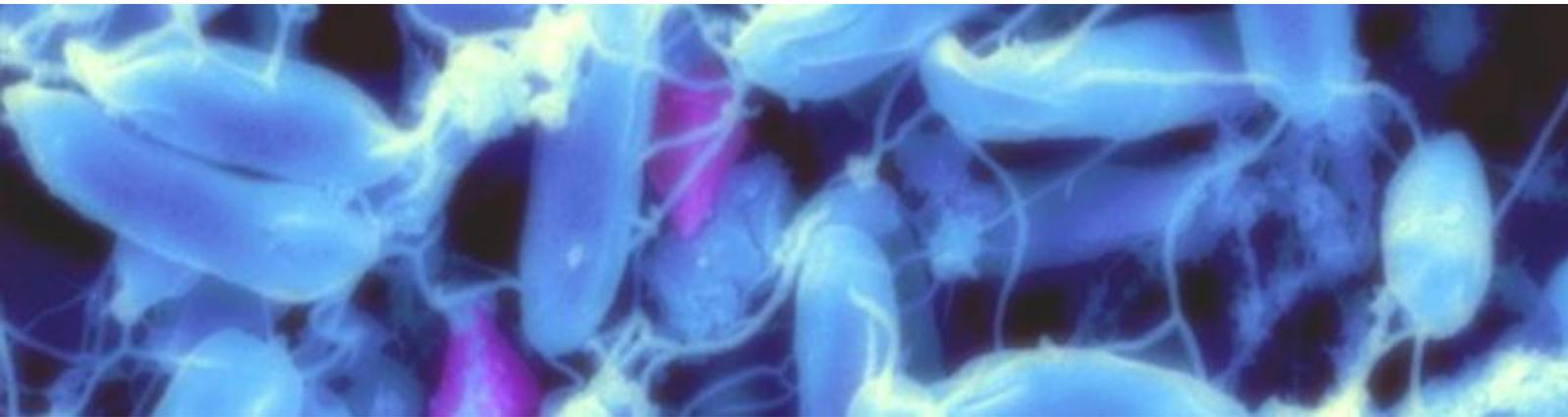


## Pasantía de Grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas Orientación Microbiología

Facultad de Ciencias  
UdeLaR

### CARACTERIZACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis* CON POTENCIAL BIOPESTICIDA



**Estudiante: Bach. Natalia Scioscia Salvatore**  
**Orientadoras: Dra. Lorena Betancor y Dra. Ángela Cabezas**

Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT  
Montevideo - Uruguay

Marzo 2014



Agradezco a mis tutoras Lorena Betancor y Ángela Cabezas por la paciencia y el tiempo invertido en este trabajo, por haberme apoyado y enseñado durante todo este proceso de formación muy importante para mí, no sólo a nivel académico, sino también profesional.

No puedo dejar de darles las gracias a todos mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT, por abrirme las puertas y hacerme sentir siempre parte del equipo Biotec.

Especialmente quería agradecerle a Erienne Jackson, pilar importantísimo en esta etapa, que me enseñó a adaptarme paso a paso en el laboratorio como excelente profesional y amiga.

A Carlos “Toto” Sanguinetti, por haberme dado la oportunidad de compartir la mesada con un gigante.

Por último, y no menos importantes, a mis viejos y hermanos por el amor y apoyo incondicional desde el primer día que pisé la facultad.

Y no me olvido de Eddy y mis amigos, empujando siempre para adelante.

## RESUMEN

*Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria gram positiva que produce cristales proteicos durante la fase de esporulación de su ciclo de crecimiento. Estos cristales, compuestos por proteínas Cry, presentan actividad contra ciertas especies de insectos plaga. El tipo de proteína Cry presente determina el espectro de acción de las subespecies de Bt. Biopesticidas en base a esta especie han sido desarrollados y utilizados mundialmente en las últimas décadas. Sin embargo, no hay productos de fabricación nacional de control biológico basados en Bt. Con vistas al futuro desarrollo de un bioinsecticida basado en Bt utilizando cepas nativas, resulta necesaria la caracterización fenotípica y molecular para la identificación de aislados autóctonos.

En el presente trabajo se abordaron técnicas para la caracterización fenotípica y molecular de 5 cepas aisladas de suelos destinados al cultivo de soja.

Estas técnicas incluyeron una descripción macro y microscópica de las cepas, así como también la aplicación de ensayos bioquímicos como la prueba de catalasa y la hidrólisis de almidón. Los resultados de estos ensayos presentaron la posibilidad de que cuatro de las cepas analizadas fueran candidatas a Bt por exhibir características coincidentes.

A partir de un estudio de los tiempos de esporulación, se pudieron detallar las etapas de crecimiento características de Bt en dos medios de cultivo distintos para futuras aplicaciones y además, se verificó que uno de los métodos de selección de Bt más utilizados no es completamente seguro.

Se trabajó además en la identificación de las cepas mediante técnicas moleculares tales como: el análisis del perfil proteico por electroforesis en SDS-PAGE de la formación de proteína soluble y PCR específico de los genes *cry4* y *cry11*.

Los resultados obtenidos permitieron descartar los aislados estudiados como posibles Bt y establecer las bases para el estudio de nuevos aislados por optimización de las técnicas aquí utilizadas.

# ÍNDICE

	Página
<b>Introducción</b>	1
<i>Biopesticidas</i>	2
<i>Bacillus thuringiensis</i>	3
<i>Métodos para el aislamiento y la identificación de Bt</i>	5
<i>Proteínas Bt con actividad insecticida</i>	6
<i>Mecanismo de acción insecticida de proteínas Cry</i>	7
<b>Objetivo general</b>	10
<b>Objetivos específicos</b>	10
<b>Materiales y métodos</b>	11
<b>Resultados y discusión</b>	26
<i>Caracterización fenotípica</i>	27
<i>Análisis macroscópico: morfología de colonias</i>	27
<i>Análisis microscópico: morfología celular</i>	29
<i>Ensayos bioquímicos: pruebas de identificación</i>	30
<i>Tiempos de esporulación</i>	32
<i>Selección por acetato</i>	35
<i>Caracterización molecular</i>	38
<i>Análisis del perfil proteico: Proteínas Cry</i>	38
<i>Análisis de genes cry 4 y 11 por PCR</i>	42
<i>Discusión general</i>	47
<b>Conclusiones</b>	50
<b>Bibliografía</b>	53

# INTRODUCCIÓN

## ***Biopesticidas***

El ataque provocado por insectos es uno de los principales causantes de pérdidas en las cosechas y reducción en el rendimiento de varios cultivos. Las larvas de varias especies de insectos agreden cultivos como la soja, el maíz, el sorgo, los cítricos y el tomate. Si bien la implementación del uso de insecticidas ha permitido un crecimiento exponencial de la productividad agroalimentaria en el siglo XX, los insecticidas sintéticos están asociados a efectos que limitan la sustentabilidad de prácticas agrícolas (Devine y Furlong, 2007). Entre estos efectos se han documentado daños ecológicos y socio-económicos debidos a perjuicios causados sobre la salud humana y el medio ambiente, en general por acción fuera de blanco y selección de resistencia en especies blanco (Devine y Furlong, 2007; Stern, V.M., 1959). Todos estos problemas destacan la necesidad de contar con herramientas alternativas a los insecticidas químicos; el uso de agentes biológicos para el control de plagas se presenta actualmente como una posible solución a la dificultad planteada (El-Bendary, M.A., 2006). Entre estos agentes de biocontrol, los biopesticidas han tenido amplio desarrollo en investigación y aplicación en varias regiones del mundo; éstos son en base a organismos vivos, presentan actividad insecticida y son utilizados para el control de plagas (Ibrahim *et al.*, 2010). Uno de los más exitosos en cumplir este objetivo es la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) que posee cualidades insecticidas. Las razones principales del éxito de este entomopatógeno son su gran efectividad y selectividad contra insectos plaga, y su baja residualidad que impide o retrasa la aparición de resistencia (Sansinenea y Vázquez, 2010).

Bt ha sido utilizada comercialmente como bioinsecticida desde 1938 en Francia y desde entonces se han desarrollado diferentes bioinsecticidas tópicos basados en diferentes cepas de Bt para el control de insectos (Sanahuja *et al.*, 2011), incluyendo los órdenes *Lepidóptera* y *Coleóptera* responsables de las plagas agrícolas y forestales, y *Diptera* representando a la mayoría de los vectores de enfermedades humanas (Bravo *et al.*, 2011).

### ***Bacillus thuringiensis***

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria que pertenece al género *Bacillus*, el cual está compuesto por bacterias Gram positivas con bajo contenido G+C, ubicándose en el árbol filogenético dentro del phylum *Firmicutes* (Maughan y Van der Auwera, 2011). La secuenciación del gen de ARNr 16S no ha permitido diferenciar especies de forma práctica dificultando su clasificación (Maughan y Van der Auwera, 2011). Según la secuencia del gen de ARNr 16S, Bt pertenece al cluster *Bacillus cereus sensu lato* (Maughan y Van der Auwera, 2011), conformado por las especies *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus gaemokensis*, *Bacillus manliponensis* y *Bacillus anthracis* (Maughan y Van der Auwera, 2011; Tourasse *et al.*, 2006; Nakamura L.K., 1998; Lechner *et al.*, 1998).

Bt es una bacteria anaerobia facultativa, con actividad catalasa, capaz de fermentar una gran variedad de azúcares e hidrolizar numerosos componentes (Sauka y Benintende, 2008).

Habita diversos ecosistemas y ha sido aislada de ambientes variados como el agua (dulce o salada), el suelo, el aire, las plantas, insectos y animales (Maughan y Van der Auwera, 2011).

Cabe destacar que Bt se diferencia del resto de las especies relacionadas filogenéticamente ya que al momento de esporular produce inclusiones cristalinas llamadas cuerpos paraesporales, formadas por proteínas con actividad insecticida (proteínas Cry) (Frankenhuysen, K.V., 2009).

Muchos investigadores han intentado describir sistemas de clasificación taxonómica para Bt, utilizando diversos criterios como serotipificación, susceptibilidad a fagos y perfiles de plásmidos (Sanahuja *et al.*, 2011). Las cepas de Bt se clasifican actualmente sobre la base de sus antígenos (H) flagelares (De Barjac, H., 1981), siendo el sistema de clasificación más aceptado. En la actualidad existen 82 serovares diferentes, dentro de la especie Bt, con actividad insecticida diversa (Lecadet *et al.*, 1991; Frankenhuysen, K.V., 2009).

Al momento de plantear el desarrollo de un biopesticida en base a Bt resulta relevante que las cepas utilizadas para producirlo sean autóctonas. El hecho que sean de origen nativo incide positivamente en su efectividad como tal, debido a que una cepa nativa estará adaptada a las condiciones ambientales donde será utilizada como agente de control biológico. No solo esto, sino que durante la búsqueda de cepas autóctonas también pueden encontrarse nuevas proteínas Cry que impliquen una diferente actividad insecticida.

Actualmente varios grupos de trabajo se encuentran enfocados en la búsqueda de nuevas cepas de Bt con nuevas proteínas o actividad insecticida. Por ejemplo, se han reportado varios trabajos en países como Méjico (Ibarra *et al.*,

2003), Irán (Jouzani *et al.*, 2008), Turquía (Cinar *et al.*, 2008), Siria (Ammounh *et al.*, 2011), entre otros, donde ya se han caracterizado nuevas cepas de Bt.

### ***Métodos para el aislamiento y la identificación de Bacillus thuringiensis***

Existen varios métodos para el aislamiento de Bt. Uno de ellos, y el más utilizado, es el método de selección con acetato de sodio (Travers *et al.*, 1987), basado en la inhibición de la germinación de esporas de Bt en presencia de acetato; otro procedimiento descrito es el pre-tratamiento con calor en seco para eliminar de forma eficaz las esporas de otros microorganismos distintos de Bt (Santana *et al.*, 2008).

Por otra parte, los primeros intentos para la identificación de Bt se basaron en pruebas bioquímicas clásicas, asociadas a sus características fenotípicas, que son las utilizadas para identificar bacterias (Blackburn *et al.*, 2013; Heimpel y Angus, 1958) (ensayos como la prueba de catalasa, lecitinasa, ureasa, hidrólisis de esculina y almidón) que más tarde se combinaron con la serotipificación de antígenos flagelares (Ohba, M., 1996).

Actualmente, el método de identificación más utilizado es la visualización de los cristales de proteínas Cry al microscopio (Patel *et al.*, 2013).

Debido a que los métodos mencionados resultan poco prácticos a la hora de identificar Bt, se están intentando desarrollar nuevas herramientas de identificación y caracterización a nivel molecular basadas en genes distintos al gen de ARNr 16S. Algunos autores han logrado caracterizar distintas cepas de Bt a partir de la identificación de genes específicos (genes cry) por la técnica

de PCR ("Polymerase Chain Reaction") (Ibarra *et al.*, 2003). Se ha logrado también diferenciar al grupo *Bacillus cereus sensu lato*, al que pertenece Bt, con el método de Multiplex PCR (Park *et al.*, 2007). Existen trabajos que permitieron la tipificación de distintos aislados de Bt basados en técnicas derivadas de PCR como ERIC - PCR ("Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus") y de fingerprinting como REP - PCR ("Repetitive Element Palindromic") (Katara *et al.*, 2012).

### ***Proteínas Bt con actividad insecticida***

Las propiedades insecticidas de Bt están conferidas mayormente por un grupo de proteínas llamadas  $\delta$ -endotoxinas o ICP's ("insecticidal crystal proteins") conformado por proteínas Vip ("vegetative insecticidal protein") secretadas durante la fase vegetativa de algunas cepas, y por proteínas Cry ("crystal") y Cyt ("cytotoxic") presentes en las estructuras cristalinas paraesporales (Sanahuja *et al.*, 2011). Las más estudiadas como proteínas con actividad insecticida son las Cry. Existen más de 500 proteínas Cry identificadas hasta la fecha y se presentan en diversas combinaciones en las diferentes cepas conocidas (Bravo *et al.*, 2011).

Los genes *cry* que codifican para las proteínas Cry están contenidos en plásmidos, ADN extracromosómico circular que se replica y transcribe independientemente del ADN cromosómico. Esto, permite una amplia variedad de arreglos y combinaciones dando lugar a una gran diversidad de cepas con distintos espectros de acción (Sanahuja *et al.*, 2011). Las toxinas Cry presentan individualmente un restringido espectro de acción, lo cual les

confiere gran especificidad de acción y seguridad para su uso (Frankenhuysen, K.V., 2009).

La mayoría de las cepas de Bt pueden sintetizar más de una toxina Cry, por lo que no es posible asociar serovares de Bt con un espectro de acción específico (Sanahuja *et al.*, 2011).

Las toxinas Cry se diferencian entre sí en su secuencia aminoacídica; existen alrededor de 72 tipos de ellas descritas actualmente, y se dividen en subtipos, siendo las más diversas Cry 1 con 256 subtipos, Cry 2 con 72, Cry 8 con 49 y Cry 7 con 31 (Bravo *et al.*, 2011; Crickmore *et al.*, 2010).

La continua búsqueda de cepas de Bt con proteínas Cry nuevas resulta fundamental para el desarrollo de nuevos biopesticidas con espectros de acción nuevos (Yilmaz *et al.*, 2012; Xue *et al.*, 2008). Conocer el espectro de acción de cepas nativas resulta relevante para saber el potencial de éstas para el futuro desarrollo de biopesticidas.

### ***Mecanismo de acción insecticida de proteínas Cry***

Cuando comienza a formarse la espora bajo condiciones de stress, Bt inicia la síntesis de uno o varios cristales proteicos (Bulla *et al.*, 1980). Estas inclusiones cristalinas se generan por fuera de la espora (paraesporales) y pueden presentar distintas morfologías, permitiendo su clasificación en bipiramidales, cúbicos, aplanados, esféricos, rectangulares y romboidales (Schnepf *et al.*, 1998).

Una vez que el insecto ingiere los cristales producidos por Bt, la toxicidad característica de estas estructuras depende de un proceso complejo que

requiere tres etapas que son: solubilización de proteínas Cry, procesamiento proteolítico de la pro-toxina a la forma activa y la inserción irreversible de la toxina a la membrana intestinal (Whalon y Wingerd, 2003). Inicialmente, en el intestino medio del insecto, las proteínas Cry se encuentran inactivas en forma de pro-toxina. El pH altamente alcalino junto con enzimas digestivas producen la proteólisis de la pro-toxina (Bravo *et al.*, 2004). Bajo su forma activa, las toxinas Cry pueden acceder a las células epiteliales, insertándose a través de interacciones univalentes con la caderina (Griko *et al.*, 2007). Luego, una cascada de señalización dependiente de magnesio es responsable de la formación de poros en la membrana celular de las células epiteliales, como resultado de la agregación de proteínas Cry (Zhang *et al.* 2006). La formación de poros líticos en la membrana inmediatamente produce cambios fisiológicos importantes y perniciosos a nivel del intestino del insecto, hecho éste que provoca su muerte (Whalon y Wingerd, 2003).

Los acontecimientos descritos concluyen en una parálisis intestinal y posterior inhibición de la absorción de nutrientes produciendo muerte por inanición o septicemia. Además del efecto directo e indirecto de la toxina, la muerte también puede darse por parte de las esporas una vez que comienzan a germinar dentro del insecto (De Maagd *et al.*, 2001; Schnepf *et al.*, 1998).

En el presente trabajo se caracterizarán fenotípica y molecularmente cepas potenciales Bt aisladas de muestras de suelo uruguayas. Se elegirán una serie de ensayos bioquímicos y técnicas moleculares para la caracterización e identificación de cepas candidatas a Bt.

## OBJETIVOS

### ***Objetivo general***

El objetivo de este trabajo fue realizar una caracterización fenotípica y molecular de cepas nativas potenciales *Bacillus thuringiensis* candidatas para el futuro desarrollo de un producto biopesticida de uso agrícola.

### ***Objetivos específicos***

- ▶ Aproximación a la identificación de cepas mediante caracterización fenotípica de cepas candidatas a Bt.
- ▶ Evaluación de un método de selección de Bt.
- ▶ Caracterización molecular de las cepas mediante el estudio del perfil proteico.
- ▶ Análisis de genes *cry* por PCR.

## MATERIALES Y MÉTODOS

## MATERIALES

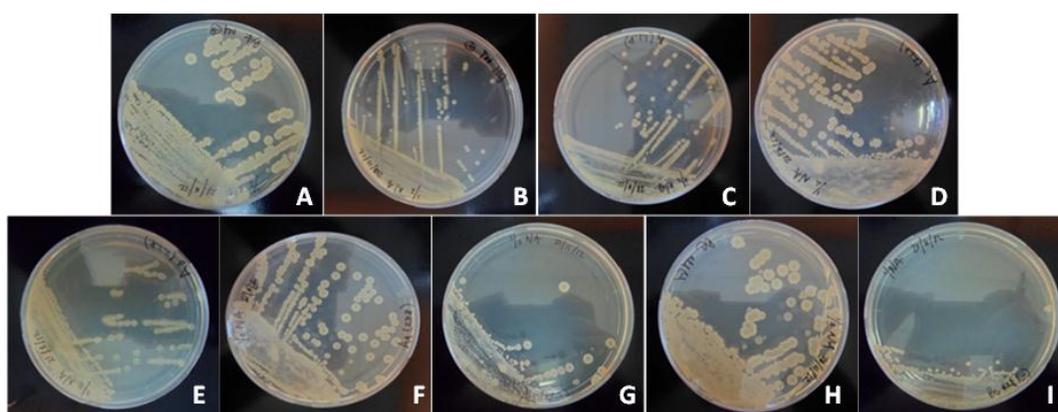
El agar, el cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), el cloruro de manganeso ( $MnCl_2$ ), la solución al 30% de acrilamida/bisacrilamida, la glicina y los reactivos para la determinación de proteína por el método del ácido bicinconínico (BCA) fueron de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EEUU). Los marcadores de peso molecular para proteínas (10-250 kDa) y el marcador preteñido (10-230 kDa) fueron obtenidos de Bio-Labs (Ipswich, Inglaterra). La peptona, la triptona, la triptosa y el extracto de levadura fueron de Oxoid (Hampshire, Inglaterra). El dodecil sulfato de sodio (SDS), el  $\beta$  - mercaptoetanol, el xylene cyanol y el nitrato de plata ( $AgNO_3$ ) fueron de Applichem (Darmstadt, Alemania). El cloruro de sodio (NaCl), el fosfato de sodio pentahidratado ( $NaH_2PO_4 \cdot 5H_2O$ ), el ácido acético glacial y el etanol fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania). El glicerol, el azul de bromofenol y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) fueron de J.T Baker (Xalostoc, México). El acetato de sodio (NaAc) y el persulfato de amonio (APS) fueron de Biopack (Bs.As, Argentina). El kit para la extracción de ADN fue de QUIAGEN (Limburg, Netherlands). Los componentes para la amplificación por PCR (Taq polimerasa, Taq buffer,  $MgCl_2$  y dNTP's) y el marcador de peso molecular Gene Ruler 50pb fueron de Thermo scientific (Lithuania, EU). El hyperladder I fue de BioLine (London, UK). Los primers para *cry4* y *cry11* fueron comprados en IDT (Iowa, EE.UU). El medio Luria Broth (LB), la agarosa y el Tris fueron de Amresco (Solon, Ohio). El agar Müeller Hinton fue de Himedia (Mumbai, India). El Tetrametilendiamida (TEMED) fue de Invitrogen (Auckland, Nueva Zelanda). El colorante Commassie R-250 fue obtenido de Biomedical Inc (Aurora, Ohio). El

metanol fue de Dorwil (Bs. As, Argentina). El tiosulfato de sodio pentahidratado ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) fue de Carlo Ebra reagenti (Milán, Italia). El formaldehído al 37% y el agente intercalante Good View fueron obtenidos de MP Biomedicals (Solon, Ohio) y Sbs (Beijing, China) respectivamente.

## MÉTODOS

### Cepas

Para la realización de este trabajo se contó con un número de cinco cepas y cuatro controles. Los controles positivos fueron *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* cepa HD - 1 (Btk) y *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* cepa IPS-82 (Bti). Los controles negativos utilizados fueron: *Bacillus cereus* ATCC 11770 (Bc) y *Bacillus subtilis* ATCC 3366 (Bs). Las cinco cepas de estudio (A1, A2, A3, A4, A5), provenían de dos suelos destinados al cultivo de soja. Las muestras de suelo fueron tratadas por un método para aislar células pertenecientes al género *Bacillus* basado en la aplicación directa de shock térmico (Jara *et al.*, 2006). En la **figura 1** se pueden observar placas correspondientes a las cepas y controles utilizados incubados durante 24 horas a 30°C.



**Figura 1:** Cepas y controles utilizados en el presente trabajo, en medio Agar Nutriente (NA) (0,5% peptona, 0,3% extracto de levadura, 1,5% Agar, 0,5% NaCl, pH= 6,8). (A) Btk, (B) Bti, (C) A1, (D) A2, (E) A3, (F) A4, (G) A5, (H) Bc, (I) Bs.

## Caracterización fenotípica

### *Características macroscópicas:*

Se partió de cultivos frescos donde se picó una colonia de cada placa (fuente) con un tip y se colocó en 5 ml de medio LB (10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl) estéril. Se incubó a 30°C por 24 horas en shaker a 200 rpm. De estos cultivos se sembraron por estrías, con ansa estéril, placas de NA y se incubaron 16 - 24 horas en estufa a 30°C. Del crecimiento de éstas se realizó una descripción macroscópica de las colonias (Brown, A.E., 2008). Se fotografiaron tanto las placas crecidas con cámara digital (**figura 1**), como las colonias de cada cepa con una lupa electrónica Aigo Digital Viewer GE- 5. Las imágenes y la observación directa del crecimiento en las placas permitieron recolectar datos para el diseño de una tabla comparativa.

### *Características microscópicas:*

#### **Tinción de Gram**

Se realizó un frotis a partir de cultivos frescos en medio LB líquido, con 24 horas de incubación a 30°C. Para ello se colocó con un ansa una gota de muestra sobre un portaobjetos limpio, secándolo a la llama con la precaución de no dañar la integridad celular. Se fijaron las bacterias pasándolas tres veces por la llama, dejando enfriar a temperatura ambiente, por 5 minutos, entre pasajes. Se colocó el porta en un soporte para tinciones y se cubrió con

solución de cristal violeta dejando actuar 1 minuto. Se realizó un lavado suave con agua corriente, se cubrió con lugol y se dejó 1 minuto. Se lavó nuevamente con agua, se agregó etanol 95% durante 30 segundos, moviendo suavemente la lámina. El lavado con etanol continuó hasta que éste no arrastró más colorante. Finalmente, se lavó y se cubrió con solución de safranina por 1 minuto. Se volvió a lavar con agua y se dejó secar a temperatura ambiente. Se observó por inmersión al microscopio UNICO G300, a un aumento de 100x. Las bacterias Gram positivas se observan de color azul-violeta mientras que las Gram negativas se observan rosadas.

### ***Ensayos bioquímicos:***

#### **Ensayo de catalasa**

A partir de cultivos frescos en LB de las cepas y controles se transfirió una ansada de células del cultivo líquido a la superficie de un porta objetos en el que se colocó previamente una pequeña gota de peróxido de hidrógeno al 3%. Se mezcló bien con el ansa. La rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia, se interpretó como ensayo positivo. Se probaron las ansas para eliminar la posibilidad de falsos positivos por la presencia de hierro. Dado que algunas bacterias pueden poseer enzimas distintas de la catalasa, capaces de descomponer el peróxido de hidrógeno, la aparición de unas pocas burbujas diminutas luego 20 a 30 segundos no se consideró como positivo.

Se tomaron fotografías de la reacción con lupa electrónica.

### **Ensayo de hidrólisis de almidón**

Se realizó la siembra por estrías en placas de agar Mueller Hinton (17,50 g/l peptona ácida de caseína, 2,00 g/l infusión de carne, 1,50 g/l almidón soluble, 17,00 g/l agar) de cultivos frescos en LB de las cepas y controles, y se incubaron a 35°C por 24 horas. Luego, se agregó lugol suficiente para cubrir toda la superficie de la placa. Se interpretó como positivo la aparición de un halo alrededor de la estría de crecimiento, resultado de la hidrólisis del almidón presente en el medio de cultivo.

### ***Tiempos de esporulación***

Se sembró una ansada de una colonia aislada, de todas las cepas y controles, a 5 ml de medio LB estéril. Se incubó a 30°C a 200 rpm durante 24 horas. Esto se realizó con el fin de tener las mismas condiciones al inicio del seguimiento.

A partir de dichos cultivos se transfirió, por duplicado, 100 µl a tubos de ensayo conteniendo 5 ml de LB o T3 (3 g/l triptona, 2 g/l triptosa, 1,5 g/l extracto de levadura, 0,005 g/l  $MnCl_2$ ,  $NaH_2PO_4 \cdot 5H_2O$  0,05 M, pH= 6,8). Se incubó a 30°C, 200 rpm. Los cultivos se siguieron durante dos semanas mediante la observación de frescos para determinar presencia de esporas, movilidad y formación de cadenas.

Para ello se observó el cultivo en fresco. Se colocó 10 µl de cultivo sobre un portaobjetos, se cubrió con un cubre objetos y se observó por inmersión al microscopio óptico. Además, se realizó tinción de Gram.

Se observó cada 24 horas durante dos semanas, cada uno de los cultivos con sus respectivos duplicados. Finalmente, se guardaron los cultivos a 4°C una vez esporulados para su utilización en el experimento de selección por acetato.

### ***Selección por acetato***

Se inocularon tubos de ensayo conteniendo 5 ml de LB con NaAc (LB/NaAc) (10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 5 g/l NaCl, NaAc 0,25 M, pH= 6,8) con 50 µl de cultivos esporulados en medio T3, y se incubaron a 30°C y 200 rpm durante 4 horas. Se tomó 1 ml de cultivo y se realizó un tratamiento térmico por 15 minutos a 80°C en un termobloque WiseTherm HB-48, Wisd laboratory instruments. Finalizado este tiempo, se colocó la muestra en hielo durante 10 minutos. Se sembraron 50 µl de una dilución 1/10 en suero fisiológico (9 g/l NaCl) de éstos en placas con medio NA agar y se incubaron en estufa a 30°C por 24 horas.

Se realizó un conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en las placas crecidas. Para aquellas placas con crecimiento abundante se seleccionaron cuatro zonas de 1 cm<sup>2</sup> al azar, se contaron las UFC dentro de éstas, se promedió y multiplicó por la superficie de la placa ( $\pi \cdot r^2$ ) con el objetivo de obtener un número estimativo del total de colonias presente en toda la superficie. Se calculó para cada cepa y control las UFC/ml y su desviación estándar.

A modo de control, para determinar la cantidad inicial de esporas, luego de la incubación en LB/NaAc de 4 horas, se realizó en paralelo y por duplicado el

mismo protocolo descrito anteriormente sin el tratamiento de shock térmico a 80 °C.

## Caracterización molecular

### *Análisis proteico*

- *Obtención de la mezcla esporas y cristales:*

Se utilizó un protocolo adaptado de Yilmaz *et al.* (2012). Se picaron colonias de todas las placas con un tip y se colocaron en un erlenmeyer conteniendo 150 ml de T3 previamente autoclavado; se incubó a 30 °C, 200 rpm durante 7 días para inducir la esporulación. Se corroboró la presencia de esporas observando por inmersión al microscopio óptico (100x).

A 2 ml de los cultivos de 7 días se le adicionaron 2 ml de buffer de carga I (4 ml SDS al 10%, 1,2 ml Tris 1M (pH= 6,8), 10 µl de β-mercaptoetanol, 2,8 ml de agua destilada (dH<sub>2</sub>O)) y se homogenizó bien. La mezcla se calentó en un termobloque por 10 minutos a 95 ° y se centrifugó a máxima velocidad por 30 minutos a 4 °C, en una centrífuga Thermo Scientific SL 16R. 200 µl del sobrenadante, se transfirieron a eppendorfs de 0,5 ml, se cuantificó proteínas y se les adicionó 50 µl de buffer de carga II 6x (4 ml SDS al 10%, 2 ml glicerol, 1,2 ml Tris 1M (pH= 6,8), 0,01% azul de bromofenol, 10µl de β-mercaptoetanol, 2,8 ml de dH<sub>2</sub>O). En paralelo y para obtener muestras más concentradas, los 4 ml restantes de sobrenadante obtenido se transfirieron a unidades de filtro Millipore para centrifuga, con un corte de membrana de 3 KDa y se centrifugaron a 7.000 g hasta obtener un volumen final de 50 µl. Finalmente, a

un volumen de 25  $\mu\text{l}$  de solución concentrada se le adicionó 5  $\mu\text{l}$  de buffer de carga II 6x.

- *Cuantificación de proteínas totales:*

Se empleó el método del BCA (Lowry *et al.*, 1951), cuyo principio consiste en la formación de un complejo  $\text{Cu}^{2+}$ /proteína bajo condiciones alcalinas, seguido por reducción del  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$ . El nivel de reducción es proporcional a la proteína presente. El ion  $\text{Cu}^{1+}$  reacciona con el BCA formando un complejo púrpura intenso que presenta una absorbancia máxima a 562 nm. Este ensayo tiene un intervalo de concentración lineal entre 200 - 1.000 mg de proteína por mililitro.

Se realizó una curva de calibración con seroalbúmina bovina (BSA) como proteína estándar, en un rango de concentración de 0,2 - 1 mg/ml. A cada muestra se agregó la mezcla de reacción de BCA en una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 562 nm, en un Multiskan FC Thermo Scientific. La curva de calibración se realizó graficando valores de absorbancia en función de valores de concentración y se presenta en el **anexo I**.

Los valores de concentración para las muestras problema fueron obtenidos por interpolación en la curva de calibración.

- *Análisis de proteínas por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE):*

- Preparación de los geles:

Se utilizó un sistema de electroforesis discontinua que emplea dos geles, un gel concentrador (“stacking gel”) y un gel separador (“resolving gel”). El gel concentrador presenta un bajo % de acrilamida (4% en nuestro protocolo), por

lo tanto, mayor tamaño de poro y un pH ligeramente ácido. Se preparó un gel separador al 10% de acrilamida.

Se añadieron todos los componentes del gel separador (9,8 ml dH<sub>2</sub>O, 6 ml Tris-HCl 1,5 M (pH= 8.8), 0,12 ml SDS 20%, 7,9 ml de una mezcla de Acrilamida/Bis-acrilamida 30%/0,8% v/v, 0,12 ml APS al 10%, 0,016 ml TEMED) en un tubo falcon de 50 ml y se mezcló bien. Se vertió la preparación en el molde con una pipeta Pasteur, por uno de los extremos hasta aproximadamente 2 cm por debajo de la superficie superior. Se eliminaron las posibles burbujas de la superficie con gotas de butanol. Se esperó aproximadamente 45 min dejando el gel a temperatura ambiente hasta la polimerización completa del gel separador. Luego se retiró el butanol con agua destilada y secó con papel absorbente. A continuación, se añadieron y mezclaron los componentes del gel concentrador y se colocó en el molde con cuidado por uno de los extremos. Finalmente se agregaron los peines y se esperó aproximadamente 30 min hasta que gelificó.

- Condiciones de las corridas electroforéticas:

Se colocaron los geles en el soporte dentro de la cuba de electroforesis y se añadió buffer de corrida 1x (Tris-HCl 25 mM (pH= 8,8), 1% SDS, glicina 200 mM). Se sembró en los pocillos del gel, con una pipeta automática, 30 µl de la muestra y 5 µl del marcador de peso molecular (Protein Ladder 10-250 kDa y Protein ladder prestained 10-230 kDa). A partir del marcador se monitoreó la corrida electroforética y se estimó el tamaño de las proteínas de interés. La corrida se realizó a 50 volts por 15 minutos y luego por 2 horas a 100 volts.

- Tinción de los geles:

Para la tinción con Coomassie R-250, se colocó el gel en aproximadamente 20 ml del colorante (0,1% Coomassie brilliant blue R-250, 10% ácido acético, 40% metanol) durante 16 horas a temperatura ambiente, para luego desteñir con solución decolorante (10% ácido acético, 30% etanol, 60% dH<sub>2</sub>O), en agitación por 2 horas a temperatura ambiente hasta detectar bandas.

En aquellos geles en los que el patrón no se observó claro con Coomassie se les realizó aparte una tinción en plata. Se fijó el gel durante 30 minutos en solución I (35 ml etanol, 7 ml ácido acético, 28 ml dH<sub>2</sub>O). Luego se transfirió a la solución II (7ml solución I, 53 ml dH<sub>2</sub>O), donde se dejó por 15 minutos. Pasado este tiempo se realizaron tres lavados con dH<sub>2</sub>O durante 5 minutos cada uno. Se colocó en solución III (12 mg Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>•5H<sub>2</sub>O, 60 ml dH<sub>2</sub>O) durante 1 minuto, y se repitieron los tres lavados, por 30 segundos cada uno. Se incubó 20 minutos en solución IV (0,12 g AgNO<sub>3</sub>, 60 ml dH<sub>2</sub>O, 45 µl formaldehído 37%), y se lavó dos veces por 20 segundos. Finalmente, se incubó en solución V (reveladora) (3,6 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 48 ml dH<sub>2</sub>O, 30 µl formaldehído 37%, 1,2 ml solución III, llevar a 60 ml con dH<sub>2</sub>O) hasta observar las bandas. Cuando comenzaron a observarse bandas se agregaron 20 ml de solución VI (stop) (3 ml ácido acético, 57 ml dH<sub>2</sub>O) para detener la reacción, durante 10 minutos. Luego de terminada la tinción, se escaneó el gel y se guardó en solución VII (7 ml glicerol, 53 ml dH<sub>2</sub>O).

### ***Análisis genético***

- *Extracción del ADN plasmídico:*

Se utilizó un kit de extracción DNeasy® Blood & Tissue de QIAGEN, el cual ha sido diseñado para una rápida purificación de ADN total a partir de una amplia variedad de muestras incluyendo tejidos, células animales, sangre y bacterias. El mismo incluye columnas para centrífuga que adsorben el ADN y una solución de lisis celular y pasos de lavado que remueven sales, metabolitos y componentes celulares macromoleculares.

El protocolo completo de extracción de ADN se presenta en el **anexo I**.

Se verificó la extracción de ADN por electroforesis en gel de agarosa al 1,2%.

- *Preparación de los geles y corrida electroforética:*

Para la preparación de los geles se resuspendió 1,2 gr de agarosa seca en 100 ml de buffer TAE 1x (Tris-acetato-EDTA) (Tris 40mM, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 1 mM, pH = 8,0), se hirvió la mezcla hasta que la agarosa se fundió y se convirtió en una solución transparente. A continuación, se añadió un agente intercalante fluorescente (Good View), para luego revelar el gel.

La electroforesis se realizó en buffer TAE 1x. Las muestras se diluyeron en 5 µl de buffer de carga 6x (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xylene-cyanol, 30% glicerol). Se utilizó un marcador de peso molecular (Gene Ruler, 50 pb DNA ladder ready - to - use y Hyperladder I, 100 lanes).

La corrida electroforética se realizó durante 20 minutos a 100 volts; una vez finalizada se visualizó el gel en un transiluminador de luz ultravioleta.

- *Colony PCR:*

Se utilizó una extracción de ADN directo de las colonias para realizar PCR (colony PCR) (Jouzani *et al.*, 2008).

Se repicó una colonia de cada cepa crecida en NA a placas de LB agar. Se incubó a 30°C por 24 horas. Luego, dentro de un eppendorf se resuspendió una ansada de células en 100 µl de agua ultra pura. Para poder lisar las células y liberar el contenido total de las mismas, incluyendo los plásmidos, se sometió a 100°C durante 10 minutos en un termobloque (Ceron *et al.*, 1994).

### PCR a tiempo final

Los primers utilizados, sus secuencias y el tamaño del producto esperado se muestran a continuación en la **tabla 1**.

**Tabla 1: Características de los primers utilizados.**

Primers		Secuencia	Producto esperado
Eub27	(Fwd)	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'	1500 pb
U149 2	(Rev)	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT -3'	
Un-cry4	(Fwd)	5'-GCATATGATGTAGCGAAACAAGCC-3'	439 pb
Un-cry4	(Rev)	5'-GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC-3'	
Un-cry11	(Fwd)	5'-CGCTTACAGGATGGATAGG-3'	342 - 352 pb
Un-cry11	(Rev)	5'-GCTGAAACGGCACGAATATAATA-3'	

- **Amplificación del gen de ARNr 16S:**

Se utilizó 1 µl de las extracciones de ADN como molde para la reacción. La mezcla, por tubo de PCR (mix x1) incluyó, 2,5 µl (2,5 mM) de cada dNTP, 1,5 µl (10 µM) de cada uno de los primers Eub27F y U149 2R, 0,5 µl de la enzima Taq polimerasa 5,0 U/µl (Fermentas), 2,5 µl de buffer para PCR 10x y 2,5 µl (25 mM) de MgCl<sub>2</sub> en un volumen final de 25 µl. La PCR se llevó a cabo en un termociclador BIOER, Little Genius con un programa de temperaturas que incluyó una primera etapa de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, fase de

annealing a 55°C por 30 segundos y una extensión de 72°C, 2 minutos. Por último, se realizó una etapa extra de extensión de 72°C durante 7 minutos.

- Amplificación de *genes cry 4 y cry 11*:

Las condiciones de amplificación fueron las mismas tanto para los primers Un-cry4 como para Un-cry11.

La reacción se realizó en un volumen final de 25 µl que incluyó 2,5 µl de buffer de PCR 10X, 2,5 µl de mix de dNTPs (2,5 mM), 1,25 µl de cada primer (10 µM), 0,125 µl de Taq polimerasa 5,0 U/µl (Fermentas) y 1 µl de ADN molde. Una vez en el termociclador se utilizó un programa de temperaturas que inició con un primer paso de desnaturalización a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 20 segundos, una fase de annealing a 56°C de 30 segundos y una extensión a 72°C por 1 minuto. Finalmente, se realizó una etapa de extensión a 72°C por 5 minutos.

Para ambos protocolos de PCR se incluyó un control negativo donde se agregó 1 µl de agua ultrapura en lugar de ADN molde.

Temperatura de annealing: Para determinar la temperatura de hibridación adecuada para cada conjunto de primers se realizó un cálculo en base al contenido de nucleótidos de la secuencia.

Se utilizó la siguiente ecuación (Wallace *et al.*, 1979):

$$\text{Fórmula de Wallace} = [ ( ( A + T ) \times 2 ) + ( ( G + C ) \times 4 ) ] - 2^\circ\text{C}.$$

Todos los productos de PCR obtenidos se verificaron en geles de agarosa al 1,2% como se describió anteriormente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la caracterización de cepas autóctonas candidatas a Bt se realizó un análisis fenotípico que permitió un primer acercamiento para determinar cuales de los aislados podrían pertenecer a la especie Bt.

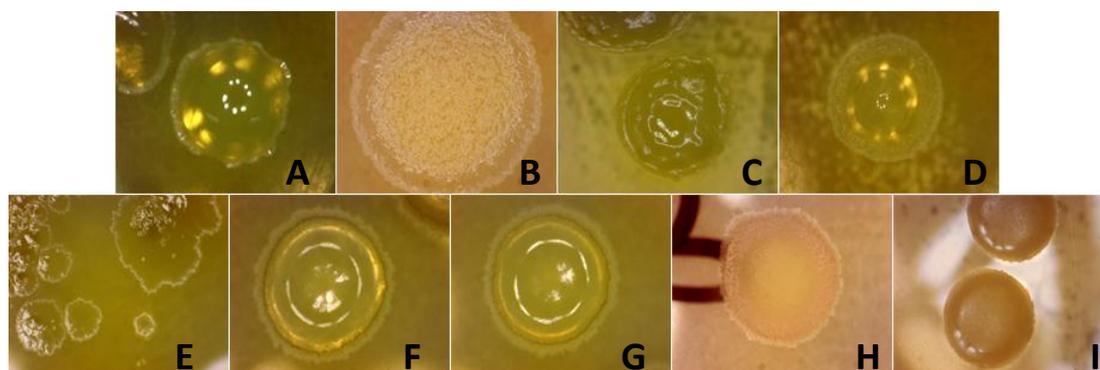
### Caracterización fenotípica

Para el análisis fenotípico de las cepas y su comparación con las cepas control, se estudiaron dos características, la morfología de la colonia y la tinción Gram.

#### *Análisis macroscópico: morfología de colonias*

Se realizó una descripción macroscópica de las colonias resultantes del crecimiento de las cepas y controles en placas con medio NA, y además se compararon las morfologías.

En la **figura 2** se muestran las imágenes obtenidas con lupa de las colonias de las cepas y controles.



**Figura 2:** Morfología de las colonias aisladas de cada cepa en medio NA. (A) *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* (Btk), (B) *B. thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti), (C) A1, (D) A2, (E) A3, (F) A4, (G) A5, (H) *B.cereus* (Bc), (I) *B.subtilis* (Bs).

Estas imágenes permitieron observar en detalle las características morfológicas de las colonias para cada cepa como ser tamaño, color, superficie, consistencia, densidad, forma, elevación y margen. A partir de estos datos se construyó la **tabla 2**.

**Tabla 2: Comparación de morfología de colonias de cepas control y cepas aisladas.**

	TAMAÑO	COLOR	SUPERFICIE	CONSISTENCIA	DENSIDAD	FORMA	ELEVACIÓN	MARGEN
Bc	Mediana	Blanco	Granular / Opaca	Mantecosa	Opaca	Circular	Chata	Filamentoso
Bs	Pequeña	Crema	Granular / Opaca	Mantecosa	Opaca	Circular	Chata	Filamentoso
Btk	Mediana	Blanco	Lisa / Brillante	Viscosa	Traslúcida	Circular	Convexa	Ondulado
Bti	Grande	Crema	Granular / Brillante	Mantecosa	Opaca	Circular	Chata	Entero
A1	Grande	Crema	Granular / Brillante	Mantecosa	Opaca	Circular	Chata	Ondulado
A2	Mediana	Blanco	Lisa / Brillante	Viscosa	Traslúcida	Circular	Convexa	Filamentoso
A3	Grande	Crema	Granular / Brillante	Mantecosa	Opaca	Irregular	Chata	Ondulado
A4	Mediana	Blanco	Lisa / Brillante	Viscosa	Traslúcida	Circular	Elevada	Filamentoso
A5	Mediana	Blanco	Lisa / Brillante	Viscosa	Traslúcida	Circular	Elevada	Filamentoso

Se definió un patrón de colores para los controles positivos (Btk y Bti). Para el caso de Btk se estableció un degradé de azules y para Bti uno en rojos, con el fin de facilitar la determinación de las características compartidas entre los controles y las diferentes cepas aisladas.

Se observó que los caracteres tamaño, color, superficie, consistencia y densidad son los que presentan menor variabilidad entre las distintas cepas estudiadas. Por otro lado, para los caracteres de forma, elevación y margen se hallaron más diferencias entre las cepas. Particularmente, entre los distintos aislados, se pudieron determinar dos grupos: por un lado los aislados A1 y A3 comparten la mayoría de sus características a excepción de su forma, mientras

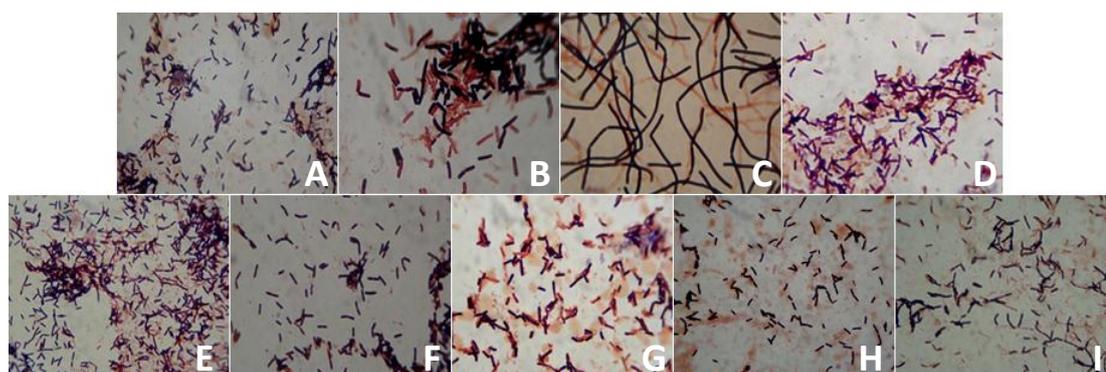
que A2, A4 y A5 son similares en la mayoría de sus caracteres. A4 y A5 son idénticos morfológicamente, y A2 presenta una elevación distinta al resto.

Comparando con las cepas control se observó similitud entre los caracteres morfológicos de A1 y A3 con Bti, y A2, A4 y A5 con Btk. La existencia de similitudes morfológicas entre los aislados y las cepas de referencia se consideró como un resultado favorable ya que mostró un panorama positivo para continuar con la caracterización fenotípica.

### *Análisis microscópico: morfología celular*

#### Tinción de Gram

Bt es una bacteria Gram positiva por tanto se incluyó la tinción de Gram como una herramienta de caracterización. Además, se comparó la morfología celular apreciable con esta tinción, para todas las cepas y controles (**figura 3**).



**Figura 3:** Tinción de Gram de cepas control y cepas aisladas. (A) Btk, (B) Bti, (C) A1, (D) A2, (E) A3, (F) A4, (G) A5, (H) Bc, (I) Bs.

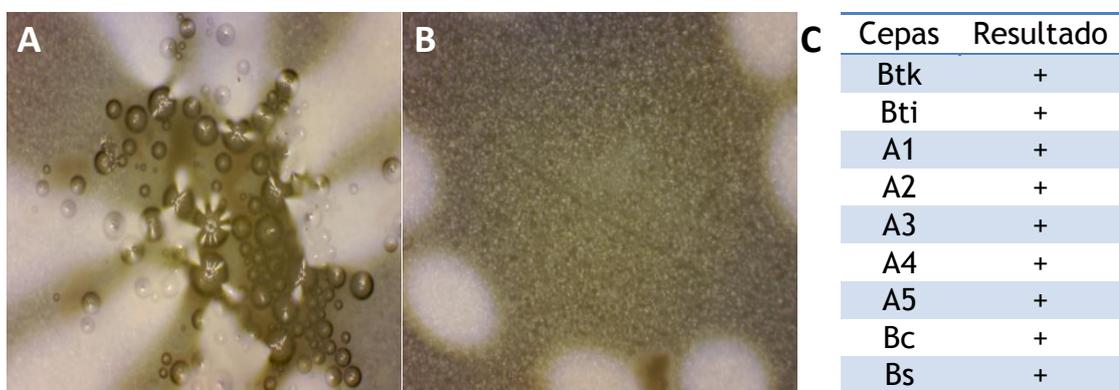
Para todas las cepas la tinción resultó con una coloración azul-violeta típica de Gram positivas y reveló una morfología de bastones para todas ellas. A2, A4 y

A5 presentaron una morfología celular similar. Por otra parte, en Bti observamos que las células son más gruesas en relación al resto y A1 es notoriamente distinta en comparación con todas las cepas, pues mostró células en forma de bastones más grandes y largos. Al comparar los aislados con las cepas de referencia se observó que A3 presenta una morfología similar a Btk. Además, las cepas de referencia Btk y Bc presentaron características semejantes.

### ***Ensayos bioquímicos: pruebas de identificación***

#### **Ensayo bioquímico primario - prueba de catalasa:**

El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo aeróbico. Si se deja acumular, éste resulta letal para las células bacterianas. Bt presenta la enzima catalasa para la descomposición de peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua (Sauka y Benintende, 2008; Sneath, P.H.A., 1986). Por lo tanto, se realizó, por duplicado para cada cepa, la prueba bioquímica primaria conocida como “ensayo de catalasa” (figura 4).

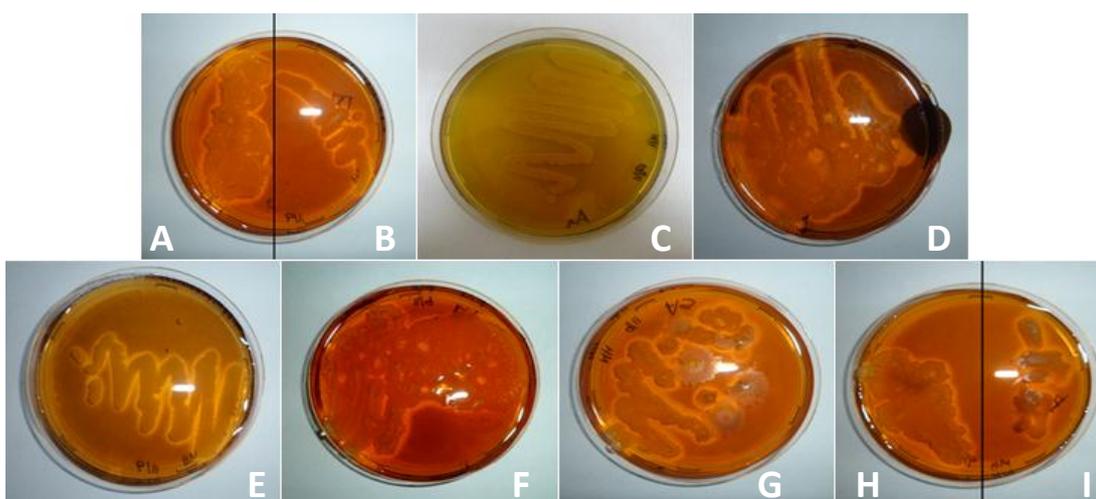


**Figura 4: Ensayo de catalasa.** (A) Resultado catalasa positivo, (B) Resultado catalasa negativo, (C) Tabla mostrando el resultado del ensayo para cada cepa.

Se observó una producción sostenida de efervescencia para todas las cepas, resultando positivas para este ensayo. Por lo tanto, todas presentan la enzima catalasa.

#### Ensayo bioquímico secundario - hidrólisis de almidón:

Bt presenta la capacidad de hidrolizar almidón junto con un grupo reducido de otras especies del género *Bacillus*. Se realizó una prueba bioquímica secundaria conocida como “ensayo de hidrólisis de almidón” para todas las cepas, basado en el método de Hensyl *et al.* (1994) (figura 5).



**Figura 5: Hidrólisis de almidón.** Crecimiento en medio agar Müller Hinton y halo de hidrólisis de almidón luego del agregado de lugol. (A) Btk, (B) Bti, (C) A1, (D) A2, (E) A3, (F) A4, (G) A5, (H) Bc, (I) Bs.

Se observó que todas las cepas resultaron positivas revelando un halo alrededor del crecimiento al sumergirlas en lugol, con excepción de A1 que resultó negativa (figura 5.C). Por lo tanto, los resultados obtenidos podrían estar sugiriendo que el aislado A1 no se encuentra dentro del grupo *Bacillus*

que hidroliza almidón al que pertenece Bt (Hensyl *et al.*, 1994), igualmente este resultado no es suficiente para descartarlo como posible candidato.

### ***Tiempos de esporulación***

El tiempo de esporulación es el tiempo transcurrido entre que las células comienzan a crecer hasta que esporulan. Resulta importante determinarlo ya que en el ensayo de selección por acetato es necesario el agregado de cultivos totalmente esporulados (ver métodos).

Se estudió el tiempo de esporulación de las cepas problema y las cepas control en medio T3 y LB. De esta manera se pretendía determinar el tiempo que demoran en esporular las cepas en dos medios de cultivo y además observar diferencias en las características microscópicas durante las distintas etapas de crecimiento. Para ello, se tuvo especial atención en características como el tamaño, el momento de aparición de las primeras esporas y la presencia o ausencia de movilidad en las células. A lo largo del experimento se realizó tinción de Gram, frescos y se le tomó fotografías con el objetivo de documentar los cambios observables a lo largo del tiempo.

Se monitoreó el crecimiento cada 24 horas, durante dos semanas, de las cepas y controles en ambos medios de cultivo. En la **tabla 3**, se muestra un resumen de todos los datos recolectados.

El análisis completo obtenido en este experimento se detalla en las tablas y figuras del **anexo I**.

**Tabla 3: Resumen de los datos obtenidos a partir del tiempo de esporulación para cultivos en LB y T3. (A) registro del día en el que aparecen las primeras esporas y (B) día en el que las cepas están totalmente esporuladas.**

A	Tiempo (días)		B	Tiempo (días)		
	Cepas	LB		T3	Cepas	LB
	Btk	3	2	Btk	6	3
	Bti	2	2	Bti	6	3
	A1	11	3	A1	13	6
	A2	3	2	A2	8	4
	A3	6	4	A3	10	6
	A4	3	2	A4	6	3
	A5	6	2	A5	8	3
	Bc	3	2	Bc	6	3
	Bs	11	4	Bs	13	6

Para todas las cepas se observaron diferencias en la velocidad de crecimiento entre ambos medios. En general, comparando ambas tablas, el tiempo que demoró cada cepa en esporular fue mayor en LB que en T3 como era lo esperado, ya que según lo reportado en Travers *et al.* (1987) este último inhibe parcialmente el crecimiento y esporulación de aquellas especies pertenecientes al género *Bacillus* distintas de Bt.

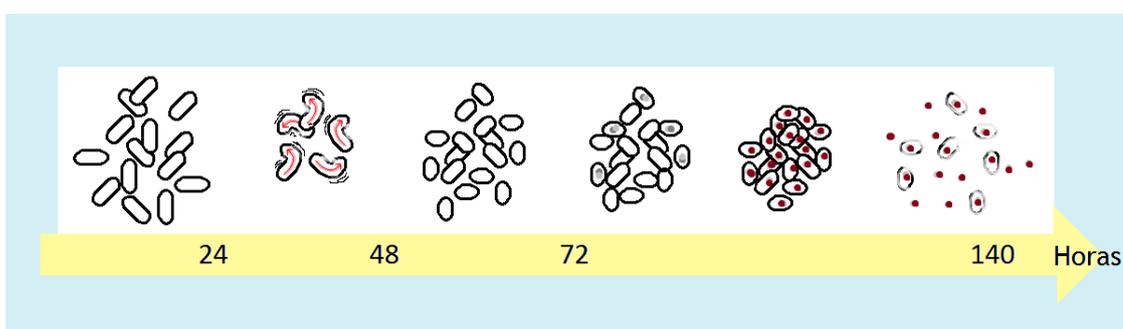
El único en comportarse de forma diferente fue Bti, que comenzó a esporular en el día dos para ambos medios.

Para A1 y Bs el tiempo que transcurre desde que comienzan a crecer hasta que aparecen las primeras esporas es considerablemente mayor al resto de las cepas en medio LB (11 días). Les siguen, A3 y A5, que comienzan el día 6 (tabla 3.A). Los resultados en ésta tabla cambian para el medio T3, donde los tiempos de aparición de las primeras esporas para todas las cepas y controles se mantienen prácticamente constantes, siendo A3 y Bs los que tardaron más tiempo (día 4).

Además, se observó que el tiempo que demoran en estar totalmente esporulados también es menor en T3 (tabla 3.B). Particularmente para el caso de A3, A1 y Bs, el tiempo para completar la esporulación fue mayor (6 días) en comparación al resto de las cepas y controles (3-4 días). Los resultados obtenidos para A1 y A3 indicarían diferencias en el comportamiento al comparar con las cepas control Bti y Btk. Esto podría indicar que estas cepas no pertenecen a la especie Bt lo cual debe verificarse utilizando otros métodos.

Por lo tanto, se estableció que es necesario incubar por más tiempo las cepas en LB que en T3 para obtener cultivos totalmente esporulados. Esto indica que es más conveniente el uso de T3 incubando las cepas por 3-4 días para la realización del ensayo de selección por acetato.

De la observación microscópica de los aislados a distintos tiempos se observaron diferentes etapas durante el crecimiento (figura 5). Se observó primero una fase de aumento del número de células seguida de una etapa donde las células presentan movilidad. Luego comienzan a disminuir su tamaño hasta la fase de producción de esporas. Finalmente, las células comienzan a lisarse, quedando esporas sueltas.



**Figura 5:** Esquema representativo de las etapas de crecimiento en medio T3. Se realizó en base a las fotografías de la tinción de Gram y los frescos del anexo I.

Todas las cepas presentaron una fase de movilidad menos A1. Esto concuerda con lo reportado, ya que la mayoría de los serovares descritos dentro de la especie Bt presentan movilidad debido a la presencia de flagelos en su superficie celular (Gikkis *et al.*, 2012).

### ***Selección por acetato***

Para favorecer el aislamiento de Bt de muestras de suelo, se utilizó el método reportado por Travers *et al.* (1987), en el que se inhibe la germinación de esporas de Bt y no de otras especies de *Bacillus* por el agregado de NaAc 0,25 M a medios de cultivo. Los autores utilizan esta propiedad para el aislamiento de Bt de muestras ambientales. Con el objetivo de utilizar esta propiedad como una característica para caracterizar cepas aisladas de Bt, se diseñó un experimento donde se estudió el comportamiento de esporas de cepas control y cepas aisladas frente a acetato 0,25 M.

Se incubaron esporas en LB/NaAc 0,25 M seguido por un tratamiento térmico. Según lo reportado, las esporas de otras especies de *Bacillus* germinarían y serían sensibles al tratamiento térmico posterior.

Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 4** y **figura 6**.

Tabla 4: Germinación de esporas en LB/NaAc 0,25 M.

Cepas	Control (UFC/ml)	Shock (UFC/ml)
Btk	$2,4E+05 \pm 1,2E+04$	$3,8E+04 \pm 1,1E+04$
Bti	$3,9E+05 \pm 1,5E+05$	$2,5E+03 \pm 1,4E+02$
A1	$8,4E+05 \pm 2,3E+05$	$4,2E+03 \pm 1,4E+03$
A2	$4,7E+05 \pm 1,1E+05$	$4,6E+05 \pm 1,1E+05$
A3	$1,7E+05 \pm 4,6E+04$	$1,9E+05^a$
A4	$3,2E+05 \pm 4,6E+04$	$2,0E+05 \pm 1,0E+04$
A5	$1,5E+05 \pm 2,0E+03$	$2,1E+05 \pm 4,0E+04$
Bc	$2,3E+05 \pm 1,8E+04$	$1,8E+03 \pm 5,7E+02$
Bs	$8,0E+05 \pm 8,6E+04$	$1,4E+03 \pm 2,8E+02$

<sup>a</sup> No se calculó desviación estándar por placa no contable.

Se muestran los recuentos (duplicados) de las diferentes cepas y controles luego de la incubación con acetato 0,25 M y shock térmico así como un control sin shock térmico.

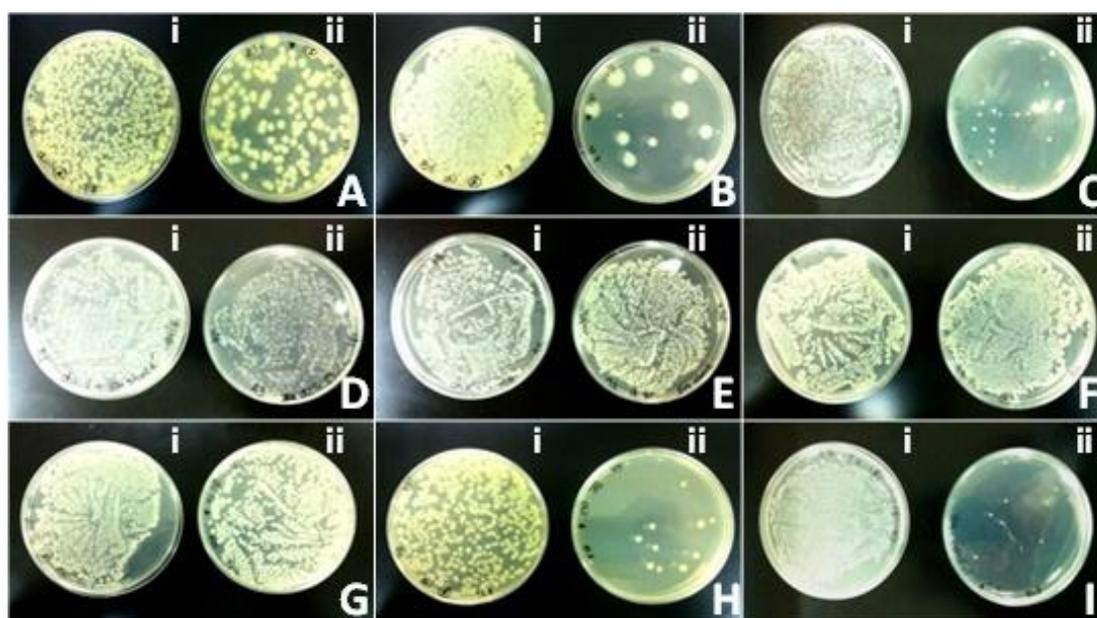


Figura 6: Inhibición de la germinación de esporas por acetato. Placas representativas de cada duplicado en medio NA (dilución 1/10). (i) control de la carga inicial de esporas sin tratamiento térmico, (ii) resultado luego del shock a 80°. (A) Btk, (B) Bti, (C) A1, (D) A2, (E) A3, (F) A4, (G) A5, (H) Bc, (I) Bs.

Con los resultados expuestos en la **tabla 4** se observó que todas las cepas sobrevivieron al shock térmico a 80° C luego de la incubación en LB/NaAc, incluso *B. cereus* y *B. subtilis*.

Sin embargo, dichas cepas y el aislado A1 mostraron una reducción del recuento luego del shock en comparación al control sin shock térmico. Los recuentos para los controles negativos Bs y Bc fueron de un orden por debajo del control mientras que para A1 fue de dos órdenes. Sin embargo, los controles positivos también se vieron afectados por el shock térmico, se registró para Bti un descenso de dos órdenes y para Btk de un orden luego del tratamiento a 80° C.

Esto indica que las esporas de Btk y Bti germinaron en presencia de NaAc 0,25 M.

Los resultados obtenidos nos demuestran que el NaAc no inhibió totalmente la germinación de las esporas de Bt y que la germinación de esporas en presencia de NaAc se da de forma diferencial entre las cepas (**tabla 4, figura 6**).

Por otra parte, el método de selección descrito por Travers *et al.* (1987), se utilizó en general para aislar Bt de muestras provenientes directamente del ambiente y no de cultivos puros. Se probó la germinación en acetato para un número reducido de especies pertenecientes al género *Bacillus* distintas a Bt y además, el método que utilizaron para hacer el shock térmico posiblemente sea más eficiente, ya que en este trabajo se utilizó un dispositivo de pasteurización para la transferencia de calor que permitió que se disipe mejor entre las muestras.

En base a lo observado se determinó que la inhibición de la esporulación en acetato 0,25 M no es una propiedad que resulta útil a la hora de caracterizar cepas potenciales de Bt y que dicho método fue diseñado con otro objetivo.

### Caracterización molecular

#### ***Análisis del perfil proteico: proteínas Cry***

La síntesis de proteínas Cry es activada al momento en el que comienza a esporular la célula, por lo que un análisis del perfil de proteínas de células esporuladas nos permitiría caracterizar serovares tal y como se realizó en Yilmaz *et al.* (2012).

De esta forma, se efectuó un análisis de la composición proteica del total de proteínas solubles por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE). Se obtuvo un perfil de proteínas solubles para cada cepa y control.

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE (Laemmli, U.K., 1970), es una técnica de separación de proteínas en función del peso molecular, que se basa en la desnaturización de las proteínas por acción de detergentes, agentes reductores, caotrópicos y calor. Los complejos SDS-proteína adoptarán una forma única desplegada y un valor carga/masa constante. Por lo tanto, se separarán de acuerdo a su tamaño cuando migren desde el cátodo al ánodo a una velocidad relacionada con su peso molecular.

Como se mencionó anteriormente las proteínas Cry son sobreexpresadas por Bt durante la fase de esporulación de su ciclo de crecimiento, por lo que resultó

de suma importancia para el estudio de la composición proteica partir de células esporuladas.

Por lo tanto, se aisló la fracción proteica soluble de todas las muestras y se determinó la concentración de proteína (tabla 5).

**Tabla 5: Concentración proteica de todas las cepas y controles.**

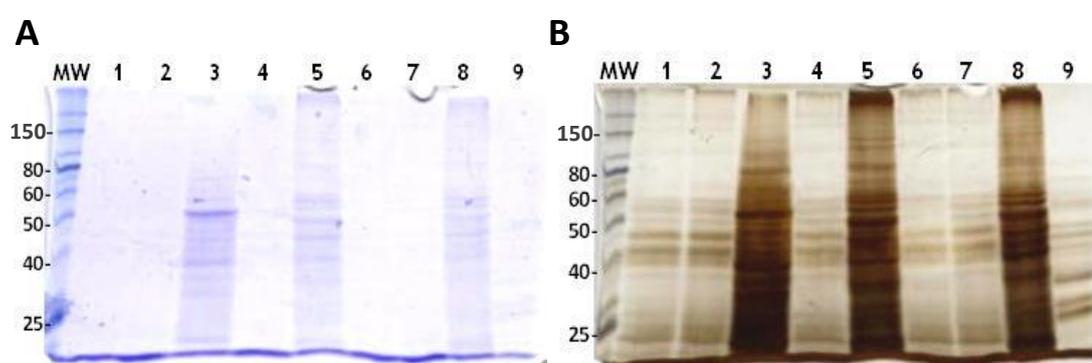
Cepas	Concentración proteica (mg/ml)
Btk	3,76
Bti	5,23
A1	6,93
A2	4,13
A3	5,25
A4	2,73
A5	3,36
Bc	3,77
Bs	3,99

Se observaron diferencias significativas en las concentraciones obtenidas para cada aislado.

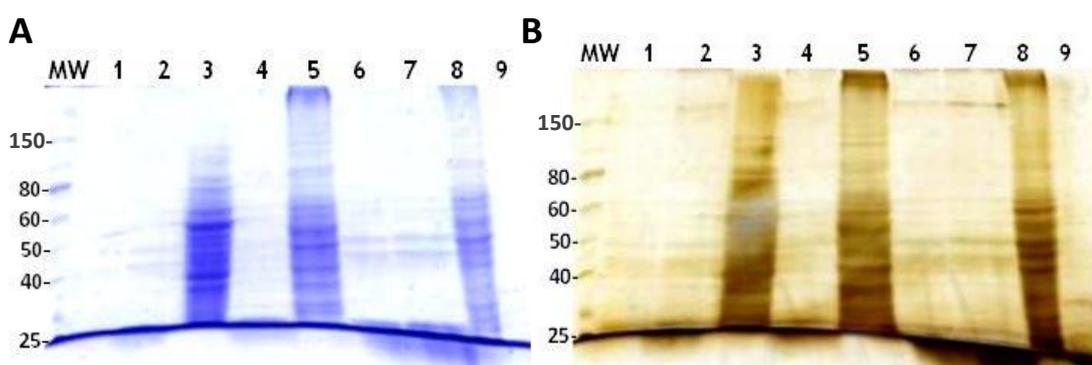
De este modo, se obtuvo el perfil proteico por SDS-PAGE para todas las cepas esporuladas (figura 7 y 8), el cual permitió la comparación de la composición de proteínas solubles.

Los geles fueron revelados con una tinción con Coomassie R-250 (Varghese y Diwan, 1983), pero debido a que las bandas obtenidas no resultaron suficientemente intensas (figura 7.A y 8.A), se procedió a revelar mediante tinción con plata (figura 7.B y 8.B). En esta tinción, las proteínas son detectadas por la reducción diferencial de los iones plata que se unen a las cadenas laterales de sus aminoácidos, siendo 50 veces más sensible que la tinción con Coomassie (Kérenyi y Gallyas, 1972).

El análisis electroforético demostró que algunas de las muestras estaban en tan baja concentración que la tinción con plata fue incapaz de mostrar el patrón proteico de los mismos (**figura 7.B**). Estas muestras corresponderían a las fracciones proteicas más diluidas (**tabla 5**). Por lo tanto, se procedió a concentrarlas en unidades de filtro para centrífuga, con un corte de membrana de 3 KDa, para finalmente correrlas en un gel y teñirlas (**figura 8**).



**Figura 7. SDS-PAGE (10%) Análisis de proteínas solubles.** (A) y (B) gel teñido con Coomassie R-250 y con plata respectivamente. Carriles: (MW) marcador de peso molecular en kilo daltons (KDa), (1) Bc, (2) Btk, (3) A1, (4) A2, (5) A3, (6) A4, (7) A5, (8) Bti y (9) Bs.



**Figura 8. SDS-PAGE (10%) Análisis de proteínas solubles concentradas.** (A) y (B) gel teñido con Coomassie R-250 y con plata respectivamente. Carriles: (MW) marcador de peso molecular en KDa, (1) Bc, (2) Btk, (3) A1, (4) A2, (5) A3, (6) A4, (7) A5, (8) Bti y (9) Bs.

Se pudo apreciar que la tinción con plata ofreció una mejor detección de las bandas que la tinción con Coomassie.

Es evidente que con el protocolo empleado para el aislamiento de proteínas solubles se obtienen muestras con diferente concentración proteica.

Esto podría responder a un estadio diferente en el proceso de esporulación o a diferencias de la muestra de partida en términos de cantidad de células.

Se comparó el perfil obtenido para las referencias con los de los aislados en la **figura 7**.

A2, A4 y A5 presentan un perfil similar a Btk, con bandas principalmente entre los 40 y 60 KDa.

En comparación a la referencia Bti, el único aislado que mostró un perfil de proteínas semejante fue A3. Las bandas mayoritarias se observaron entre los 35 y los 60 KDa.

A1 presentó un perfil diferente en comparación al resto de los aislados, con una banda mayoritaria a la altura de los 50 KDa. El control negativo Bs se presentó distinto al resto de las cepas, como era lo esperado, con tres bandas intensas por debajo de los 30 KDa.

Resultados reportados basados en un protocolo similar al ensayado, describen una banda mayoritaria cercana a los 65 KDa para Btk y dos bandas intensas para Bti de 30 y 65 KDa (Yilmaz *et al.*, 2012). Esto no fue posible observarlo con la misma intensidad en el gel obtenido en este trabajo, ya sea porque se degradaron las proteínas o porque la extracción se hizo en distintas etapas del crecimiento bacteriano.

En nuestro trabajo los geles obtenidos tienen un patrón de bandas muy intenso para Btk y Bti en el rango comprendido entre los 35 y los 60 KDa no descrito en el trabajo reportado por Yilmaz *et al.* (2012), lo que sugiere que, pequeños cambios en el protocolo de aislamiento de las proteínas, pueden alterar el resultado.

En base a la semejanza observada entre Bc y Btk, donde la única diferencia relevante entre ambas especies es la presencia de cuerpos cristalinos paraesporales en Bt anteriormente descritos, podemos decir que, los resultados obtenidos sugieren que el método molecular de caracterización proteica ensayado no permite diferenciarlas.

Evidentemente, la similitud entre estos dos perfiles determina que es necesario realizar antes la observación al microscopio de los cristales de las cepas potenciales Bt, para luego complementarla con un análisis del perfil de proteínas solubles, el cual servirá como guía en la elección de los próximos experimentos para continuar con la caracterización de Bt.

Podemos inferir que la técnica ensayada no es concluyente para ser usada en la identificación de especies de Bt.

#### ***Análisis de genes cry 4 y 11 por PCR***

Se realizó un análisis de genes *cry* de las cepas y controles con el objetivo de determinar la presencia o ausencia del gen *cry* con primers dirigidos a

determinadas secuencias elegidas que se encuentran conservadas en estos genes.

## PCR

Los genes *cry* se encuentran contenidos en el ADN plasmídico, son característicos de Bt y codifican para las proteínas Cry que presentan actividad insecticida. Para continuar con la caracterización de las cepas a nivel molecular se realizó un análisis basado en estos genes.

Con el propósito de corroborar que el ADN extraído sea amplificable, para el posterior análisis de genes *cry*, se amplificaron genes que codifican para el gen de ARNr 16S con los primers Eub27 F y U149 2R, diseñados para hibridar con regiones conservadas del gen con un producto estimado de 1500 pb (Eden *et al.*, 1991).

Por otra parte, se utilizaron dos pares de primers universales para dos clases de genes *cry*, Un-*cry4* y Un-*cry11* (Ben-Dov *et al.*, 1997; Ibarra *et al.*, 2003). Son primers dirigidos a secuencias conservadas y amplifican algunos miembros de una clase sin diferenciar subgrupos. Para el caso del conjunto de primers Un- *cry4* se espera un producto de aproximadamente 439 pb y para Un- *cry11* de entre 342 a 352 pb.

Para la extracción de ADN, con el propósito de encontrar el método más adecuado para las reacciones de PCR de genes *cry*, se ensayaron dos técnicas diferentes. Primero se realizó la extracción de ADN plasmídico a partir de un kit comercial QIAGEN y segundo se aplicó otra técnica conocida como colony

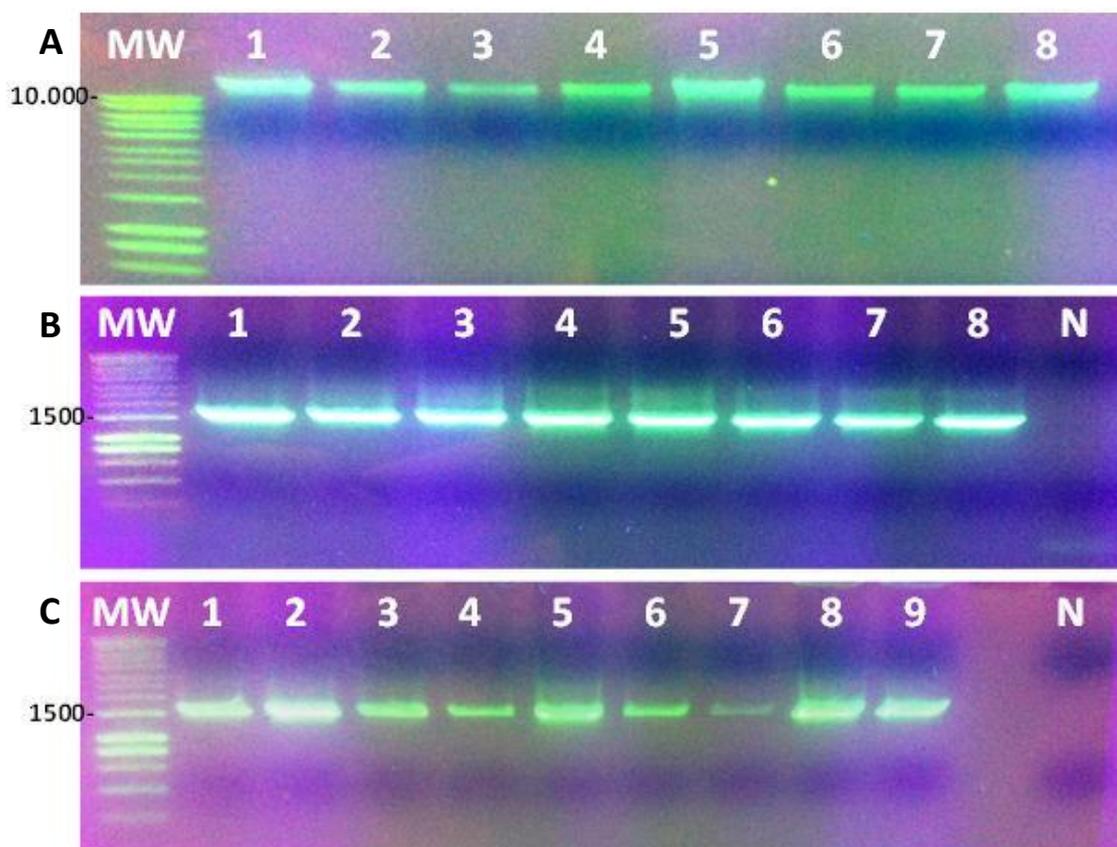
PCR. En particular la inclusión del método de colony PCR responde a que es una técnica fácil y rápida, ya que permite trabajar con varias muestras a la vez, directamente a partir de la colonia, disminuyendo así la probabilidad de cometer errores durante la manipulación.

A continuación, se amplificó mediante PCR el ADN extraído a través de distintas técnicas utilizadas ya mencionadas.

Los controles positivos Bti y Btk presentan los genes *cry4* y *cry11* (Bti); y *cry1*, *cry2* y *cry9* (Btk) (Ibarra *et al.*, 2003; Jouzani *et al.*, 2008).

Al verificar la extracción de ADN realizada con el kit por electroforesis en gel de agarosa, se observó que la misma fue exitosa para las cepas y los controles (**figura 9. A**). El total de ADN extraído resultó con bandas por encima de las 10.000 pb para todas las muestras, confirmando así la presencia de ADN. El ADN obtenido a partir de la colonia (colony PCR) se utiliza directamente para la PCR.

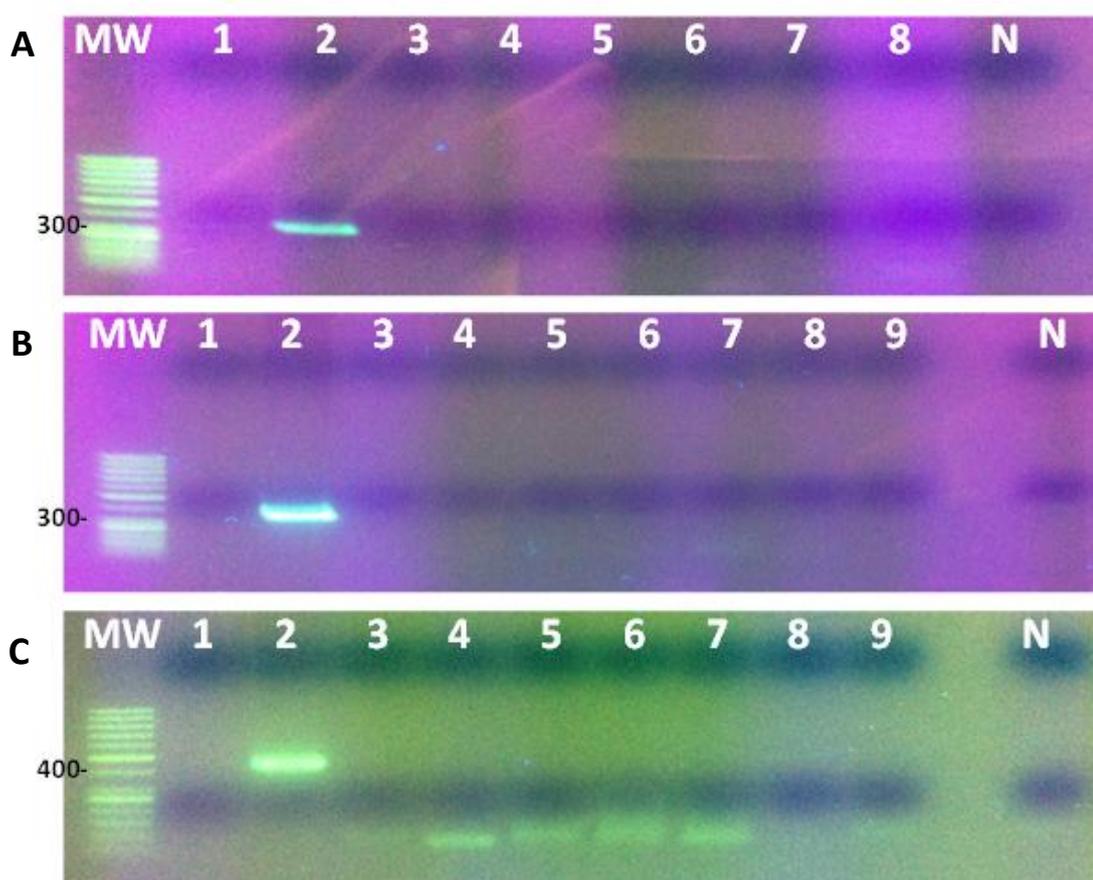
Al realizar la amplificación del gen de ARNr 16S se obtuvo un producto de amplificación del tamaño esperado para el ADN obtenido por ambos métodos para todas las cepas. Esto indica que el ADN obtenido por ambos protocolos es amplificable (**figura 9.B y C**).



**Figura 9.** Visualización mediante electroforesis en gel de agarosa de la extracción y productos de PCR de genes que codifican para el gen de ARNr 16S. (A) Extracción de ADN, (B) PCR del gen del ARNr 16S a partir del Kit de extracción, (C) PCR del gen del ARNr 16S por colony PCR. Carriles: (MW) marcador de peso molecular en pares de base (pb), (1) Btk, (2) Bti, (3) A1, (4) A2, (5) A3, (6) A4, (7) A5, (8) Bs, (9) Bc, (N) control negativo de la PCR.

Los productos de PCR obtenidos a partir de ADN extraído con el kit presentaron concentraciones similares (**figura 9.A**), mientras que los productos de la colony PCR presentan mayor variabilidad en la concentración (**figura 9.B**). Para este último método, los aislados A2, A4 y A5 presentaron bandas de menor intensidad en relación al resto de las cepas, lo cual sugiere que se obtuvo menor cantidad de ADN inicialmente.

La amplificación de genes *cry4* y *cry11* se realizó con ADN obtenido por ambos métodos de extracción. En la **figura 10** se muestran los resultados de las amplificaciones con ADN extraído del kit y la colony PCR.



**Figura 10.** Electroforesis de los productos amplificados por PCR de los genes *cry*. (A) *cry11* a partir de la extracción con el kit, (B) y (C) *cry11* y *cry4* respectivamente obtenidos por colony PCR. Carriles: (MW) marcador de peso molecular en pb, (1) Btk, (2) Bti, (3) A1, (4) A2, (5) A3, (6) A4, (7) A5, (8) Bs, (9) Bc, (N) control negativo de la PCR.

Se observaron diferencias en las amplificaciones a partir de los diferentes métodos. Para Bti, utilizando el ADN extraído con el kit, se logró amplificar el gen *cry11* (**figura 10. A**), con una banda de 350 pb pero no el gen *cry4* (data

not shown). Sin embargo, utilizando colony PCR, se lograron amplificar ambos genes para Bti con un amplicón de aproximadamente 350 pb para *cry11* (figura 10. B) y otro amplicón de 430 pb para el gen *cry4* (figura 10. C).

El control Btk no presentó amplificación de los genes *cry 4* y *11* como era de esperar. Las cepas estudiadas tampoco presentaron amplificación de los genes *cry 4* y *11*.

Los resultados sugieren que el protocolo utilizado para extraer ADN es relevante para la posterior detección de genes *cry* con la técnica de PCR. La no amplificación utilizando ADN del kit podría deberse a pérdidas de ADN plasmídico durante la extracción.

### Discusión general

Dada la cantidad de análisis y pruebas realizadas en este trabajo, se consideró de utilidad hacer un resumen de todos los resultados obtenidos para las cepas y controles (tabla 6).

Dentro de la caracterización fenotípica, todas las cepas resultaron positivas a excepción de A1, que resultó negativa para el ensayo de hidrólisis de almidón. Es a nivel de los resultados obtenidos en la caracterización molecular, donde se observaron la mayor cantidad de diferencias. Btk, Bc, A2, A4 y A5 comparten los mismos resultados, mientras que Bti y A3 también resultaron iguales en todas las pruebas a excepción de que Bti fue la única cepa positiva para *cry4* y *cry11*.

Por otro lado, A1 y Bs se destacaron del resto por tener un perfil de proteínas totalmente diferente.

Tabla 6: Resumen comparativo de los análisis y pruebas realizadas para la caracterización fenotípica y molecular de todas las cepas y controles.

	Caracterización fenotípica				Caracterización molecular			
	Gram	Catalasa	Almidón	Acetato	Proteínas (KDa) <sup>a</sup>	16S	<i>cry4</i>	<i>cry 11</i>
Btk	+	+	+	+	40 - 60	+	-	-
Bti	+	+	+	+	35 - 60	+	+	+
A1	+	+	-	+	50	+	-	-
A2	+	+	+	+	40 - 60	+	-	-
A3	+	+	+	+	35 - 60	+	-	-
A4	+	+	+	+	40 - 60	+	-	-
A5	+	+	+	+	40 - 60	+	-	-
Bc	+	+	+	+	40 - 60	+	-	-
Bs	+	+	+	+	30	+	-	-

<sup>a</sup> Rango de bandas mayoritarias.

Finalmente, dado que ninguna de las cepas estudiadas presentó los genes *cry* estudiados, se sugiere que podrían estar expresando otros genes *cry* distintos a los seleccionados o que ninguno de ellos pertenece a la especie Bt.

La caracterización de cepas candidatas a Bt, fue de gran utilidad para la empresa con la cual se trabajó en conjunto, ya que de esta manera, se logró discriminar dentro del trabajo realizado qué técnicas serán más útiles para caracterizar futuras cepas potenciales Bt. El presente trabajo fue una aproximación a la caracterización e identificación de asilamientos autóctonos. El mismo aportó herramientas para el desarrollo en un futuro de métodos

rápidos y sencillos para discriminar cepas pertenecientes a otras especies de *Bacillus*.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró aplicar herramientas de caracterización fenotípica y molecular que permitieron una primera aproximación en la selección de cepas candidatas a Bt.

A partir de la caracterización fenotípica se determinó que cuatro de los aislados analizados presentaron características coincidentes con Bt mientras que una de las cepas (A1) presentó características diferentes sugiriendo que dicha cepa no pertenece a la especie Bt.

Se logró determinar los tiempos de esporulación de las diferentes cepas en dos medios de cultivo. Además, se logró demostrar que el método de inhibición de la esporulación por acetato que habitualmente se utiliza para el aislamiento de Bt, no resulta útil para realizar una caracterización de cepas potenciales Bt.

El estudio de los perfiles proteicos en geles de poliacrilamida reveló que tres cepas (A2, A4 y A5) presentaron perfiles similares al control positivo Btk. El perfil de A3 fue semejante a la referencia Bti y A1 presentó un perfil único.

Se testearon dos métodos diferentes de purificación de ADN y se logró amplificar los genes *cry* estudiados con ADN extraído mediante colony PCR.

Los resultados obtenidos de la amplificación por PCR de los genes *cry* seleccionados mostraron que éstos no están presentes en los aislados. Esto

indicaría que las cepas estudiadas podrían presentar otros genes *cry* distintos o que las cepas aisladas no pertenecen a la especie Bt.

Con los métodos utilizados podemos sugerir que A1 no pertenece a Bt. Para el resto de los aislamientos, se deberían realizar estudios complementarios como la observación de las estructuras cristalinas utilizando un microscopio de contraste de fases, análisis por PCR de otros genes *cry* y estudio del perfil de plásmidos.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1- Ammouneh, H., M. Harba, E. Idris, H. Makee (2011) Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Syrian and testing of their insecticidal activities against some insect pests. Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 35(4): 421 - 431.
- 2- Baumann L., K. Okamoto, B.M. Unterman, M.J. Lynch, P. Baumann (1984). Phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus*. J. Invertebr. Pathol. 44: 329-341
- 3- Ben-Dov, E., A. Zaritsky, E. Dahan, Z. Barak, R. Sinai, R. Manasherob, A. Khamraev, E. Troitskaya, A. Dubitsk, N. Berezina, Y. Margalith (1997) Extended screening by PCR for seven *cry* - group genes from field - collected strains of *Bacillus thuringiensis*. App. Environ. Microbiol. 63(2): 4883 - 4890.
- 4- Blackburn, M.B., P.A. Martin, D. Kuhar, R.R. Farrar, D.E. Gundersen-Rindal (2013) Phylogenetic distribution of phenotypic traits in *Bacillus thuringiensis* determined by multilocus sequence analysis. 8(6): 1 - 6.
- 5- Bravo, A., I. Gomez, J. Conde, C. Muñoz-Garay, J. Sánchez, R. Miranda, M. Zhuang, S.S. Gill, M. Soberón (2004) Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. Biochim. Biophys. Acta. 1667(1): 38 - 46.
- 6- Bravo, A., S. Likitvivatanavong, S.S. Gill, M. Soberón (2011) *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. Insect. Biochem. Mol. Biol. 41(7): 423 - 431.
- 7- Brown, A.E. (2008) *Benson's microbiological application. Laboratory manual in general microbiology*. 11a. ed. New York, The McGraw-Hill Companies.
- 8- Bulla, L.A., D.B. Bechtel, K.J. Kramer, Y.I. Shethna, A.I. Aronson, P.C. Fitz-James (1980) Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. Ceit. Rev. Microbiol. 8(2): 147 - 204.
- 9- Ceron, J., L. Covarrubias, R. Quintero, A. Ortiz, M. Ortiz, E. Aranda, L. Lina, A. Bravo (1994) PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. Applied and Environmental Microbiology. 60(1): 353 - 356.
- 10- Cinar, C., O. Apaydin, A.F. Yenidunya, S. Harsa, H. Gunes (2008) Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from olive-related habitats in Turkey. Journal of Applied Microbiology. 104(2): 515 - 525.

- 11- Crickmore, N., D.R. Zeigler, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, A. Bravo, D.H. Dean (2010) [http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html).
- 12- De Barjac, H. (1981) Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*. In: Microbial Control of Pests and Plant Diseases, pp. 35 - 43. London, New York: Academic Press.
- 13- De Maagd, R.A., A. Bravo, N. Crickmore (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends Genet. 17(4): 193 - 199.
- 14- Devine, G.J., M.J. Furlong (2007) Insecticide use: Contexts and ecological consequences. Agriculture and human values. 24: 281 - 306.
- 15- Eden, P.A., T.M. Schmidt, R.P. Blakemore, N.R. Pace (1991) Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction - amplified 16s rRNA - specific. International Journal of Systematic Bacteriology, 41(2): 324 - 325.
- 16- El-Bendary, M.A. (2006) *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. J. Basic Microbiol. 46(2): 158 - 170.
- 17- Frankenhuysen, K.V. (2009) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. Journal of Invertebrate Pathology. 101(1): 1 - 16.
- 18- Gikkis, A., V. Dupres, G. Delestrait, J. Mahillon, Y.F. Dufrêne (2012) Nanoscale imaging of *Bacillus thuringiensis* flagella using atomic force microscopy. Nanoscale. 4(5): 1585 - 1591
- 19- Griko, N.B., L. Rose-Young, X. Zhang, L. Carpenter, M. Candas, M.A. Ibrahim, M. Junker, L.A. Bulla (2007) Univalent binding of the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* to a conserved structural motif in the cadherin receptor BT-R1. Biochemistry. 46(35): 10001 - 10007.
- 20- Heimpel, A.M., T.A. Angus (1958) The taxonomy of insect pathogens related to *Bacillus cereus* Frankland and Frankland. Can. J. Microbiol 4(5): 531-541
- 21- Helgason, E., O.A. Okstad, D.A. Caugant, H.A. Johansen, A. Fouet, M. Mock, I. Hegna, A.B. Kolsto (2000) *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* - One species in the basis of genetic evidence. App. Environ. Microbiol. 66(6): 2627 - 2630.

- 22- Hensyl, W.R., L.E Forlifer, L. Wrzosek, W.E. Rosenberger, B.J. Felton (1994) Bergey's manual of determinative bacteriology. 9a ed. Baltimore, The Williams & Wilkins Co.
- 23- Ibarra, E.J., M.C. del Rincón, S. Ordúz, D. Noriega, G. Benintende, R. Monnerat, L. Regis, C.M.F de Oliveira, H. Lanz, M.H. Rodriguez, J, Sánchez, G. Peña, A. Bravo (2003) Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. Applied and Environmental Microbiology 69(9): 5269 - 5274.
- 24- Ibrahim, M.A., N. Griko, J. Matthew, L.A. Bulla (2010) *Bacillus thuringiensis*. A genomics and proteomics perspective. Bioeng. Bugs. 1(1): 31 - 50.
- 25- Jara, S., P. Maduell, S. Orduz (2006) Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains in the maize and bean phylloplane and their respective soils in Colombia. Journal of Applied Microbiology. 101: 117 - 124.
- 26- Jouzani, G.S., A.P. Abad, A. Seifinejad, K. Kariman (2008) Distribution and diversity of Dipteran-specific *cry* and *cyt* genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. J Ind Microbiol Biotechnol. 35(2): 83 - 94.
- 27- Katara, J., R. Deshmukh, N.K. Singh, S. Kaur (2012) Molecular typing of native *Bacillus thuringiensis* isolates from diverse habitats in india using REP-PCR and ERIC-PCR analysys. J. Gen. Appl. Microbiol. 58(2): 83 - 94.
- 28- Kérynyi, L., F. Gallyas (1972) A highly sensitive method for demonstrating proteins in electrophoretic, immunoelectrophoretic and immunodiffusion preparations. Clin. Chim. Acta. 38(2): 465 - 466.
- 29- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227(5259): 680 - 685.
- 30- Lecadet, M.M, E. Frachon, V.C. Dumanori, H.Ripouteau, S. Hamon, P. Laurent, I. Thiéry (1999) Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. Journal of App. Microbiol. 86(4): 660 - 672.
- 31- Lechner, S., R. Mayr, K.P. Francis, B.M. Prüss, E. Wiessner-Gunkel, G.S. Stewart, S. Scherer (1998) *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. Int. J. Sys. Bacteriol. 4: 1373 - 1382.
- 32- Lowry, O.H, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry. 193(1): 265 - 275.

- 33- Maughan, H., G. Van der Auwera (2011) *Bacillus* taxonomy in the genomic era phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution*. 11(5): 789 - 797.
- 34- Nakamura, L.K. (1998) *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 3: 1031 - 1015.
- 35- Ohba, M. (1996) Identification of flagellar (H) antigenic subfactors in *Bacillus thuringiensis* H serotypes 10, 18 and 24 isolated in Japan. *Lett. Appl. Microbiol.* 23(5): 287 - 289.
- 36- Park, S.H., H.J. Kim, J.H. Kim, T.W. Kim, H.Y. Kim (2007) Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17(7): 1177 - 1182.
- 37- Patel, K.D, F.C. Bhanshali, A.V. Chaudhary, S.S. Ingle (2013) A new enrichment method for isolation of *Bacillus thuringiensis* from diverse sample types. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 170(1): 58 - 66.
- 38- Reyes, A., J. E. Ibarra (2008) Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* type strains. *App. Environ. Microbiol.* 74(1): 125 - 129
- 39- Saiki, R.K., D.H. Gelfand , S. Stoffel , S.J. Scharf, R. Higuchi , G.T. Horn , K.B. Mullis (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (4839): 487 - 491.
- 40- Sanahuja, G., R. Banakar, R.M. Twyman, T. Capell, P. Christou (2011) *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol. J.* 9(3): 283 - 300.
- 41- Sansinenea, E., C. Vázquez (2010) Genetic manipulation in *Bacillus thuringiensis* for strain improvement. *Biotechnol. Lett.* 32: 1549 -1557.
- 42- Santana, M.A., V.C. Moccia, A.E. Gillis (2008) *Bacillus thuringiensis* improved isolation methodology from soil samples. *J. Microbiol. Methods.* 75(2): 357 - 358.
- 43- Sauka, D.H., G.B Benintende (2008) *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología.* 40(2): 124 - 140.
- 44- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler, D.H. Dean (1998) *Bcillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3): 775 - 806.
- 45- Sneath, P.H.A. (1986). Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 1104 - 1139. Edited by P.

H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore:Williams & Wilkins.

46- Stern, V.M. (1959) The integration of chemical and biological control spotted alfalfa aphid. *Hilgardia*. 29(2): 81 - 101.

47- Tourasse, N.J., E. Helgason, O.A. Okstad, I.K Hegna, A.B. Kolsto (2006) The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics.*J. Appl. Microbiol.* 101(3): 579 - 593.

48- Travers, R.S., P.A. Martin, C.F. Reichelderfer (1987) Selective process for efficient isolation of *Bacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 53(6): 1263 - 1266.

49- Varghese, G., A.M. Diwan (1983) Simultaneous staining of proteins during polyacrylamide gel electrophoresis in acidic gels by counter migration of Coomassie brilliant blue R-250. *Anal. Biochem.* 132(2): 481 - 483.

50- Wallace, R.B., J. Shaffer, R.F. Murphy, J. Bonner, T. Hirose, K. Itakura (1979) Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch.*Nucleic Acids Res.* 6(11): 3543 - 3557.

51- Whalon, M.E., B.A. Wingerd (2003) Bt: Mode of action and use. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 54(4): 200 - 211.

52- Xue, J., G. Liang, N. Crickmore, H. Li, K. He, F. Song, X. Feng, D. Huang, J. Zhang (2008) Cloning and characterization of a novel Cry1A toxin from *Bacillus thuringiensis* with high toxicity to the Asian corn borer and other lepidopteran insects. *FEMS microbiol. Lett.* 280(1): 95 - 101.

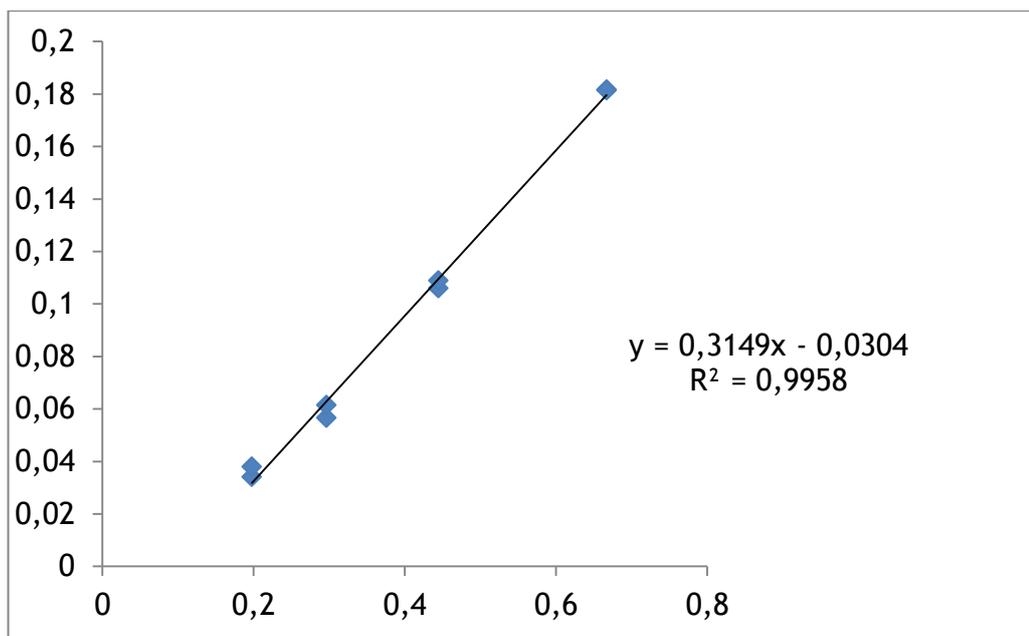
53- Yilmaz, S., A. Ayvaz, M. Akbulut, U. Azizoglu, S. Karabörklü (2012) A novel *Bacillus thuringiensis* strain and its pathogenicity against three important pest insects. *Journal of Stored Products Research*. 51: 33 - 40

54- Zhang, X., M. Candas, N.B. Griko, R. Taussiq, L.A. Bulla (2006) A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103(26): 9897 - 9902.

## ANEXO I

**Curva de calibración con BSA.**

Concentración de proteína	Absorbancia
1,0000	0,3078
1,0000	0,3257
0,6667	0,1816
0,6667	0,1814
0,4444	0,1060
0,4444	0,1089
0,2963	0,0566
0,2963	0,0614
0,1975	0,0340
0,1975	0,0379



***Protocolo de extracción de ADN plasmídico con el kit DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN)***

Se partió de cultivos frescos en 3 ml de LB, los cuales se transfirieron a un falcon de 15 ml y se centrifugaron a 5.000 g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante.

El pellet obtenido para cada cepa, se resuspendió en 180 µl de buffer de lisis (Tris -Cl 20 mM, EDTA 2 mM, 1,2% Tritón® X-100, 20 mg/ml de lisozima, pH= 8,0) enzimática y se incubó en estufa a 37° por 30 minutos. Pasado este tiempo, se adicionaron 25 µl de proteinasa K y 200 µl de buffer AL, evitando así la degradación del ADN por efecto de las nucleasas. Se traspasó el contenido a eppendorfs de 1,5 ml y se realizó una segunda incubación en termobloque, a 56° C por 30 minutos.

Para precipitar el ADN se agregaron 200 µl de etanol 95%. La mezcla se colocó en columnas especiales para centrífuga y se prosiguió con una centrifugación a 6.000 g de 1 minuto. A partir de la misma columna se realizaron dos lavados con centrifugaciones sucesivas a 6.000 g durante 1 minuto, primero adicionando 500 µl de buffer AW1 y luego AW2, descartando el contenido del tubo colector entre lavados.

Finalmente, la columna fue colocada en un nuevo tubo colector, agregando 200 µl de buffer AE directamente en la membrana, con el propósito de eluir el ADN. Se realizó una última centrifugación a 6.000g por 1 minuto y el eluído se almacenó a -4 °C en eppendorfs de 0,5 ml.

**Resultados obtenidos a partir del seguimiento de cultivos.**

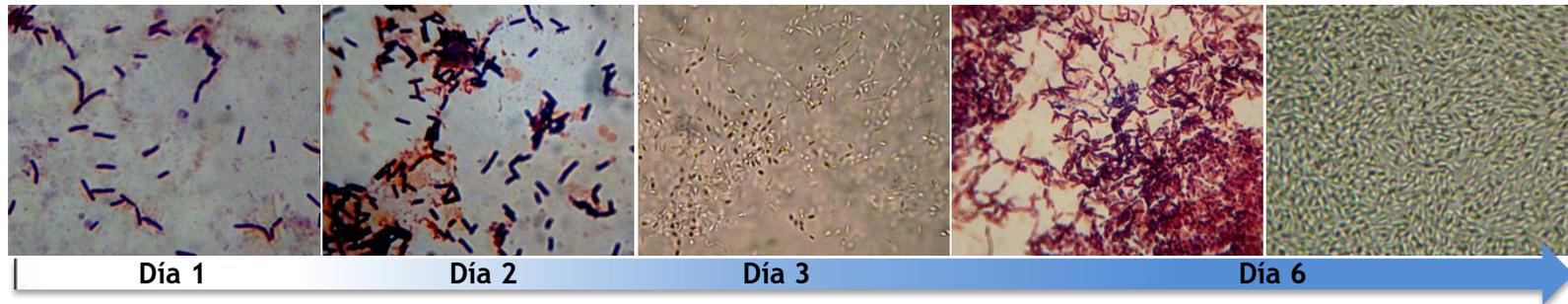
A continuación se desplegarán las tablas y figuras obtenidas a partir del estudio de los tiempos de esporulación para las cepas y controles en los medios LB y T3.

**Cepa Btk**

*Tabla\_ Medio LB*

HRS.	DÍAS	TAMAÑO		ESPORAS		CADENAS		MOVILIDAD		GRAM		DESCRIPCIÓN
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	
20	1	Mediano	Mediano	No	No	No	No	Sí	Sí	Positivo	Positivo	Bastones finos, ~30 células
48	2	Mediano	Mediano	No	No	No	No	Sí	Sí	Positivo	Positivo	Movilidad celular, ~100 cél.
72	3	Mediano	Mediano	No	Sí	No	No	Sí	No	Positivo	Positivo	Primeras esporas, ~100 cél
144	6	Mediano	Mediano	Sí	Sí	No	No	No	No	Positivo	Positivo	Todo esporulado

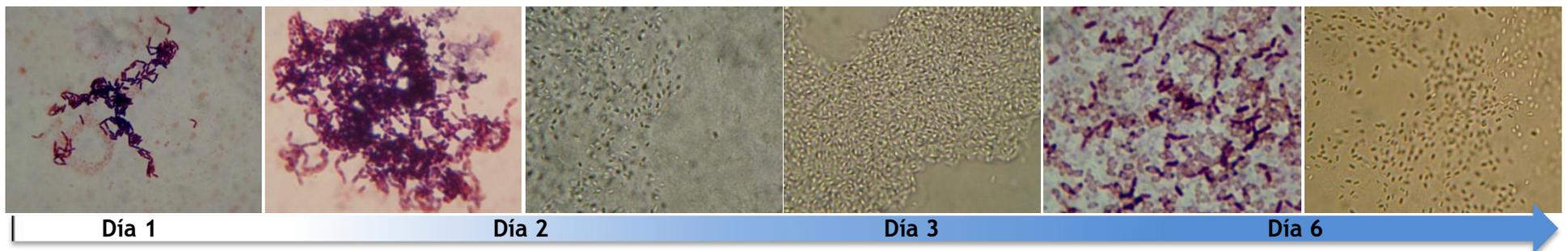
Figura\_Medio LB



Tabla\_Medio T3

HRS.	DÍAS	TAMAÑO		ESPORAS		CADENAS		MOVILIDAD		GRAM		DESCRIPCIÓN
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	
20	1	Mediano	Mediano	No	No	No	No	Sí	No	Positivo	Positivo	~10 células
48	2	Mediano	Mediano	Sí	Sí	No	No	Sí	No	Positivo	Positivo	Primeras esporas, ~100 cél
72	3	Mediano	Mediano	Sí	Sí	No	No	Sí	No	Positivo	Positivo	Todo esporulado
144	6	Mediano	Mediano	Sí	Sí	No	No	No	No	Positivo	Positivo	Esporas libres

Figura\_Medio T3

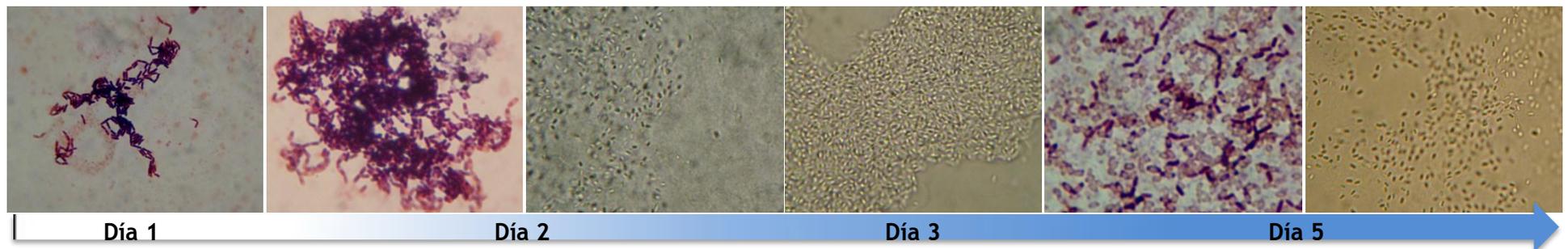


## Cepa Bti

Tabla\_ Medio LB

HRS.	DÍAS	TAMAÑO		ESPORAS		CADENAS		MOVILIDAD		GRAM		DESCRIPCIÓN
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	
20	1	Mediano	Mediano	No	No	No	No	Sí	Sí	Positivo	Positivo	Gruesos, ~ 10 cél. , presencia de pecas
42	2	Mediano	Mediano	Sí	No	No	No	Sí	No	Positivo	Positivo	Primeras esporas, ~100 cel., pecas
66	3	Mediano	Mediano	Sí	No	No	No	No	No	Positivo	Positivo	~100 cel., más esporas
144	6	Mediano	Mediano	Sí	Sí	No	No	No	No	Positivo	Positivo	Todo esporulado

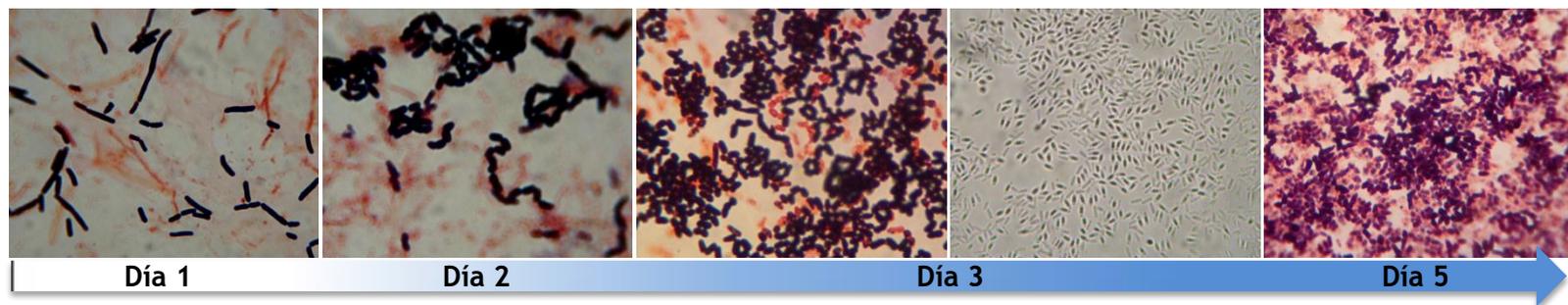
Figura\_ Medio LB



Tabla\_Medio T3

HRS.	DÍAS	TAMAÑO		ESPORAS		CADENAS		MOVILIDAD		GRAM		DESCRIPCIÓN
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	
20	1	Mediano	Mediano	No	No	No	No	No	No	Positivo	Positivo	Grosos, ~ 10 cél., presencia de pecas
48	2	Mediano	Mediano	No	No	No	No	No	No	Positivo	Positivo	Pecas más marcadas, ~ 30 cel, Agregamiento celular
72	3	Mediano	Mediano	Sí	Sí	No	No	No	No	Positivo	Positivo	Todo esporulado
144	6	Mediano	Mediano	Sí	Sí	No	No	No	No	Positivo	Positivo	Esporas libres

Figura\_Medio T3



## Cepa A1

Tabla\_ Medio LB

HRS.	DÍAS	TAMAÑO		ESPORAS		CADENAS		MOVILIDAD		GRAM		DESCRIPCIÓN
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	
20	1	Mediano	Mediano	No	No	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	Bastones largos y finos, ~10
48	2	Mediano	Mediano	No	No	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	~50 cél.
72	3	Mediano	Mediano	No	No	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	Presencia de pecas
144	6	Mediano	Mediano	No	No	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	Pecas más marcadas
168	7	Mediano	Mediano	No	No	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	Encogen
192	8	Mediano	Mediano	No	No	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	-
216	9	Mediano	Mediano	No	No	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	-
240	10	Mediano	Mediano	No	No	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	-
312	13	Mediano	Mediano	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	Todo esporulado

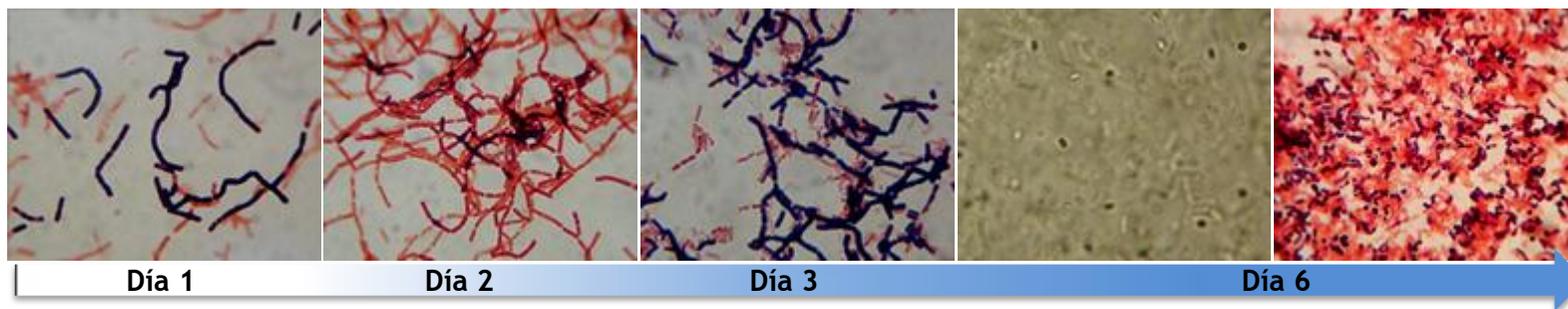
Figura\_ Medio LB



Tabla\_Medio T3

HRS.	DÍAS	TAMAÑO		ESPORAS		CADENAS		MOVILIDAD		GRAM		DESCRIPCIÓN
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	
20	1	Mediano	Mediano	No	No	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	Bastones largos y finos, ~10 cél., encojió
48	2	Mediano	Mediano	No	No	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	Agregamiento celular, presencia de pecas
72	3	Mediano	Mediano	No	No	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	Primeras esporas
144	6	Mediano	Mediano	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	Todo esporulado

Figura\_Medio T3

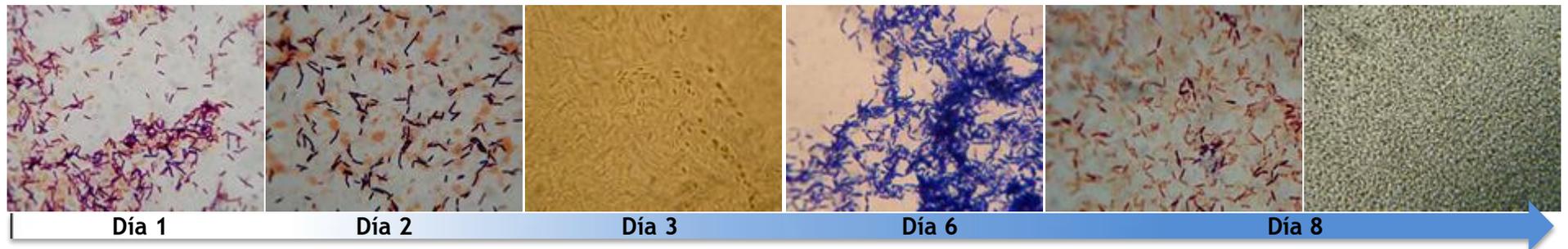


**Cepa A2**

*Tabla\_ Medio LB*

HRS.	DÍAS	TAMAÑO		ESPORAS		CADENAS		MOVILIDAD		GRAM		DESCRIPCIÓN
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	
20	1	Chico	Chico	No	No	No	No	No	No	Positivo	Positivo	Batones finos, ~30 cél.
48	2	Chico	Chico	Sí	No	No	No	Sí	Sí	Positivo	Positivo	~100 cél.
72	3	Chico	Chico	Sí	No	No	No	Sí	Sí	Positivo	Positivo	Primeras esporas
144	6	Chico	Chico	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	-
168	7	Chico	Chico	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	-
192	8	Chico	Chico	Sí	Sí	No	No	No	No	Positivo	Positivo	Todo esporulado

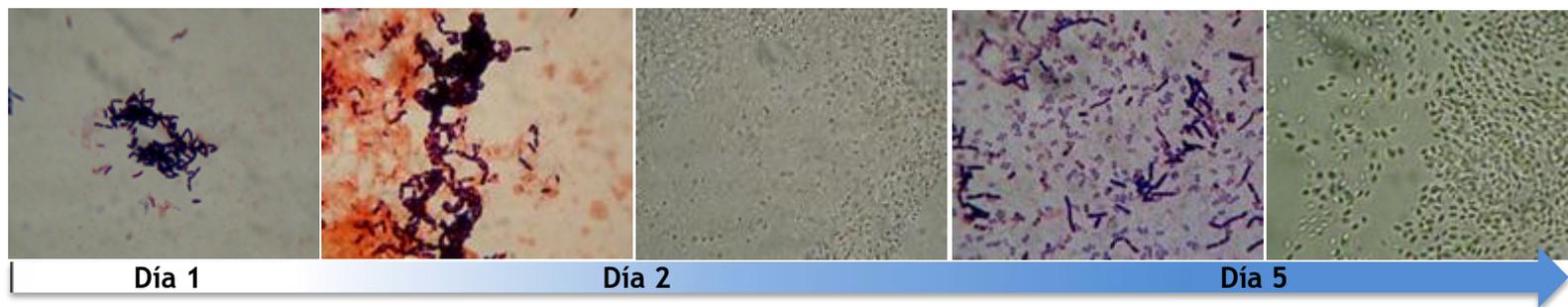
*Figura\_ Medio LB*



Tabla\_Medio T3

HRS.	DÍAS	TAMAÑO		ESPORAS		CADENAS		MOVILIDAD		GRAM		DESCRIPCIÓN
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	
20	1	Chico	Chico	No	No	No	No	Sí	Sí	Positivo	Positivo	Batones finos, ~30 cél.
48	2	Chico	Chico	Sí	Sí	No	No	Sí	Sí	Positivo	Positivo	Primeras esporas, ~100 cél.
72	3	Chico	Chico	Sí	Sí	Sí	No	No	No	Positivo	Positivo	-
144	6	Chico	Chico	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	Esporas libres

Figura\_Medio T3

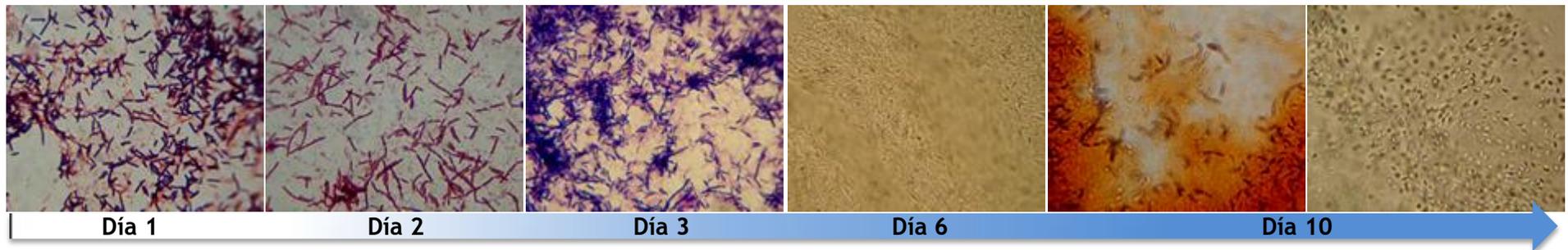


### Cepa A3

Tabla\_ Medio LB

HRS.	DÍAS	TAMAÑO		ESPORAS		CADENAS		MOVILIDAD		GRAM		DESCRIPCIÓN
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	
20	1	Chico	Chico	No	No	No	No	Sí	Sí	Positivo	Positivo	~30 cél.
48	2	Chico	Chico	No	No	No	No	Sí	Sí	Positivo	Positivo	~100 cél.
72	3	Chico	Chico	No	No	No	No	Sí	Sí	Positivo	Positivo	-
144	6	Chico	Chico	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	Primeras esporas
168	7	Chico	Chico	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	-
192	8	Chico	Chico	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	-
216	9	Chico	Chico	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	-
240	10	Chico	Chico	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	Todo esporulado

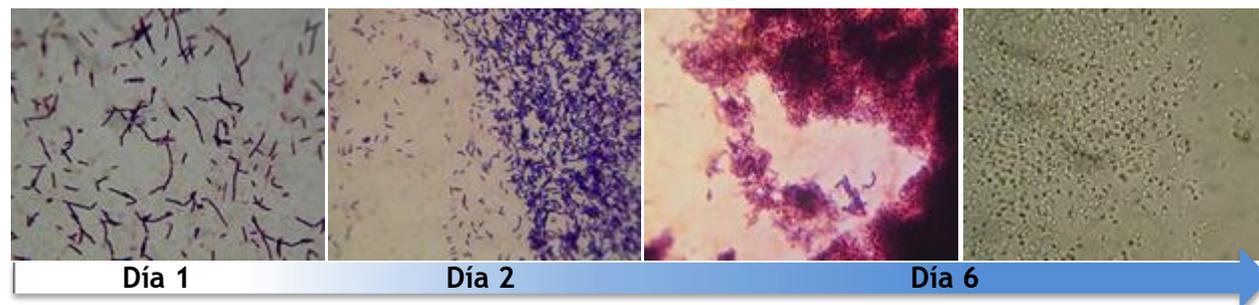
Figura\_ Medio LB



Tabla\_Medio T3

HRS.	DÍAS	TAMAÑO		ESPORAS		CADENAS		MOVILIDAD		GRAM		DESCRIPCIÓN
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	
20	1	Chico	Chico	No	No	No	No	Sí	Sí	Positivo	Positivo	~30 cél.
48	2	Chico	Chico	No	No	No	No	Sí	Sí	Positivo	Positivo	~100 cél.
72	3	Chico	Chico	No	No	No	No	Sí	Sí	Positivo	Positivo	Agregamiento celular
144	6	Chico	Chico	Sí	Sí	No	No	No	No	Positivo	Positivo	Todo esporulado

Figura\_Medio T3

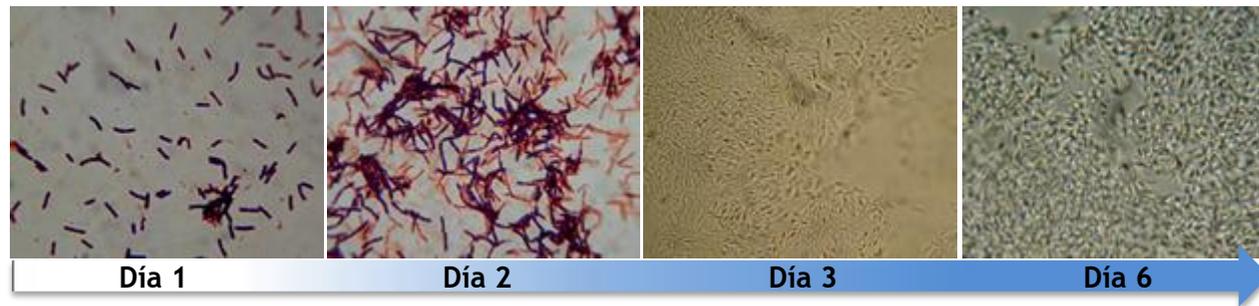


## Cepa A4

Tabla\_ Medio LB

HRS.	DÍAS	TAMAÑO		ESPORAS		CADENAS		MOVILIDAD		GRAM		DESCRIPCIÓN
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	
20	1	Mediano	Mediano	No	No	No	No	No	No	Positivo	Positivo	~30 cél.
48	2	Mediano	Mediano	No	No	No	No	Sí	Sí	Positivo	Positivo	~ 100 cél.
72	3	Mediano	Mediano	Si	No	No	No	No	No	Positivo	Positivo	Primeras esporas
144	6	Mediano	Mediano	Sí	Sí	No	No	No	No	Positivo	Positivo	Todo esporulado

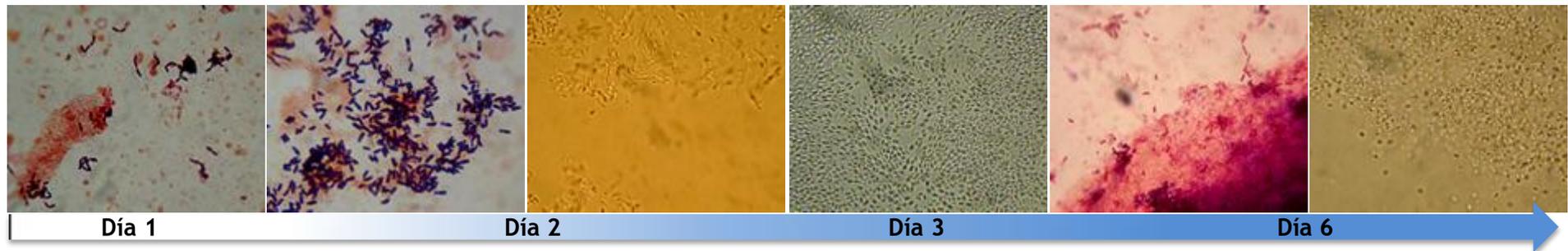
Figura\_ Medio LB



Tabla\_Medio T3

HRS.	DÍAS	TAMAÑO		ESPORAS		CADENAS		MOVILIDAD		GRAM		DESCRIPCIÓN
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	
20	1	Mediano	Mediano	No	No	No	No	No	No	Positivo	Positivo	~30 cél.
48	2	Mediano	Mediano	Sí	Sí	No	No	No	No	Positivo	Positivo	Primeras esporas
72	3	Mediano	Mediano	Sí	Sí	No	No	No	No	Positivo	Positivo	Todo esporulado
144	6	Mediano	Mediano	Sí	Sí	No	No	No	No	Positivo	Positivo	Esporas libres

Figura\_Medio T3

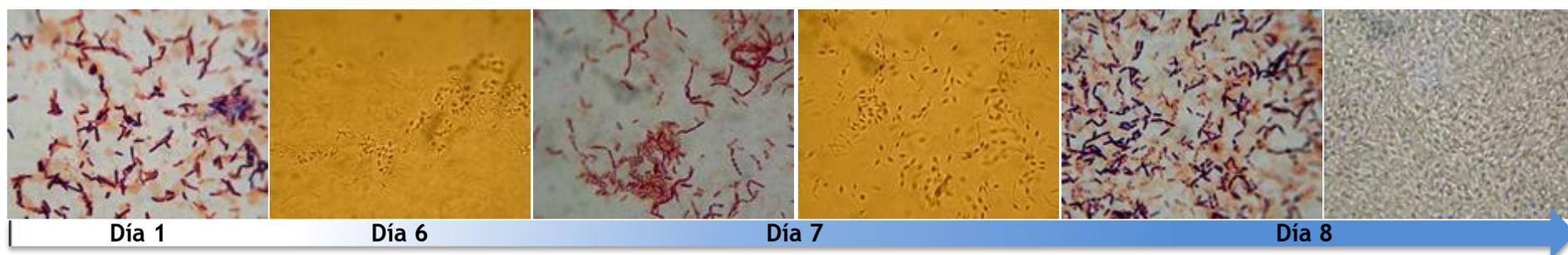


## Cepa A5

Tabla\_ Medio LB

HRS.	DÍAS	TAMAÑO		ESPORAS		CADENAS		MOVILIDAD		GRAM		DESCRIPCIÓN
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	
20	1	Mediano	Mediano	No	No	No	No	No	No	Positivo	Positivo	~100 cél
48	2	Mediano	Mediano	No	No	No	No	Sí	Sí	Positivo	Positivo	-
72	3	Mediano	Mediano	Sí	Sí	No	No	No	No	Positivo	Positivo	-
144	6	Mediano	Mediano	Sí	Sí	No	No	No	No	Positivo	Positivo	Primeras esporas
168	7	Mediano	Mediano	Sí	Sí	No	No	No	No	Positivo	Positivo	Aumento de esporas
192	8	Mediano	Mediano	Sí	Sí	No	No	No	No	Positivo	Positivo	Todo esporulado

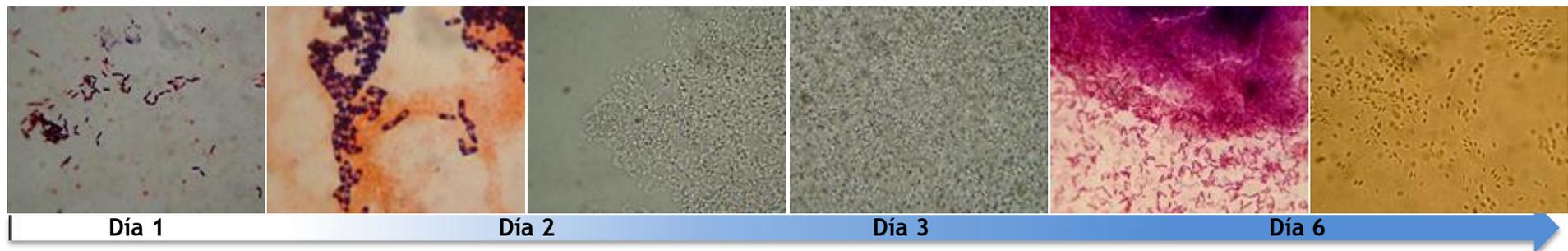
Figura\_ Medio LB



Tabla\_Medio T3

HRS.	DÍAS	TAMAÑO		ESPORAS		CADENAS		MOVILIDAD		GRAM		DESCRIPCIÓN
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	
20	1	Mediano	Mediano	No	No	No	No	No	No	Positivo	Positivo	~50 cél
48	2	Mediano	Mediano	Sí	Sí	No	No	No	No	Positivo	Positivo	Primeras esporas
72	3	Mediano	Mediano	Sí	Sí	No	No	No	No	Positivo	Positivo	Todo esporulado
144	6	Mediano	Mediano	Sí	Sí	No	No	No	No	Positivo	Positivo	Esporas Libres

Figura\_Medio T3

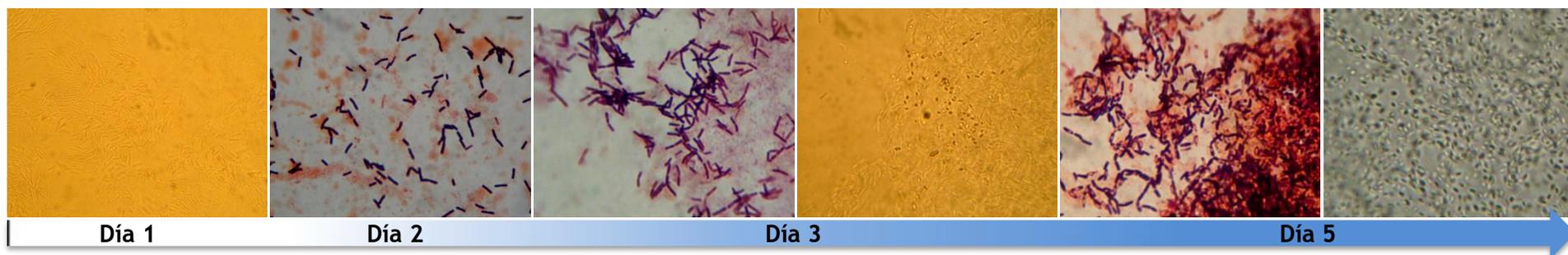


## Cepa Bc

Tabla\_ Medio LB

HRS.	DÍAS	TAMAÑO		ESPORAS		CADENAS		MOVILIDAD		GRAM		DESCRIPCIÓN
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	
20	1	Chico	Chico	No	No	No	No	No	No	Positivo	Positivo	~50 cél.
48	2	Chico	Chico	No	No	No	No	Sí	Sí	Positivo	Positivo	~50 cél.
72	3	Chico	Chico	Sí	No	No	No	Sí	Sí	Positivo	Positivo	Primeras esporas, ~100 cél.
144	6	Chico	Chico	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	Todo esporulado

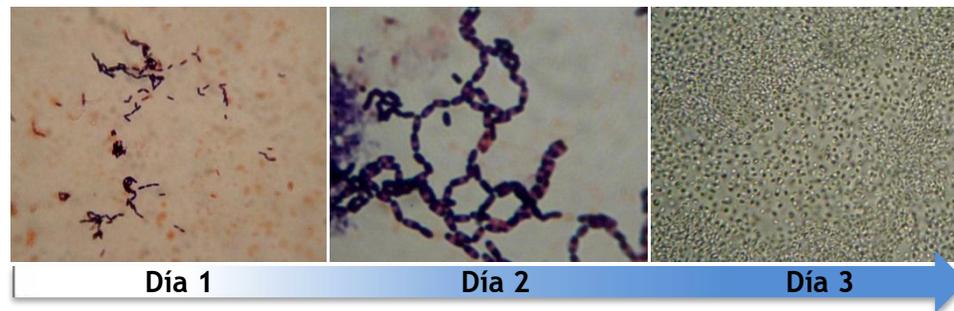
Figura\_ Medio LB



Tabla\_Medio T3

HRS.	DÍAS	TAMAÑO		ESPORAS		CADENAS		MOVILIDAD		GRAM		DESCRIPCIÓN
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	
20	1	Chico	Chico	No	No	No	No	Sí	Sí	Positivo	Positivo	~50 cél.
48	2	Chico	Chico	Sí	No	No	No	Sí	Sí	Positivo	Positivo	Primeras esporas, ~100 cél.
72	3	Chico	Chico	Sí	No	No	No	Sí	Sí	Positivo	Positivo	Todo esporulado

Figura\_Medio T3

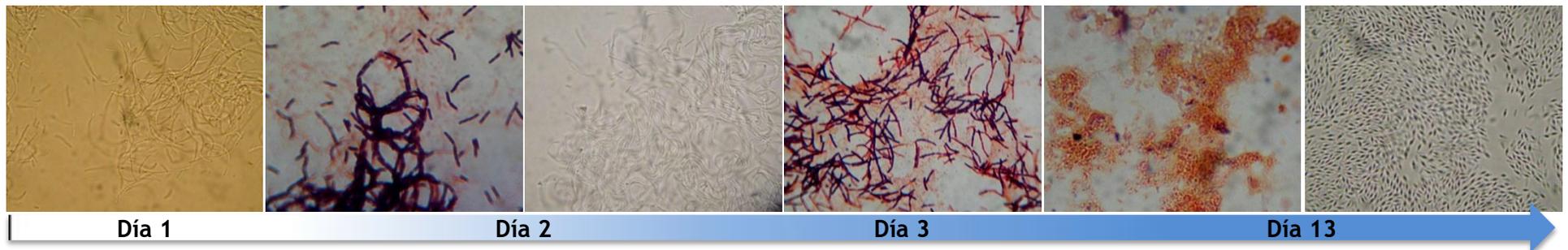


**Cepa Bs**

*Tabla\_ Medio LB*

HRS.	DÍAS	TAMAÑO		ESPORAS		CADENAS		MOVILIDAD		GRAM		DESCRIPCIÓN
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	
20	1	Mediano	Mediano	No	No	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	Finos, ~100 cél.
48	2	Mediano	Mediano	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Positivo	Positivo	~100 cél
72	3	Mediano	Mediano	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Positivo	Positivo	Movilidad, ~100 cél.
144	6	Mediano	Mediano	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Positivo	Positivo	-
168	7	Mediano	Mediano	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Positivo	Positivo	-
192	8	Mediano	Mediano	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Positivo	Positivo	-
216	9	Mediano	Mediano	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Positivo	Positivo	Agregamiento celular
240	10	Mediano	Mediano	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Positivo	Positivo	-
312	13	Mediano	Mediano	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	Todo esporulado

*Figura\_ Medio LB*



Tabla\_Medio T3

HRS.	DÍAS	TAMAÑO		ESPORAS		CADENAS		MOVILIDAD		GRAM		DESCRIPCIÓN
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	
20	1	Mediano	Mediano	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Positivo	Positivo	~10 cél.
48	2	Mediano	Mediano	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Positivo	Positivo	Movilidad, ~100 cél.
72	3	Mediano	Mediano	No	No	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	~100 cél.
144	6	Mediano	Mediano	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	Positivo	Positivo	Todo esporulado

Figura\_Medio T3

