y en ese caso no les fue posible separar las cepas de *B. subtilis* de las de *B. amyloliquefaciens*.

La identificación certera de aislamientos de ambas especies es siempre complicada, dada la gran similitud entre ellas. No hay un criterio definido respecto a las pruebas bioquímicas o fenotípicas que deben realizarse para identificar estas especies, además de que la secuenciación del gen 16S rRNA no brinda resultados claros. Esto ha llevado al desarrollo de muchas investigaciones con el fin de desarrollar técnicas que permitan simplificar la identificación de estos microorganismos tan relacionados.

## **2. OBJETIVOS**

---

### **2.1. Objetivo general**

Caracterizar fenotípica y genotípicamente un grupo de aislamientos bacterianos provenientes de tambo y productos lácteos, pertenecientes al grupo *Bacillus subtilis*.

### **2.2. Objetivos específicos**

- ◆ Identificar a nivel de especie cada uno de los aislamientos.
- ◆ Definir herramientas que permitan una identificación robusta y fácil de implementar.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Microorganismos

El trabajo se desarrolló en el laboratorio de la Unidad de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Agronomía, que cuenta con más de 1500 aislamientos de microorganismos esporulados contaminantes de tambo y productos lácteos. Para este trabajo se seleccionaron ocho de estos aislamientos identificados como pertenecientes al grupo *Bacillus subtilis* y las cepas de referencia *B. subtilis* 1A337 y *B. amyloliquefaciens* 10A18 pertenecientes a la colección de *Bacillus* Genetic Store Center (BGSC) de la Universidad de Ohio, Estados Unidos.

**Cuadro 1:** Aislamientos y cepas de referencia utilizados en este trabajo.

No de aislamiento	Fuente
628	Leche en polvo
1067	Leche en polvo
907	Leche en polvo
46	Ración
1091	Leche en polvo
976	Leche en polvo
11	Hisopado de ubre
144	Heces
Cepas de referencia	
1A337 ( <i>Bacillus subtilis</i> )	BGSC
10A18 ( <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> )	BGSC

#### 3.2. Esterilización

Todos los medios de cultivo y materiales utilizados fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 min.

### **3.3. Caracterización fenotípica**

#### **3.3.1. Pruebas bioquímicas**

Todas las pruebas bioquímicas fueron inoculadas a partir de un cultivo fresco en placa de PCA (Plate Count Agar Oxoid).

##### **3.3.1.1. Ensayo de sulfuro-indol-motilidad (SIM)**

Tubos conteniendo 5mL de medio SIM (DIFCO) se inocularon con punta recta y se incubaron a 37°C por 24h. La motilidad se consideró positiva en caso de observarse turbidez más allá de la línea de siembra. La producción de H<sub>2</sub>S se consideró positiva en caso de observarse un ennegrecimiento en la línea de siembra, o en todo el medio. La presencia de la enzima triptofanasa se evaluó determinando la presencia o ausencia de indol mediante revelado con reactivo de Kovac's (Holt y col., 1994). El ensayo se consideró positivo en caso de observarse un anillo de color rojo en la parte superior del tubo luego de agregar el reactivo de Kovac's.

##### **3.3.1.2. Triple azúcar hierro (TSI)**

Tubos conteniendo 5mL de medio TSI (Triple Sugar Iron, DIFCO) en pico de flauta se inocularon con aguja, pinchando el fondo y luego estriando el pico, y se incubaron a 37°C durante 24h. La fermentación de azúcares se determinó por el cambio de color en una o ambas regiones del tubo, lo cual indica acidificación (color amarillo) o alcalinización (color rojo) en la correspondiente región del tubo. Se consideró positiva la fermentación de glucosa (sin fermentación de lactosa ni de sacarosa) en el caso de observarse pico alcalino y fondo ácido (K/A). Se consideró positiva la fermentación de lactosa y/o sacarosa (además de glucosa) en caso de observarse pico y fondo ácidos (A/A). En los casos en que se observó pico y fondo alcalinos la fermentación de azúcares se consideró negativa (K/K). La producción de H<sub>2</sub>S se consideró positiva en caso de notarse un ennegrecimiento en el fondo del tubo. La producción de gas se evaluó por la presencia de burbujas en el agar o desprendimiento del mismo.

##### **3.3.1.3. Fermentación de azúcares**

Se inocularon tubos conteniendo 5mL de medio de cultivo con glucosa, manitol y lactosa como única fuente de carbono y rojo fenol como indicador de pH. Se incubaron a 37°C por 24h. El ensayo se consideró positivo en el caso de observarse crecimiento y viraje del indicador al color amarillo (ácido).

#### **3.3.1.4. Ensayo de rojo de metilo y Voges-Proskauer**

Se inocularon tubos conteniendo 5mL de medio RM-VP (Rojo de Metilo - Voges-Proskauer, DIFCO) (Holt y col., 1994) y se incubó a 37°C por 24h. El cultivo se separó en dos tubos para revelar los ensayos por separado. El ensayo de RM se consideró positivo en caso de observarse la presencia de un color rojo estable luego de agregar 100 µL del indicador rojo de metilo, por lo que el microorganismo fermentó la glucosa por la vía ácido mixta. El ensayo de VP se consideró positivo por el desarrollo de un color rojo-fucsia hasta 15 minutos después de agregar 200 µL de  $\alpha$ -naftol al 5% y 20 µL de KOH al 40%, indicando que el microorganismo fermentó la glucosa por la vía del 2,3-butanodiol.

#### **3.3.1.5. Reducción de nitrato**

Se inocularon tubos conteniendo 5mL de caldo nitrato (DIFCO) y se incubaron a 37°C por 24h. El ensayo se consideró positivo por el desarrollo de un color rojo luego de agregar N,N-dimetil- $\alpha$ -naftilamina y ácido sulfanílico. Los ensayos que resultaron negativos se confirmaron mediante la prueba de reducción de zinc, la cual se consideró positiva en caso de no observarse desarrollo de color luego de agregar una granalla de zinc.

#### **3.3.1.6. Utilización de citrato**

Se inocularon tubos conteniendo 5mL medio citrato Simmons (DIFCO) en pico de flauta y se incubaron a 37°C durante 24h. El ensayo se consideró positivo por la presencia de crecimiento y viraje del indicador al alcalino (azul).

#### **3.3.1.7. Hidrólisis de urea**

Se inocularon tubos conteniendo 5mL de caldo Urea (DIFCO) y se incubaron a 37°C por 24h. El ensayo se consideró positivo por el viraje del indicador hacia el alcalino (rojizo), indicando la hidrólisis de la urea presente en el medio.

### **3.3.2. Crecimiento a 55°C**

Para evaluar el crecimiento a 55°C, se inocularon las cepas en caldo TSB (Tryptic Soy Broth, Oxoid) y se incubaron a 37°C durante 24h. Una dilución 1/100 de estos cultivos se sembró en placas PCA para recuentos por duplicado, las cuales se incubaron a 37°C y a 55°C, durante 24-48h, y se comparó el crecimiento observado a las dos temperaturas.

### **3.3.3. Crecimiento en agar papa**

Placas de agar papa (Spizizen, 1958) se sembraron y se incubaron a 37°C durante 24h. Luego se mantuvieron a temperatura ambiente durante 4 días para observar el desarrollo de pigmentos.

### **3.3.4. Crecimiento en presencia de NaCl**

Se inocularon tubos de TSB adicionados con 10% de NaCl, se incubaron a 37°C durante 48h y se observó el crecimiento.

### **3.3.5. Actividad proteolítica, lipolítica y amilolítica en placa**

La actividad proteolítica, lipolítica y amilolítica se evaluó mediante cultivos en medio PCA adicionado con caseína al 1%, agar Spirit Blue (DIFCO) y PCA con almidón al 1%, respectivamente. Las placas se incubaron a 37°C. por 48h para la actividad proteolítica y amilolítica y por 7 días para la actividad lipolítica. La presencia de un halo claro de hidrólisis en torno a la colonia se interpretó como un ensayo positivo.

### **3.3.6. Análisis de proteínas totales por SDS-PAGE**

Se cultivaron los aislamientos en caldo TS hasta fase exponencial tardía durante 24hs. Las proteínas totales fueron extraídas según el siguiente procedimiento modificado de Gomez y col. (1999). Las células se cosecharon por centrifugación a 7000g durante 10 min a 4°C y se realizaron 2 lavados con PBS (phosphate buffered saline). Se tomaron 100 µL de suspensión celular e igual volumen de una solución al 10% de lisozima y se incubó a 37°C durante 3h. Luego se agregaron 50 µL de SDS (sodium dodecyl sulfate) al 20% y se incubó a 100°C durante 10 min, seguido de una centrifugación a 10.000g durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes conteniendo las proteínas totales se resolvieron mediante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10%, con un gel concentrador al 4%. Se sembró también el marcador de peso molecular (PageRuler Prestained Protein Ladder, apparent MW, kDa Fermentas Life Sciences). Se corrió a 20mA durante 2-3 hs aproximadamente. El revelado se realizó con azul de Coomassie R25 y su posterior decoloración con ácido acético y etanol (Robty and White, 1990).



### **3.4. Caracterización genotípica**

#### **3.4.1. Extracción de DNA genómico**

Se inocularon tubos conteniendo 3mL de TSB con cultivos puros de cada aislamiento y se incubaron a 37°C durante 24h. Las células se cosecharon a 10.000 rpm durante 5 minutos en una centrifuga Spectrofuge 7M (Labnet International Inc. USA). El DNA fue purificado utilizando un Kit comercial de DNA genómico (Fermentas International Inc., USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se determinó la concentración del DNA extraído utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific Incorporation, Wilmington, DE, USA), se alicuotó y se utilizó como molde en las reacciones de amplificación.

#### **3.4.2. Análisis de la secuencia del gen 16S rDNA**

El análisis se realizó en 25µL de reacción conteniendo 1X Thermo buffer (Fermentas, USA), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP (Fermentas, USA), 1U Taq polymerase (Fermentas, USA), 0,2 mM de cada cebador (fD1 and rD1) y 20 ng DNA molde. Los cebadores fD1 y rD1 se usaron para amplificar un fragmento de 1540 bp del gen 16S rDNA (Weisburg y col., 1991). La amplificación se realizó en las siguientes condiciones: desnaturalización de 94°C por 7 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 1 min y 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 10 min. Todos los experimentos incluyeron un control negativo sin DNA molde. Los productos fueron purificados y secuenciados por MacroGen Sequencing Service, Korea, usando un secuenciador capilar ABI PRISM 3730XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando el cebador fD1. Las secuencias de DNA obtenidas fueron comparadas con las depositadas en la base de datos NCBI BLAST database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para la identificación de aislamientos basados en la similitud de secuencia. Las secuencias de los aislamientos y de cepas referencias, así como otras extraídas de GenBank se alinearon usando el paquete ClustalW (Thompson y col., 1994). El análisis filogenético se realizó por el método de “neighbourjoining” (Saitou and Nei, 1987) utilizando el paquete **MEGA** (Kumar y col., 1993).

#### **3.4.3. Análisis RAPD-PCR**

##### **3.4.3.1. Cebador OPR13**

El análisis se realizó en 25 µL de reacción conteniendo: 1X Thermo buffer (Fermentas, USA), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP (Fermentas, USA), 1U de Taq polimerasa (Fermentas,

USA), 1µM cebador OPR13 (5'-GGACGACAAG-3') (Ronimus y col., 1997) y 5 µL de DNA molde. La amplificación se realizó en un termociclador Corbett CG1-96 thermal cycler (Corbett Research, UK) con el siguiente programa: desnaturalización a 94°C por 3 min y 45s; 35 ciclos cada uno de 94°C por 15s, 36°C por 15s y 72°C por 2 min; y un paso de extensión final de 72°C durante 4 min (Ronimus y col., 1997).

#### **3.4.3.2. Cebador BOXA1R**

El análisis RAPD se realizó en 25 µL de reacción conteniendo: 1X Thermo buffer (Fermentas, USA), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 250 µM de cada dNTP (Fermentas, USA), 1U de Taq polimerasa (Fermentas, USA), 2µM cebador BOXA1R (5'-CTAGGCAAGGCGACGCTGACG-3') y 5 µL de DNA molde. La amplificación se realizó en un termociclador Corbett CG1-96 thermal cycler (Corbett Research, UK) con el siguiente programa: desnaturalización a 95°C por 15 min; 35 ciclos cada uno de 94°C por 1 min, 53°C por 1 min y 72°C por 2,5 min; y un paso de extensión final de 72°C durante 10 min (Versalovic y col., 1994).

En ambos experimentos se incluyó un control negativo sin DNA molde. Los productos de la amplificación y el marcador de peso molecular GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder (Fermentas Life Sciences) se resolvieron en gel de agarosa al 1.5% conteniendo 0,5 µg/mL de Goldview (SBS Genetech Co Ltd), se corrió a 10V/cm utilizando buffer Tris-Borato-Ácido etilendiaminotetraacético (TBE). Las bandas resultantes se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador UV.

#### **3.4.4. Análisis de la región intergénica 16S-23S rDNA (ITS)**

El análisis se realizó en 30µL de reacción conteniendo: 1X Thermo buffer (Fermentas, USA), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP (Fermentas, USA), 1U de Taq polimerasa (Fermentas, USA), 0,3µM de cada cebador: 16S EXT (5'-GGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCC-3') y 23S EXT (5'-GCTCCTAGTGCCAAGGCATCCACC-3') (Flint y col., 2001) y 5 µL de DNA molde. La amplificación se realizó en un termociclador Corbett CG1-96 thermal cycler (Corbett Research, UK) con el siguiente programa: desnaturalización a 94°C por 3 min; 30 ciclos cada uno de 94°C por 45s, 65°C por 45s y 72°C por 1 min; y un paso de extensión final de 72°C durante 5 min (Flint y col., 2001).

### 3.4.5. Amplificación con cebadores específicos para el gen *yt cP* de *B. subtilis*

La amplificación se realizó en 25µL de reacción conteniendo: 1X Thermo buffer (Fermentas, USA), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP (Fermentas, USA), 1U de Taq polimerasa (Fermentas, USA), 1µM de cada cebador: *yt cP*-F' (5'-GCTTACGGGTATCCCGC-3') e *yt cP*-R' (5'-CCGACCCCATTTTCAGACATATC-3') (Kwon y col., 2009) y 5 µL de DNA molde. La amplificación se realizó en un termociclador Corbett CG1-96 thermal cycl er (Corbett Research, UK) con el siguiente programa: desnaturalización a 94°C por 5 min; 30 ciclos cada uno de 94°C por 30s, 52°C por 1 min y 72°C por 1 min; y un paso de extensión final de 72°C durante 10 min (Kwon y col., 2009).

En todos los ensayos se incluyó un control negativo sin DNA molde. Los productos de amplificación y los marcadores de peso molecular se resolvieron en gel de agarosa al 1% conteniendo 0,5 µg/mL de Goldview (SBS Genetech Co Ltd) que se corrió a 10V/cm y utilizando buffer TBE. Las bandas resultantes se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador UV.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Análisis filogenético

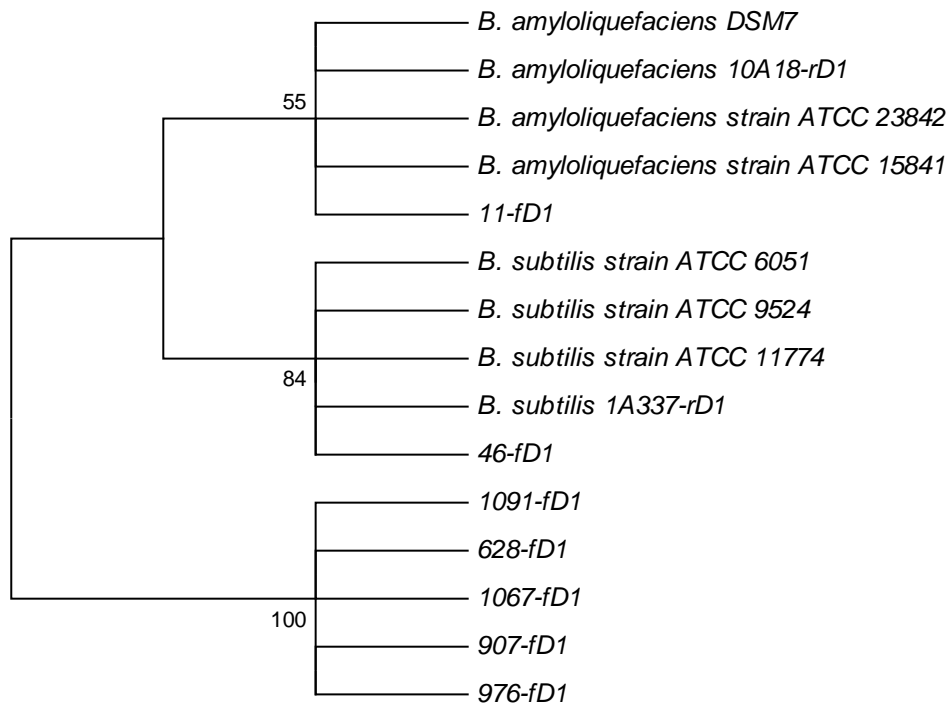
**Cuadro 2:** Alineación de las secuencias del 16S rDNA de aislamientos y cepas de referencia con secuencias de la base de datos del NCBI.

Aislamiento	Identificación	% de identidad	Longitud de la secuencia (pb)
1A337	<i>B. subtilis</i>	100%	764
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100%	
628	<i>B. subtilis</i>	100%	626
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100%	
1067	<i>B. subtilis</i>	100%	744
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100%	
907	<i>B. subtilis</i>	100%	467
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100%	
46	<i>B. subtilis</i>	97%	404
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	97%	
10A18	<i>B. subtilis</i>	100%	768
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100%	
1091	<i>B. subtilis</i>	100%	623
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100%	
976	<i>B. subtilis</i>	100%	658
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100%	
11	<i>B. subtilis</i>	100%	416
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100%	

El primer paso para lograr la identificación de los aislamientos en estudio fue la amplificación de una región de aproximadamente 1500pb del gen que codifica para el 16S rRNA, su posterior secuenciación y comparación con las bases de datos. El Cuadro 2 muestra los resultados de la alineación de secuencias del 16S rDNA para los aislamientos en estudio. Todos los aislamientos presentan una homología de secuencia mayor al 97% con ambas especies, *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* por lo que no es posible la definitiva identificación de los aislamientos. Esto también se observa con las cepas de referencia lo que sugiere que la secuenciación del 16S rDNA no permite identificar los aislamientos a nivel de especie. La comparación de secuencias del 16s rDNA es una de las herramientas más usadas para la

identificación de microorganismos, aunque la presencia de zonas altamente conservadas no permite la discriminación entre especies muy relacionadas o cercanas.

La Figura 1 muestra el análisis de “neighbourjoining” de secuencias parciales del 16S rDNA de los aislamientos y cepas de referencia utilizadas en este trabajo, así como otras obtenidas del GenBank. El análisis permite identificar tres grupos, uno para cada especie, que comprenden todas las cepas de referencia incluyendo las utilizadas en este trabajo y un tercer grupo que contiene 5 de los aislamientos en estudio. El estudio solamente permitió identificar dos de los aislamientos: la cepa 11 se agrupó con *B. amyloliquefaciens* y la cepa 46 con *B. subtilis*. Si bien este análisis brindó un poco más de información que la alienación de secuencias, la mayoría de los aislamientos agruparon como un cluster distinto, no permitiendo la asignación de una de las dos especies en cuestión.



**Figura 1:** Análisis filogenético de aislamientos y cepas de referencia, basado en el análisis de “neighbourjoining” (Saitou y Nei, 1987) de secuencias parciales del 16S rDNA. Los números en los nodos representan los valores de “bootstrap” (Felsenstein, 1985) para un análisis de 100 remuestros.

El análisis filogenético del gen 16S rDNA permitió identificar a los aislamientos 11 y 46 como *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*, respectivamente. A los restantes 5 aislamientos no se les ha podido asignar una especie determinada debido a la alta homología de secuencia de este gen que presentan las especies *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*. Para obtener una correcta

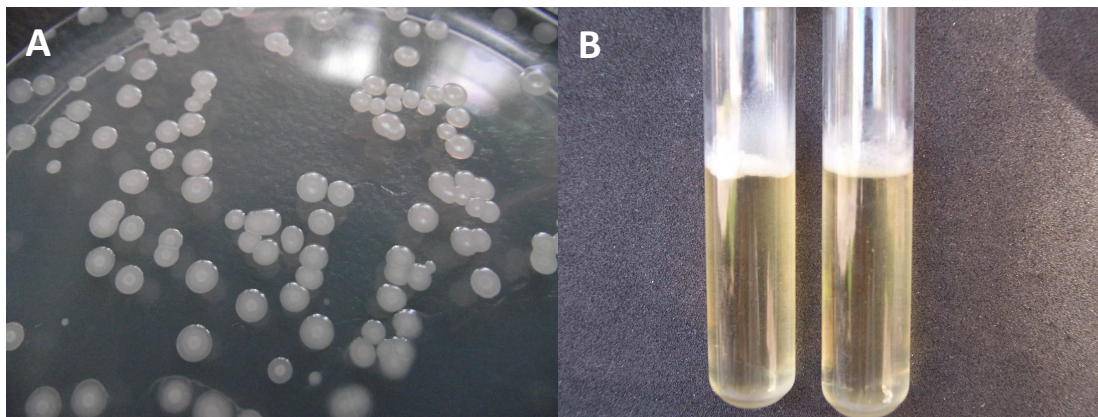
identificación utilizando esta metodología se debería realizar un estudio polifásico que incluya el análisis de secuencias de varios genes.

## 4.2. Caracterización fenotípica

### 4.2.1. Descripción macroscópica

Las colonias obtenidas en medio PCA incubadas durante 24h a 37°C presentaron el siguiente aspecto: colonias redondas, grandes o medianas, blancas translúcidas y de superficie brillante con el centro hundido (Fig. 2A). Los aislamientos 628, 1067 y 976 mostraron gran producción de exopolisacárido, mientras que para los aislamientos 144, 11, 907, 46 y 1091 la producción de exopolisacárido no fue evidente macroscópicamente.

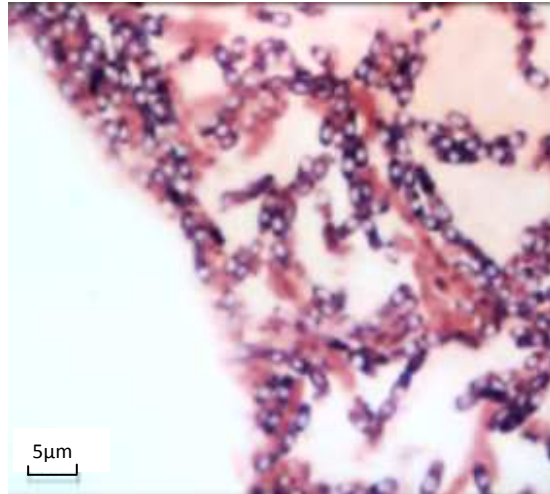
El crecimiento en caldo TSB se caracterizó por la formación de un velo en la superficie del medio y crecimiento en todo el tubo (Fig. 2B).



**Figura 2:** Se muestran el crecimiento 37°C durante 24h. (A) Colonias en medio PCA y (B) crecimiento en tubos de medio TSB.

### 4.2.2. Descripción microscópica

Con tinción de Gram de un cultivo fresco (24h) y un aumento de 100X las células vegetativas se observaron como bastones Gram positivos medianos (2,0 a 2,8  $\mu\text{m}$ ), algunos en cadenas cortas. La formación de esporas se observó en cultivos de 48h (Fig. 3) o más, se observaron tanto esporas en posición subterminal como central, con un tamaño de entre 1,0 y 1,6  $\mu\text{m}$ .



**Figura 3:** Microscopía con un aumento de 100X y tinción de Gram.

#### 4.2.3. Pruebas bioquímicas

Se realizaron 10 pruebas bioquímicas de rutina cuyos resultados se muestran en el Cuadro 3.

**Cuadro 3:** Pruebas bioquímicas para todos los aislamientos de este estudio y cepas de referencia.

Aislamiento	SIM <sup>a</sup>	TSI <sup>b</sup>	RM	VP	Reducción de nitrato	Utilización de citrato	Hidrólisis de urea	Fermentación de glucosa <sup>c</sup>	Fermentación de manitol <sup>c</sup>	Fermentación de lactosa <sup>c</sup>
1A337	-/+/+	A/A	-	+	+	+	-	+	+	+
628	-/+/+	A/A	-	+	+	+	-	+	+	+
1067	-/+/+	K/A	-	+	+	+	-	+	+	+
907	-/+/+	A/A	-	+	+	+	-	+	+	+
46	-/+/-	A/A	-	+	+	+	-	+	+	+
10A18	-/+/+	A/A	-	+	+	+	-	+	+	+
1091	-/+/+	A/A	-	+	+	-	-	+	+	+
976	-/+/+	A/A	-	+	+	+	-	+	+	+
11	-/+/+	A/A	-	+	+	+	-	+	+	+
144	-/+/+	A/A	-	+	+	+	-	+	+	+

<sup>a</sup> Se informa (producción de sulfuro/indol/motilidad).

<sup>b</sup> Se informa (pico/fondo), siendo A=ácido y K= alcalino. No hubo producción de H<sub>2</sub>S ni de gas en ningún caso.

<sup>c</sup> En ningún caso se observó producción de gas.

Como se observa en el Cuadro 3, estas pruebas no permiten agrupar por especie a los aislamientos estudiados, dado que todos presentaron resultados básicamente iguales, con algunas excepciones.

Todos los aislamientos resultaron ser móviles, exceptuando el aislamiento 46. En algunos casos la motilidad se observó sólo en la superficie (aislamientos 907, 1091, 976 y 144), mientras que en los demás se observó motilidad en todo el tubo. Todos los aislamientos resultaron ser positivos para la prueba de indol, lo cual concuerda con lo reportado por O'Donnell y col. (1980) tanto para *B. subtilis* como para *B. amyloliquefaciens*.

En cuanto a la fermentación de azúcares, de acuerdo a la bibliografía *B. subtilis* no fermenta lactosa, mientras que *B. amyloliquefaciens* sí es capaz de fermentar este azúcar pero sin producción de gas (Welker and Campbell, 1967). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que tanto las cepas de referencia como los aislamientos resultaron ser fermentadores de lactosa (sin producción de gas). La prueba de TSI confirma la capacidad de fermentación de lactosa ya que para todos los aislamientos (a excepción del 1067) se observó pico ácido y fondo ácido, lo que indica la fermentación de lactosa y/o sacarosa (además de glucosa). Todos los aislamientos fueron capaces de fermentar glucosa y manitol sin producción de gas, lo que coincide con la descripción de *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* realizada por Welker and Campbell (1967).

El resultado de la prueba de Voges-Proskauer fue positivo en todos los casos indicando que la vía de fermentación de glucosa utilizada fue la del 2,3-butanodiol lo cual coincide con lo reportado en la bibliografía (O'Donnell y col., 1980). Además, esto es coherente con los resultados negativos de la prueba de Rojo de Metilo, ya que hay pocas especies bacterianas conocidas que utilicen ambas vías de fermentación de azúcares (fermentación ácido mixta y vía del 2,3-butanodiol).

Todos los aislamientos fueron positivos para la prueba de reducción de nitrato y capaces de crecer utilizando citrato como única fuente de carbono (en este caso exceptuando el aislamiento 1091), coincidiendo ambos resultados con lo reportado por Welker y Campbell en 1967 y por O'Donnell y col. en 1980. Además, todos los aislamientos resultaron negativos para la hidrólisis de urea, coincidiendo con los reportes de Priest y col. (1987) y Holt y col. (1994).

#### **4.2.4. Crecimiento a 55°C**

Se realizaron ensayos comparativos de crecimiento a 37 y 55°C para todos los aislamientos, (Cuadro 4).

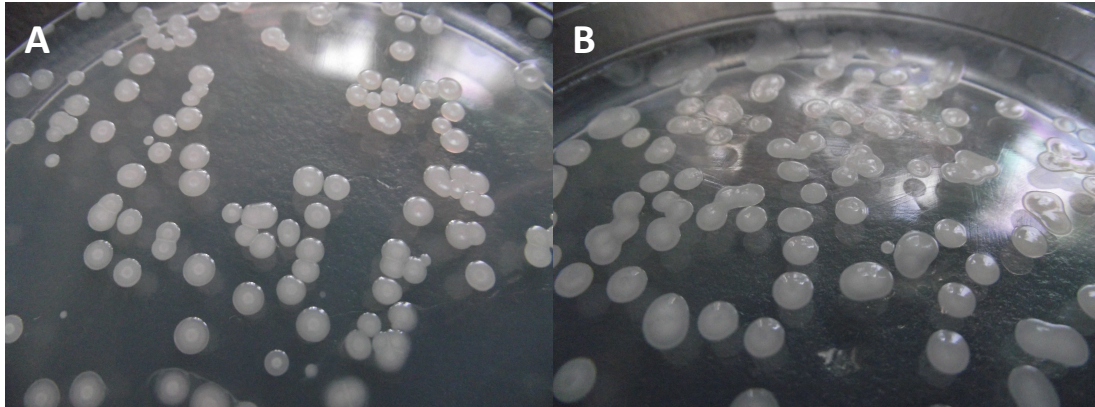


**Cuadro 4:** Crecimiento de los aislamientos bajo estudio y las cepas de referencia a 37 y 55°C (ufc/mL).

Aislamiento	Crecimiento a 37oC (ufc/mL)	Crecimiento a 55oC (ufc/mL)
<b>Grupo A</b>		
<b>1A337</b>	> 3,0x10 <sup>7</sup>	> 3,0x10 <sup>7</sup>
<b>628</b>	> 3,0x10 <sup>7</sup>	1,5x10 <sup>7</sup>
<b>1067</b>	2,1x10 <sup>7</sup>	2,1x10 <sup>7</sup>
<b>907</b>	> 3,0x10 <sup>7</sup>	> 3,0x10 <sup>7</sup>
<b>46</b>	> 3,0x10 <sup>7</sup>	> 3,0x10 <sup>7</sup>
<b>Grupo B</b>		
<b>10A18</b>	> 3,0x10 <sup>6</sup>	0
<b>1091</b>	> 3,0x10 <sup>7</sup>	3,0x10 <sup>5</sup>
<b>976</b>	> 3,0x10 <sup>7</sup>	3,0x10 <sup>3</sup>
<b>11</b>	> 3,0x10 <sup>6</sup>	0
<b>144</b>	> 3,0x10 <sup>6</sup>	0

En base a estos resultados pueden distinguirse claramente dos grupos de aislamientos A y B. Los aislamientos 628, 1067, 907 y 46 pertenecen al Grupo A y no presentan diferencias en cuanto su crecimiento a 37 y 55°C siendo capaces de crecer en ambas condiciones. La cepa de referencia *B. subtilis* 1A337 presentó el mismo comportamiento que los aislamientos del Grupo A. Por otra parte, los aislamientos 1091, 976, 11 y 144 conforman el Grupo B y mostraron un crecimiento marginal o nulo a 55°C, en comparación con el crecimiento a 37°C. La cepa de referencia *B. amyloliquefaciens* 10A18 presentó igual comportamiento, lo cual permite agruparla con el Grupo B.

De acuerdo a lo reportado por O'Donnell y col. (1980) *B. subtilis* tiene una mayor capacidad de crecer a altas temperaturas que *B. amyloliquefaciens*. Tomando en cuenta lo reportado por estos autores y el crecimiento diferencial observado por las cepas de referencia utilizadas en este trabajo se puede inferir que los aislamientos del Grupo A se comportan como *B. subtilis* y los del Grupo B como *B. amyloliquefaciens*.



**Figura 4:** Crecimiento de colonias del aislamiento 1067 perteneciente al Grupo A en medio PCA incubadas a 37°C (A) y a 55°C (B).

Además de los cambios en la capacidad de crecimiento, se observaron cambios en la morfología de las colonias de algunos aislamientos pertenecientes al Grupo A crecidas a diferentes temperaturas. Estos aislamientos presentaron colonias más brillantes cuando eran incubadas a 55°C con respecto a las incubadas a 37°C, con una forma circular menos definida, y no se observó el centro hundido que presentaban las colonias incubadas a 37°C (Fig 4).

#### 4.2.5. Crecimiento en agar papa

Según Welker and Capmbell (1967), *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis* producen pigmentos de color marrón y rosado, respectivamente, al crecer en agar papa. Sin embargo, sólo la cepa de referencia *B. subtilis* 1A337 produjo pigmentos, pero de color marrón y no rosados como lo reportado por los autores (dato no mostrado).

Además del desarrollo de pigmentos diferenciales, Welker and Capmbell (1967) informaron para *B. subtilis* un crecimiento invasivo de aspecto fino y suave, mientras que para *B. amyloliquefaciens* se informó un crecimiento también invasivo, pero con presencia de abundantes pliegues. Si bien se observaron leves diferencias en la textura de las colonias y en los pliegues producidos por las mismas, éstas no permiten unificar un criterio como para agrupar los aislamientos ni las cepas de referencia (datos no mostrados).

#### 4.2.6. Crecimiento en presencia de NaCl

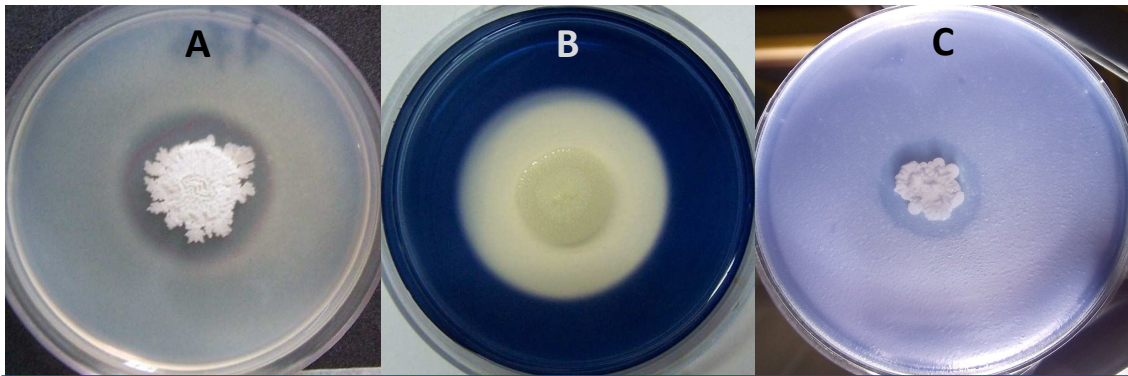
Todos los aislamientos fueron capaces de crecer en caldo TSB adicionado con un 10% de NaCl aunque se constató un crecimiento más lento al observado en ausencia de NaCl. Además, en

presencia de NaCl ninguno de los aislamientos formó velo en la parte superior del tubo característico de su crecimiento en caldo TSB.

Welker and Capmbell (1967) reportan que *B. subtilis* es incapaz de crecer en un medio con 10% de NaCl, mientras que *B. amyloliquefaciens* sí crece en dichas condiciones mientras que O'Donnell y col. (1980) reportan que aislamientos de ambas especies fueron capaces de crecer en medios con un 10% de NaCl, al igual que lo observado en este trabajo.

#### 4.2.7. Actividad proteolítica, lipolítica y amilolítica en placa

En la Figura 5 se observan los halos de hidrólisis para las distintas actividades enzimáticas ensayadas.



**Figura 5:** Ensayo semicuantitativo de actividad enzimática: A) proteólisis, B) amilólisis y C) lipólisis

Finalizada la incubación se midió la superficie de la colonia y de la colonia con su respectivo halo de actividad enzimática y se calculó la relación entre ambos (colonia/colonia+halo) como medida de cuantificación. En base a estos valores se estableció el siguiente código: para un valor de 1 la actividad correspondiente se consideró negativa, para valores mayores que 1 la actividad se consideró positiva, siendo (+) para valores entre 1 y 2; (++) para valores entre 2 y 3; y (+++) para valores mayores de 3 (Cuadro 5).

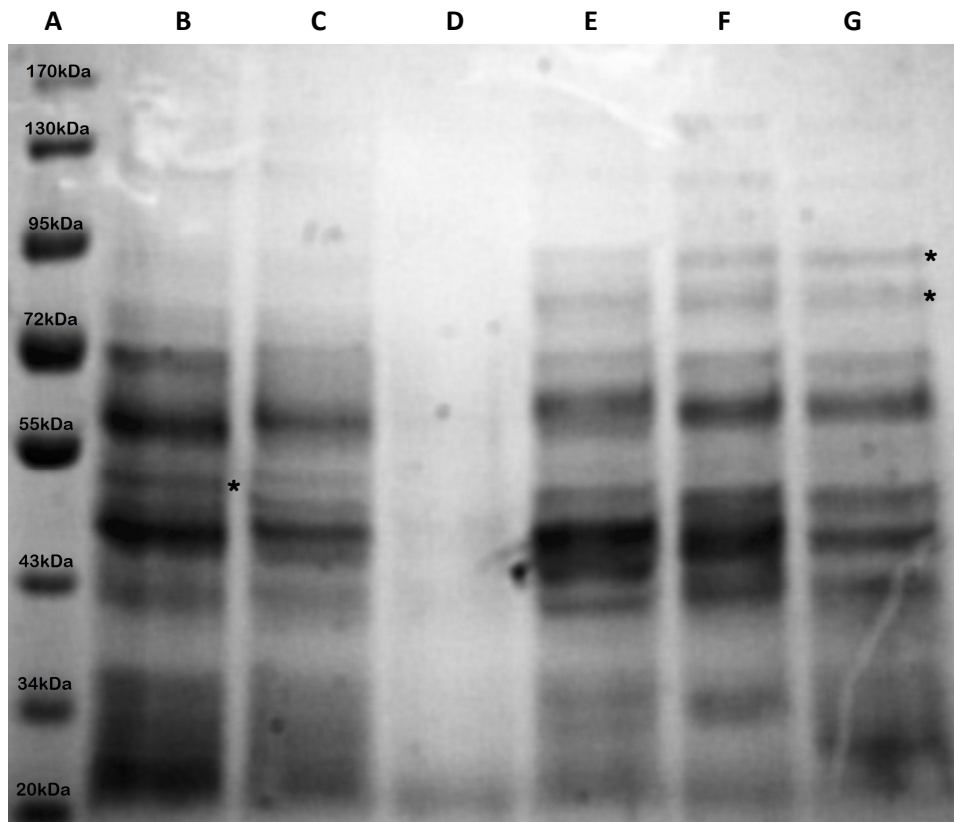
Según la bibliografía (O'Donnell y col., 1980 y Welker and Capmbell, 1967), *B. amyloliquefaciens* produce mayores cantidades de enzimas extracelulares que *B. subtilis*. De acuerdo a los resultados presentados en el Cuadro 5, esto solo se cumplió para las cepas de referencias. En cuanto a los aislamientos estudiados no se observaron diferencias entre los aislamientos pertenecientes a los grupos A y B, y en general los aislamientos presentaron actividades menores que las cepas de referencia.

**Cuadro 5.:** Capacidad enzimática de los aislamientos y las cepas de referencia.

Aislamientos		Proteólisis	Amilólisis	Lipólisis
<b>Grupo A</b>	<b>1A337</b>	+	++	+
	<b>628</b>	+	+	+
	<b>1067</b>	+	+	+
	<b>907</b>	+	++	++
	<b>46</b>	+	+	+
<b>Grupo B</b>	<b>10A18</b>	+++	+++	++
	<b>1091</b>	+	+	++
	<b>976</b>	++	+	++
	<b>11</b>	+	+	+
	<b>144</b>	+	+	+

#### 4.2.8. Análisis de proteínas totales por SDS-PAGE

Para algunos aislamientos se extrajeron las proteínas totales y se resolvieron por SDS-PAGE (Fig. 6).



**Figura 6:** SDS-PAGE de proteínas totales. Carriles: (A) marcador de peso molecular; (B) 144; (C) 11; (D) 976; (E) 907; (F) 1067; (G) 628.

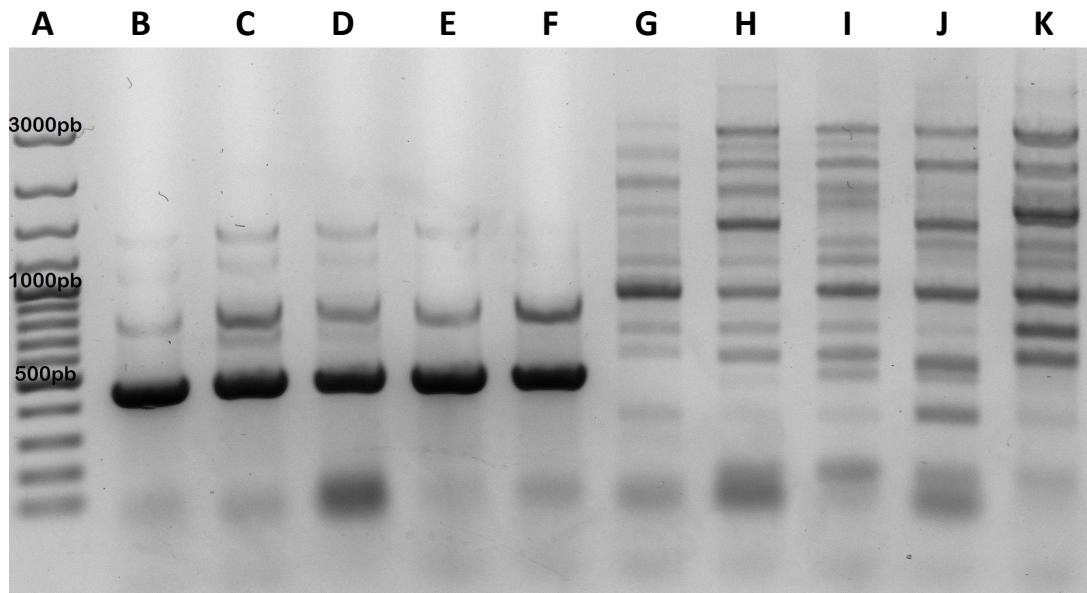
Como se observa en la Figura 6 existen diferencias en el perfil de proteínas totales de los aislamientos pertenecientes a los Grupos A y B. Los aislamientos del Grupo A (carriles E a G) presentan dos bandas de aproximadamente 95kDa y 80kDa propias del grupo, mientras que los aislamientos del Grupo B presentan una banda característica de aproximadamente 50kDa (carriles B a D).

La comparación de perfiles de proteínas totales por SDS-PAGE ha sido reportada como una técnica válida y muy útil para la identificación de microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* (Berber, 2004). Los perfiles de proteínas totales observados reafirman la clasificación realizada en grupos A y B permitiendo la presunta clasificación de estos aislamientos como *B. subtilis* o *B. amyloliquefaciens*.

### 4.3. Caracterización genotípica

#### 4.3.1. Amplificación con cebadores específicos para el gen *ytcP* de *B. subtilis*

El gen *ytcP* codifica para una proteína transportadora de membrana hipotética del tipo ABC (Kwon y col., 2009). Este gen está presente en todas las especies pertenecientes al *B. subtilis* group pero los primers *ytcPF* e *ytcPR* fueron diseñados para hibridar exclusivamente con el gen *ytcP* de *B. subtilis* amplificando una banda característica de 460pb (Kwon y col., 2009).



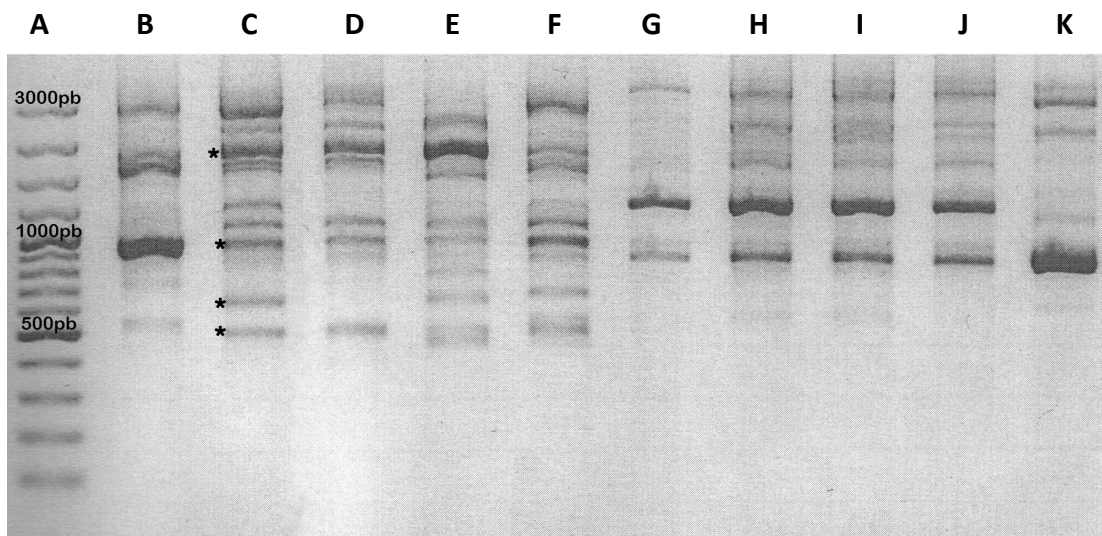
**Figura 7:** Amplicones obtenidos utilizando los cebadores *ytcPF*-*ytcPR*. Carriles: (A) marcador de peso molecular; (B) *B. subtilis* 1A337; (C) 628; (D) 1067; (E) 907; (F) 46; (G) *B. amyloliquefaciens* 10A18; (H) 1091; (I) 976; (J) 11; (K) 144.

La Figura 7 muestra los productos de amplificación del gen *ytcP* para todos los aislamientos estudiados y las cepas de referencia. De acuerdo a lo reportado por Kwon y col. (2009) la amplificación de un producto de 460pb es específica para aislamientos pertenecientes a la especie *B. subtilis*, no encontrándose esta banda en otras especies como *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis*. Los resultados de la amplificación presentados en la Figura 7 reafirman la validez de los Grupos A y B definidos de acuerdo a su capacidad de crecimiento a 55°C y permite identificar a los aislamientos del Grupo A como pertenecientes a la especie *B. subtilis* y a los del Grupo B como pertenecientes a la especie *B. amyloliquefaciens*.

En base a los resultados obtenidos hasta el momento a los aislamientos del Grupo A se les asigna la especie *B. subtilis* y a las del Grupo B se les asigna la especie *B. amyloliquefaciens*, por lo que de aquí en adelante se referirá a ellos de esta forma.

#### 4.3.2. Análisis RAPD-PCR

El cebador OPR-13 es utilizado rutinariamente en el laboratorio para la identificación de especies del género *Bacillus* y ha sido utilizada como técnica de relevamiento e identificación de contaminantes esporulados en tambo y productos lácteos (Reginensi y col., 2011).



**Figura 8:** RAPD-PCR con el primer OPR13. Carriles: (A) marcador de peso molecular; (B) *B. subtilis* 1A337; (C) *B. subtilis* 46; (D) *B. subtilis* 907; (E) *B. subtilis* 628; (F) *B. subtilis* 1067; (G) *B. amyloliquefaciens* 1091; (H) *B. amyloliquefaciens* 976; (I) *B. amyloliquefaciens* 144; (J) *B. amyloliquefaciens* 11; (K) *B. amyloliquefaciens* 10A18.

La Figura 8 presenta los perfiles de bandas obtenidos por amplificación con dicho cebador, para los aislamientos en estudio y las cepas de referencia. Los aislamientos del Grupo A *B.*

*subtilis* (carriles B a F) presentan perfiles de bandas claramente diferentes a los del Grupo B *B. amyloliquefaciens* (carriles G a K).

Se pueden definir algunas bandas características que diferencian ambos perfiles, éstas son:

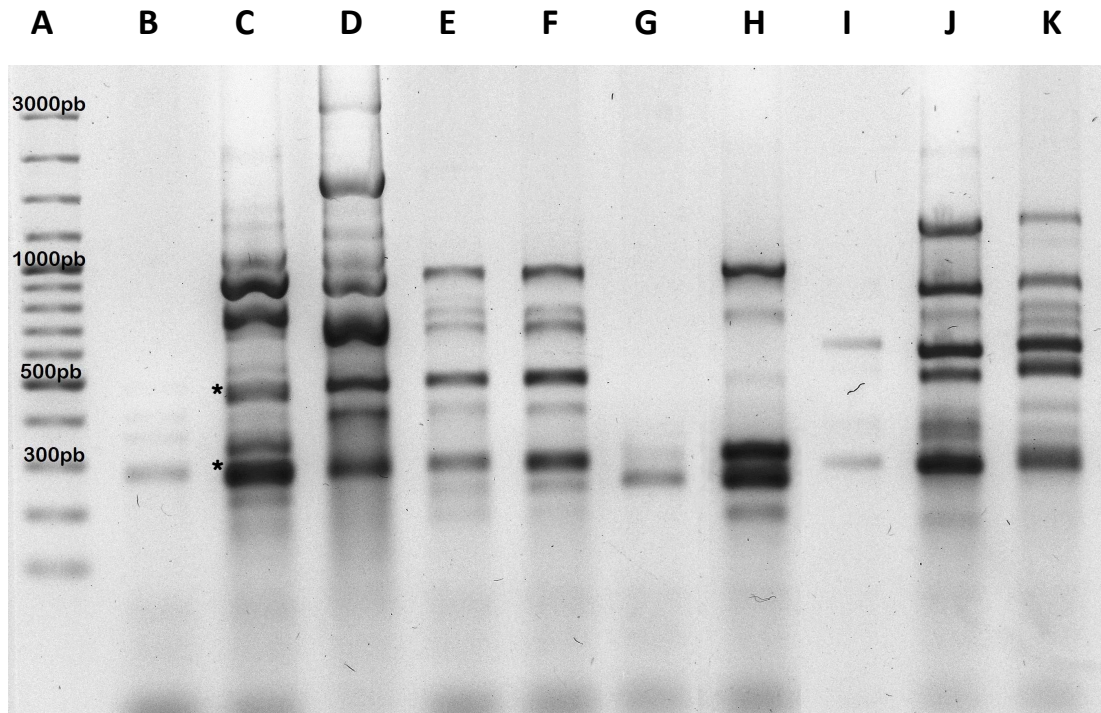
- ◆ Banda de peso molecular levemente menor a los 2000pb en los aislamientos de *B. subtilis* (carriles B a F), no aparece en los aislamientos de *B. amyloliquefaciens* (carriles G a K).
- ◆ También puede observarse una banda del entorno de los 1000pb en los aislamientos de *B. subtilis* (carriles B a F), la cual no está presente en los carriles G a K, correspondientes a *B. amyloliquefaciens*.
- ◆ Además se observa una banda de aproximadamente 500pb otra de 700pb en los aislamientos *B. subtilis* (carriles B a F), que no se observa en *B. amyloliquefaciens* (carriles G a K).

Estas diferencias en los perfiles de bandas entre los aislamientos del Grupo A y B permiten la utilización de la técnica de RAPD con el cebador OPR13 para la identificación de aislamientos pertenecientes a las especies *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, aunque cabe destacar que los patrones de bandas obtenidos para las cepas referencias son levemente distintos a los obtenidos para los aislamientos de este estudio, los cuales sí presentan una gran similitud entre ellos.

La utilización de esta cebador como herramienta para la identificación de aislamientos pertenecientes al género *Bacillus* ha sido reportada por Ronimus y col. (1997). En 2003 también Ronimus y col. definieron bandas de 1900, 1700, 1500, 950 y 700pb como específicas y características para aislamientos pertenecientes a la especie *B. subtilis*. La mayoría de estas bandas fueron encontradas en los aislamientos pertenecientes al grupo A y todas concuerdan con el perfil de bandas de la cepa de referencia utilizada en este trabajo. El perfil de *B. amyloliquefaciens* no ha sido reportado por este autor.

Para reafirmar la validez de los grupos definidos y la correcta identificación de los aislamientos se realizó una BOX-PCR (Fig. 9). Esta técnica de “fingerprinting” permite no sólo la identificación a nivel de especie, sino que también permite realizar una tipificación a nivel de subespecie. La variabilidad observada entre los aislamientos en estudio es mayor a la observada con el cebador OPR-13, especialmente entre los aislamientos del Grupo B (*B. amyloliquefaciens*) (Fig. 9, carriles G a K), para los cuales se distinguen al menos tres patrones

de bandas diferentes, además del que presenta la cepa de referencia. Por otra parte, los aislamientos del Grupo A (*B. subtilis*) (Fig. 9, carriles B a F) presentan patrones de bandas más homogéneos entre sí, compartiendo bandas características; principalmente las que aparecen a 300pb y 500pb.



**Figura 9:** RAPD-PCR con el primer BOXA1R. Carriles: (A) marcador de peso molecular; (B) *B. subtilis* 1A337; (C) *B. subtilis* 1067; (D) *B. subtilis* 907; (E) *B. subtilis* 46; (F) *B. subtilis* 628; (G) *B. amyloliquefaciens* 10A18; (H) *B. amyloliquefaciens* 11; (I) *B. amyloliquefaciens* 1091; (J) *B. amyloliquefaciens* 976; (K) *B. amyloliquefaciens* 144.

La amplificación con el cebador BOXA1R permitió observar la variación intraespecie de los aislamientos.

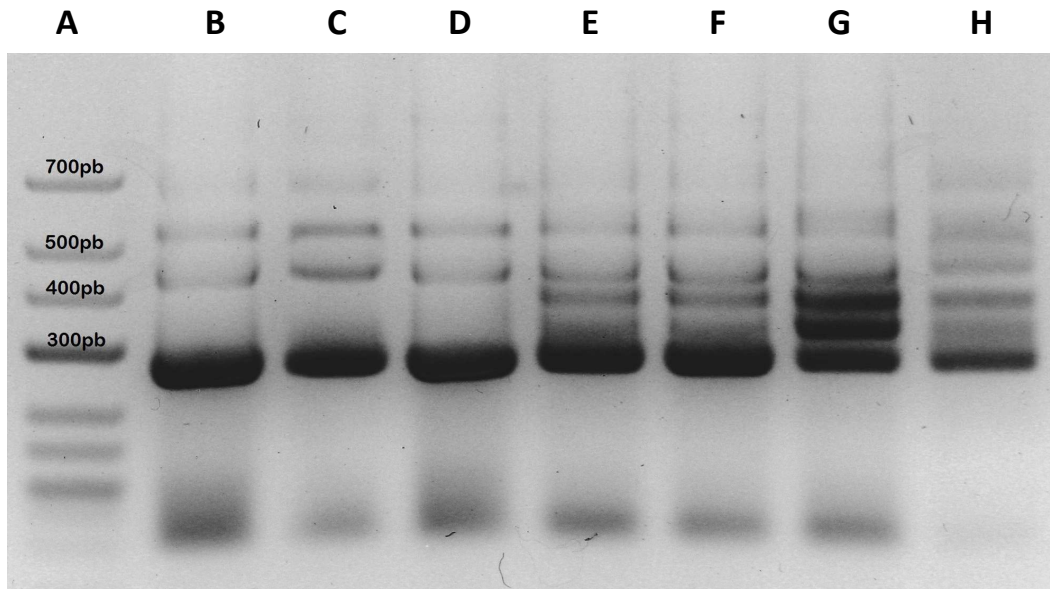
#### 4.3.3. Análisis de la región intergénica 16S-23S rDNA (ITS)

El análisis de la variabilidad de la región intergénica 16S-23S es un buen sustituto para la secuenciación del 16S rDNA cuando se trata de identificar microorganismos muy relacionados entre sí (Flint y col., 2001). Diferentes especies difieren en la longitud y repeticiones de secuencias presentes en esta región del genoma, lo cual resulta en perfiles de bandas diferentes al amplificar la misma (Flint y col., 2001).

La Figura 10 muestra los productos de la amplificación de la región ITS para algunos de los aislamientos estudiados. En este caso nuevamente se conserva la agrupación de las cepas



establecida según el crecimiento a 55°C y la amplificación del gen *ytcP* de *B. subtilis* (Grupos A y B). Se observan diferentes patrones de bandas para los aislamientos *B. subtilis* (Fig 10, carriles B a D) y para los aislamientos *B. amyloliquefaciens* (Fig. 10, carriles E a H) que presentan dos bandas adicionales características de 350 y 400pb aproximadamente.



**Figura 10.:** Amplificación de la región intergénica 16S-23S rDNA (ITS). Carriles: (A) marcador de peso molecular; (B) *B. subtilis* 1067; (C) *B. subtilis* 46; (D) *B. subtilis* 907; (E) *B. amyloliquefaciens* 976; (F) *B. amyloliquefaciens* 1091; (G) *B. amyloliquefaciens* 11; (H) *B. amyloliquefaciens* 10A18.

El patrón de bandas observado para los aislamientos pertenecientes a la especie *B. subtilis* coincide con el presentado en el trabajo de Flint y col. (2001).

Los métodos implementados en este trabajo han permitido caracterizar a nivel de especie los aislamientos estudiados. La diferente capacidad de crecimiento de los aislamientos a 55°C permitió clasificar los mismos en dos grupos y asignar a cada grupo una cepa de referencia. La amplificación del gen *ytcP* de *B. subtilis* basada en el trabajo de Kwon y col. (2009) permitió identificar especie para ambos grupos, mientras que los demás estudios genotípicos complementaron y reafirmaron los anteriores resultados.

## 5. CONCLUSIONES

---

- ◆ Los aislamientos estudiados fueron identificados a nivel de especie, resultando que los aislamientos 628, 1067, 907 y 46 pertenecen a la especie *B. subtilis* y los aislamientos 1091, 976, 11 y 144 pertenecen a la especie *B. amyloliquefaciens*.
- ◆ La amplificación con cebadores específicos para el gen *ytcP* de *B. subtilis* fue clave para la identificación, dado que aportó resultados claros y fáciles de interpretar, los cuales permitieron asignar especie a cada aislamiento estudiado.
- ◆ El estudio de la capacidad de crecimiento a 55°C permitió clasificar los aislamientos en dos grupos, aunque la clasificación a nivel de especie solo se logró por técnicas moleculares, esta fue la única característica fenotípica que varió notablemente entre las dos especies.
- ◆ Los métodos de análisis de proteínas totales por SDS-PAGE, amplificación de la región ITS y RAPD-PCR con cebador OPR13 permitieron diferenciar a las dos especies en estudio, mientras que el cebador BOXA1R permitió también observar la variabilidad intraespecie.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

Alais, Ch., 1985. Ciencia de la leche, 4ª ed. Reverté S. A., Barcelona.

Anand, S., 2011. Addressing Thermotolerants/Thermophiles in dairy processing environment. NCCIA Presentation, South Dakota State University.

Berber, I., 2004. Characterization of *Bacillus* species by numerical analysis of their SDS-PAGE protein profiles. Journal of Cell and Molecular Biology 3, 33-37.

Cuervo, J. P., 2010. Aislamiento y caracterización de *Bacillus spp* como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Trabajo de grado para optar al título de Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Facultad de Ciencias Básicas, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

DIEA Estadísticas Agropecuarias, 2011. Anuario Estadístico Agropecuario 2011. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Uruguay.

Ellner, R., 2000. Microbiología de la leche y los productos lácteos – Preguntas y respuestas, 1ª Ed. Díaz de Santos S.A., Madrid.

Espinosa de los Monteros, J. J., 2005. Caracterización del proceso de crecimiento de *Bacillus subtilis* en condiciones anaerobias. Tesis para la obtención del título de Doctor en Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Felsenstein, J., 1985, Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39, 783-791.

Flint, S. H.; Ward, L. J. H.; Walker, K. M. R., 2001. Functional grouping of thermophilic *Bacillus* strains using amplification profiles of the 16S-23S internal spacer region. Systematic and Applied Microbiology 24, 539-548.

Fritze, D., 2004. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: The aerobic endospore-forming bacteria. Phytopathology 94, 1245-1248.

Gomez, Z.A., Abraham, A.G., Giorgeri, S. y De Antoni, G.L., 1999. Application of polyacrylamide gel electrophoresis and capillary gel electrophoresis to the analysis of *Lactobacillus delbrueckii* whole-cell proteins. Journal of Dairy Science 82, 870-877.

Goto, K.; Omura, T.; Hara, Y.; Sadaie, Y., 2000. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. Journal of Genetic and Applied Microbiology 46, 1-8.

Hinton, A. R., 2003. Thermophiles and fouling deposits in milk powder plants. Thesis for the degree of Doctor in food engineering and technology. Massey University, Palmerston North, New Zealand.

Hirose, I.; Sano, K.; Shioda, I.; Kumano, M.; Nakamura, K.; Yamane, K., 2000. Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two-dimensional protein electrophoretic study. *Microbiology* 146, 65-75.

Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T. and Williams, S. T. (ed.), 1994. *Bergey's Manual™ of determinative bacteriology*, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M., 1993. *MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis*. Pennsylvania State University, University Park, PA.

Kwon, G.; Lee, H.; Park, J.; Kim, J. S.; Lim, J.; Park, C.; Kwon, D.Y.; Kim, Y.; Kim, J. H., 2009. Development of a RAPD-PCR method for identification of *Bacillus* species isolated from Cheonggukjang. *International Journal of Food Microbiology* 129, 282-287.

Leiva, T. A., 2001. Bacilos Grampositivos esporulados aerobios: *Bacillus*, en: Llop, A., Valdés-Dapena, M., Zuazo, J. L., *Microbiología y parasitología médicas*. Editorial de Ciencias Médicas, La Habana, pp. 201-204.

Márquez, F. J., 2007. Aislamiento y taxonomía de bacterias del género *Bacillus* recolectadas en suelos de un bosque de *Pinus radiata* y una pradera permanente en distintas épocas de muestreo. Tesis de grado para obtener el título de Licenciado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Murray, P. R.; Rosenthal, K. S., Pfaüfer, M. A., 2007. *Microbiología Médica*, 5<sup>ta</sup> Ed. Elsevier, Madrid.

Núñez, M. E., 2000. Contaminación bacteriana de la leche entera líquida pasteurizada, procesada dentro del departamento de Guatemala. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de San Carlos, Guatemala.

O'Donnell, A. G.; Norris, J. R.; Berkeley, R. C. W.; Calus, D.; Kaneko, T.; Logan, N. A.; Nozaki, R., 1980. Characterization of *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, and *Bacillus amyloliquefaciens* by pyrolysis gas-liquid chromatography, deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization, biochemical tests, and API systems. *International Journal of Systematic Bacteriology* 30, 448-459.

Palmer, J. S., 2008. Surface characteristics of an adhesive thermophilic spore-forming *Bacillus*, isolated from milk powder. Thesis for the degree of Doctor in Food Technology. Massey University, Palmerston North, New Zealand.

Parvathi, A.; Krishna, K.; Jose, J.; Joseph, N.; Nair, S., 2009. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. *Brazilian Journal of Microbiology* 40, 269-275.

Pinzón, A., 2006. Determinación del índice de bacterias mesófilas aerobias presentes en la leche cruda versus leche pasteurizada que se comercializan en la zona urbana de la ciudad de Popayán. Trabajo de investigación. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Popayán, Colombia.

- Poveda, I.; Cruz-Martín, M.; Sánchez-García, C.; Acosta-Suárez, M.; Leiva-Mora, M.; Roque, B.; Alvarado-Capó, Y., 2010. Caracterización de cepas bacterianas aisladas de la filosfera de *Musa spp.* con actividad antifúngica *in vitro* frente a *Mycosphaerella fijiensis*. *Biotecnología Vegetal* 10, 57-61.
- Priest, F. G.; Goodfellow, M.; Shute, L. A.; Berkeley, R. C. W., 1987. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37, 69-71.
- Reginensi, S. M., González, M. J., Olivera, J. A., Sosa, M., Juliano, P., Bermúdez, J., 2011. RAPD-based screening for spore-forming bacterial populations in Uruguayan commercial powdered milk. *International Journal of Food Microbiology* 148, 36-41.
- Robyt, J. F. and White, B. J., 1990. Electrophoretic technique. *Biochemical techniques: theory and practice*. 1st. Ed., Ed. Waveland Press., 129-157.
- Ronimus, R. S.; Parker, L. E.; Turner, N.; Poudel, S.; Rückert, A.; Morgan, H. W., 2003. A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International Journal of Food Microbiology* 85, 46-61.
- Ronimus, R. S.; Parker, L. E.; Morgan, H. W., 1997. The utilization of RAPD-PCR for identifying thermophilic and mesophilic *Bacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 147, 75-79.
- Saitou, N. and Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.
- Sierra, E. E., 2008. Evaluación de dos niveles de *Bacillus subtilis* adicionados a la alimentación en la producción y calidad de leche bovina en Finca San Julián, Pátulul, Suchitepéquez. Tesis para la obtención del título de Licenciada Zootecnista. Facultad de medicina, veterinaria y zootecnia, Universidad de San Carlos, Guatemala.
- Spizizen, J., 1958. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *PNAS Pathology and Microbiology* 44, 1072-1078.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Versalovic, J., M. Schneider, F. J. de Bruijn, and J. R. Lupski. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5,25–40.
- Wang, L.; Lee, F.; Tai, C.; Kasai, H., 2007. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1846-1850.
- Weisburg, W. G.; Barns S. M.; Pelletier, D. A.; Lane, D. J., 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173, 697-703.

Welker, N. E. and Campbell, L. L., 1967. Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 94, 1124-1130.

Zeigler, D. R. and Perkins, J. B., 2009. The genus *Bacillus*, in: Goldman, E. and Green L. H., *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press, pp 309-338.