

TESIS DOCTORAL

Biodiversidad de cepas de *Bacillus cereus* y especies relacionadas aisladas de miel.



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas
Año 2007

Ana Claudia López
Director. Ing Agrónoma Adriana M. Alippi¹
Co-Director. Dr. Daniel H. Grasso

El desarrollo de este trabajo de tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido desarrollado en el CIDEFI (Centro de investigaciones en Fitopatología- Unidad de Bacteriología) de la facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata bajo la dirección de la Ing Agrónoma Adriana Alippi y la co-dirección del Dr. Daniel Grasso

Con mucho amor para
Rodrigo, Ana, Eduardo y Vero

Agradecimientos.

- A la Facultad de Ciencias Exactas, por haberme permitido obtener la educación de grado y continuar con mi formación académica.
- A la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales por haberme brindado el lugar físico para el desarrollo experimental de la presente tesis.
- A la comisión de Investigación científica de la provincia de Buenos Aires (CIC), por permitirme desarrollar mi tesis doctoral.
- A la Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo de investigación.
- A la Ing. Adriana Alippi a quien le agradezco dirigirme, darme confianza y estimular mi trabajo.
- Al Dr. Daniel Grasso, quien aceptó co-dirigir mi tesis.
- Al Dr. Antonio Lagares por aceptar ser la figura de asesor científico de tesis.
- Al Dr. Mario Aguilar por haberme brindado un lugar donde realizar mis tareas de investigación en mis comienzos.
- A mis compañeros de Laboratorio Andrea, Francisco, Rodolfo.
- A mis compañeros del IBBM: Mónica Collavino, Cecilia Muglia, Omar Riva, López Juan Carlos, López María Verónica, Ricillo Pablo, Eitel Prezzle, Florencia Del Papa, Silvina López García, Julieta Fernández, Federico Sisti, Mariano Pistorio.
- A mis padres por el apoyo continuo y la compañía.
- A mi hermana por haberme enseñado y acompañado en mi formación.
- A Rodrigo quien me brindo el apoyo emocional en todo momento además de su amor.
- A mis amigas del alma las que siempre están cuando las necesitas: Eva, Flor y Guille.

Durante el presente trabajo de Tesis fueron publicaron los siguientes artículos:

- Phenotypic and genotypic diversity of *Bacillus cereus* isolates recovered from honey. Ana C. López, Adriana M. Alippi . International Journal of Food Microbiology 117 (2007) 175–184
- Molecular epidemiology of Paenibacillus larvae larvae and incidence of American foulbrood in Argentinean honeys from Buenos Aires province. ADRIANA M ALIPPI, FRANCISCO J REYNALDI, ANA C LÓPEZ, MARISA R DE GIUSTI3 AND O MARIO AGUILAR. Journal of Apicultural Research 43(3): 135–143 (2004)
- Diversity of *Bacillus megaterium* isolates cultured from honeys. Ana C. López y Adriana M.Alippi. Enviado a Food Microbiology, 2007.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transferencia
BSA	seroalbúmina bovina
dNTPs	2'-deoxirribonucleósidos 5-trifosfato
EDTA	ácido etilen diamino tetracético
gr	gramo(s)
J	coeficiente Jaccard
M	molar
MBD	Matriz Básica de datos
MEE	<i>Multilocus Enzyme electrophoresis</i>
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
mg	miligramo(s)
min	minuto(s)
ml	mililitro(s)
mM	milimolar
mmol	milimol
ng	nanogramo(s)
nt	nucleótido(s)
OTU	Unidades técnicas operativas
pb	pares de bases
PEMBA	<i>Polymixin pyruvate egg mannitol Bromothymo lblue agar</i>
PFGE	<i>Pulse-field gel electrophoresis</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
% p/v	porcentaje peso en volumen
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i>
SM	<i>Simple Matching</i>
SD	<i>DICE</i>
SDS	<i>sodium dodecil sulfate</i>
TBE	Tris-borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TS	Triptona soya (medio de cultivo)
µl	microlitro(s)
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages</i>
µM	micromolar
UV	luz ultravioleta
V	Volts
V-P	Vogues-Proskauer
% v/v	porcentaje volumen en volumen

INDICE GENERAL

	Página
INTRODUCCIÓN GENERAL	
<i>Bacillus</i> un poco de historia	1
<i>Bacillus cereus</i> y su implicancia en las intoxicaciones alimentarias	3
Microbiología de la miel	4
Miel y su importancia para la República Argentina	8
Diversidad microbiana, importancia de su estudio, mecanismos que generan diversidad	9
Hipótesis	11
Objetivos Generales	12
Objetivos específicos	12
Bibliografía citada	13
CAPÍTULO I.	
Aislamiento, Caracterización e Identificación de <i>Bacillus cereus</i> y especies relacionadas	
Introducción	17
Hipótesis	21
Materiales y Métodos	22
1.1. Obtención y selección de los aislamientos	22
1.2. Caracterización morfológica de los aislamientos	23
1.2.1 Técnicas de coloración	23
1.2.1.1 Tinción de Gram	23
1.2.1.2 Tinción de inclusiones lipídicas	23
1.2.1.3. Tinción de esporas de Shaeffer-Fulton	24
1.2.1.4 Tinción triple	24
1.2.1.5. Coloración de inclusiones cristalinas	25
1.2.2. Caracterización de los aislamientos mediante pruebas bioquímicas, basadas en el metabolismo	25
1.2.2.1. Reacción de catalasa	26
1.2.2.2. Producción de lecitinasas	26
1.2.2.3. Hidrólisis de almidón	27
1.2.2.4. Producción de acetoina mediante la reacción de V-P y determinación de pH en caldo V-P	27
1.2.2.5. Reducción de nitratos	28
1.2.2.6. Utilización de arabinosa y manitol	28
1.2.2.7. Determinación de la actividad tirosinasa	29
1.2.2.8. Determinación de la Liquefacción de la gelatina	29
1.2.2.9. Determinación de la actividad beta hemolítica y patrón discontinuo beta hemólisis	30
Resultados y Discusión	31
Bibliografía Citada	43
CAPÍTULO II	
VARIABILIDAD GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>BACILLUS CEREUS</i> Y <i>BACILLUS MEGATERIUM</i>	
Introducción	45
Técnicas de Biología Molecular	45
Relaciones Taxonómicas	51
Técnicas de Taxonomía Numérica	52
Hipótesis	53
Materiales Y Métodos	57
2.1. Obtención del molde de ADN para la las reacciones de PCR	58
2.2. Obtención de los perfiles <i>fingerprint</i> de ADN utilizando los <i>primers</i> BOX, REP y ERIC	59
2.3. Obtención de patrones de restricción	61
2.4. Análisis de la diversidad genotípica a través de los perfiles <i>fingerprint</i>	63
2.5. Análisis de la diversidad Fenotípica	64
2.6. Estudio de la confiabilidad de los fenogramas generados por el programa NTSYS-pc2	65
Resultados	65
Diversidad genotípica	65
Análisis de la región 16s rRNA	71
Diversidad fenotípica	72
Discusión	79
Bibliografía Citada	81
Capitulo III	
Caracterización de cepas enterotoxinas de <i>Bacillus cereus</i> y <i>Bacillus megaterium</i>	
Introducción	84
Intoxicaciones alimentarias	84
<i>Bacillus cereus</i> y su implicancia en intoxicaciones alimentarias	86
Hipótesis	88
Materiales Y Métodos	89
3.1. Determinación de coagulasa libre y coagulasa fija	89
3.2. Determinación de la actividad coagulasa en leche tornasolada	90
3.3. Identificación de cepas enterotoxigénicas de por PCR empleando <i>primers</i> B, B', L-1, L-2 y ET	92
3.4. Análisis estadístico de los resultados	93
3.5. Desarrollo de una técnica para detectar cepas potencialmente tóxicas directas de miel	94
Resultados y Discusión	95

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Colonias de los aislamientos en agar PEMBA	32
Figura 1.2. Tinción de esporas de Sheaffer-Fulton	33
Figura 1.3. Coloración de inclusiones cristalinas	34
Figura 1.4. Caracterización de los aislamientos mediante pruebas bioquímicas	37
Figura 2.1. Representación esquemática de la metodología rep-PCR	50
Figura 2.2. Representación esquemática de las subunidades ribosomales	51
Figura 2.3. Esquema de la estructura secundaria del gen 16S ARNr	67
Figura 2.4. Perfiles fingerprint de <i>B. cereus</i> obtenidos con los primers BOX, REP y ERIC.	68
Figura 2.5. Dendograma de similitud genotípica generado a través de los perfiles	69
Figura 2.6. Perfiles fingerprint de <i>B. megaterium</i> obtenidos con los primers BOX, REP y ERIC.	70
Figura 2.7. Dendograma de similitud genotípica	71
Figura 2.8. Perfiles PCR-RFLP de <i>B. cereus</i>	72
Figura 2.9. Perfiles PCR-RFLP de <i>B. megaterium</i>	73
Figura 2.10. Dendograma de similitud fenotípica de <i>B. cereus</i>	74
Figura 2.11. Dendograma de similitud fenotípica de <i>B. megaterium</i>	98
Figura 3.1. Actividad coagulasa en plasma de conejo	99
Figura 3.2. Actividad coagulasa en leche tornasolada	99
Figura 3.3. Patrones obtenidos con los diferentes set de primers del complejo HDL y de la enterotoxina T	99

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Microorganismos presentes en miel	7
Tabla 1.1. Pruebas bioquímicas y características morfológicas de los aislamientos de <i>B. cereus</i> .	38
Tabla 1.2. Pruebas bioquímicas y características morfológicas de los aislamientos de <i>B. megaterium</i> .	41
Tabla 2.1. Secuencias de los primers utilizados para obtener los perfiles fingerprint	61
Tabla 2.2. Secuencias de los primers utilizados para la obtención de patrones PCR-RFLP	62
Tabla 2.3. Mezcla de reacción para la obtención de patrones de restricción	62
Tabla 2.4. Denominación, origen geográfico y agrupamientos generados por los programas de taxonomía numérica Gelcompar y NTSYS, para las cepas de <i>B. cereus</i> estudiadas en esta tesis	75
Tabla 2.5. Denominación, origen geográfico y agrupamientos generados por los programas de taxonomía numérica Gelcompar y NTSYS, para las cepas de <i>B. megaterium</i> estudiadas en esta tesis.	78
Tabla 3.1. Secuencia de primers empleados para la detección de los componentes del complejo HDL y la enterotoxina-T	93
Tabla 3.2. Resultados de las reacciones de coagulación en plasma de conejo, y de la reacción de PCR para la detección de cepas tóxicas de <i>Bacillus cereus</i>	100
Tabla 3.3. Resultados de las reacciones de coagulación en plasma de conejo, y de la reacción de PCR para la detección de cepas tóxicas de <i>Bacillus megaterium</i> .	102

INTRODUCCIÓN GENERAL



INTRODUCCION GENERAL

BACILLUS UN POCO DE HISTORIA

Cohn realizó la primera descripción del género *Bacillus* en el año 1872 denominando así a las bacterias que presentaban crecimiento filamentosos y morfología de bastón. En 1876 Cohn y Koch independientemente detectaron en dos especies actualmente conocidas como *Bacillus subtilis* y *Bacillus anthracis* la presencia de esporas resistentes al calor.

La capacidad de esporular fue utilizada por Bary en el año 1884 como única herramienta de clasificación, mientras que otros microbiólogos de la época continuaron utilizando el término *Bacillus* para agrupar a aquellas bacterias que presentaban un crecimiento filamentosos y morfología de bastón. Recién a partir del año 1923, el género fue aceptado como tal, luego de la publicación de la primera edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

En la última edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (2001) se define al género *Bacillus* como bacilos Gram (+) de bordes redondeados, de 0,5 a 2,5 μm de ancho X 1,2 a 10,0 μm de largo y móviles por flagelos peritricos con esporas de forma oval y en algunos casos cilíndricas. Presentan una única spora por célula vegetativa. La esporulación no se reprime por la presencia de oxígeno; y las esporas son resistentes frente a condiciones adversas como calor, pH y salinidad. Quimioorganótrofos con metabolismo respiratorio o fermentativo y usualmente catalasa positivos. Las

especies del género se encuentran en los más variados nichos ecológicos y algunas son patógenas para vertebrados o invertebrados.

El avance de la biología molecular con la implementación de nuevas metodologías como PCR (del término en inglés Polymerase Chain Reaction), junto con las metodologías clásicas, incidieron en la creación de nuevos generos a partir del género original. En 1986 se describen 34 especies del mismo, todas aeróbicas o anaeróbicas facultativas, Gram positivas o Gram variables con forma de bastón, formadores de endosporas resistentes frente a condiciones adversas y la mayoría catalasa positivas (Claus and Berkeley, 1986; Claus and Frize, 1989, Slepecky and Hemphill, 1992). En 1992 el género se subdividió en 7 nuevos géneros: *Alicyclobacillus* (4 especies), *Paenibacillus* (27 especies), *Brevibacillus* (10 especies), *Aneurinibacillus* (3 especies), *Virgibacillus* (2 especies), *Gracilibacillus* (2 especies) y *Salibacillus* (1 especie).

Ash y colaboradores, en el año 1991, a través de estudios del gen 16S rARN establecieron relaciones filogenéticas entre muchas de las especies del género (Ash et al, 1991), el cual está conformado actualmente por 75 especies.

Dentro del género, muchos autores (Vilas-Bôas et al, 2007), utilizan el término no taxonómico "*grupo cereus*", para incluir a seis especies relacionadas: *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* y *Bacillus wehenstephanensis*.

La diversidad genética, dentro del "*grupo cereus*", se ha estudiado por diferentes métodos como: MEE (Multilocus Enzyme electrophoresis), PFGE (Pulse-field gel electrophoresis), MLST (Multilocus sequence typing) (Helgason et al., 2004) y RFLP (Restriction fragment length polymorphism) (Haque and Russel, 2005). Estudios recientes de taxonomía polifásica (Daffonchio., et al, 2000; Helgason., et al, 2004) sugieren la inclusión de *B cereus sensu stricto*, *B*

anthracis y *B. thuringensis* como miembros de una sola especie designada como *B. cereus sensu lato*. No obstante, otros autores han demostrado en base a marcadores moleculares que *B. cereus*, *B. anthracis* y *B. thuringensis* son especies distintas (Vilas-Bôas et al, 2007; Guerra Cantero and Raymundo, 2005). En la actualidad no existe consenso al respecto, de modo que en esta tesis serán consideradas como especies independientes.

BACILLUS CEREUS Y SU IMPLICANCIA EN LAS INTOXICACIONES ALIMENTARIAS

Bacillus cereus pertenece al Phylum Firmicutes; orden Bacillales, familia Bacillaceae, es una bacteria aerobia o anaerobia facultativa obtiene energía tanto por respiración, en presencia de oxígeno, como por fermentación en ausencia de oxígeno, con esporas en posición central, de forma elipsoidal, que no engrosan el esporangio y altamente resistentes frente a condiciones adversas. La temperatura de crecimiento varía entre los 10 y los 48 °C, con una óptima de 30 °C. Está ampliamente distribuido en la naturaleza, siendo su hábitat natural el suelo. Es productor de enterotoxinas y ha sido implicado en algunos procesos infecciosos humanos.

Bacillus cereus está clasificado como riesgo de Categoría 2 (European Commission, 1997) considerándose que el consumo de alimentos contaminados con más de 1×10^4 esporas o células vegetativas bacterianas por gramo resulta en una intoxicación alimentaria. Se lo ha citado contaminando frecuentemente leche, productos lácteos y sus derivados, cereales, y otros alimentos. Esta especie produce varias toxinas (Granum, 1994; Pirttijarvi et al., 1999; in't Veld et al., 2001), siendo las más importantes: la toxina emética y el complejo enterotóxico. La toxina emética (cereulida) es

de naturaleza peptídica, estable al calor, resistente a tripsina y pepsina que ocasiona náuseas y vómitos, y ocasionalmente diarrea y dolor abdominal; el período de incubación es de 1 a 5 hs. El complejo enterotóxico está conformado por tres enterotoxinas designadas: I) Hemolisina BL (HBL) consistente de tres partes (B, L₁, y L₂) todas necesarias para su actividad biológica, es estable a 45 °C y no se inactiva por la actividad de enzimas proteolíticas; II) la enterotoxina- T que es un componente simple no inactivado por enzimas proteolíticas; III) el complejo enterotóxico no-hemolítico, tripartito. Los síntomas ocasionados por el complejo enterotóxico incluyen dolor abdominal, diarrea acuosa, náuseas y vómitos y, ocasionalmente fiebre. El tiempo de incubación oscila entre 6 a 15 h y persiste durante 24 h.

Las cepas de *B. cereus* también pueden producir 3 tipos distintos de fosfolipasas C, que han sido consideradas junto con la hemolisina BL como factores de virulencia para la producción de endoftalmitis fulminante con necrosis de la retina (Beecher et al., 2000).

Registros de diferentes países sugieren que al menos la mitad de las cepas de *B. cereus* que se aíslan habitualmente son productoras de enterotoxinas (Granum, 1994), sin embargo, sólo un pequeño número de las mismas está presente en los alimentos en cantidades suficientes para causar enfermedades transmisibles por alimentos (ETA).

MICROBIOLOGÍA DE LA MIEL

La miel es el producto generado por las abejas a partir del néctar de las flores combinada con secreciones glandulares, esta básicamente compuesta por agua (17.2%), fructosa (38.4%) y glucosa (30.3%); sacarosa (1.3%) otros

carbohidratos (12%); minerales (0.169%) y proteínas (169 mg/100g); el pH varia entre 3,4 y 6,1.

http://www.senasa.gov.ar/oldweb/fiscalizacion/cod_alimentario_x.pdf

La miel posee propiedades antimicrobianas debidas a una serie de factores, entre ellos:(Molan; 1992a; 1992b):

- **Acidez:** el bajo pH de la miel, previene el crecimiento de muchas especies bacterianas.
- **Alta presión osmótica:** La alta concentración de azúcares y la baja actividad de agua impiden el desarrollo bacteriano y fúngico.
- **Peróxido de hidrógeno (H₂O₂):**Representa el mayor agente antibacteriano de la miel es generado por el sistema enzimático glucosa oxidasa que transforma la glucosa de la miel en ácido glucónico
- **Viscosidad:** limita la disolución del oxígeno, impidiendo el crecimiento de microorganismos aerobicos estrictos.
- **Presencia de agentes químicos :** lisozima, terpenos y ácido Fenólico, que lisan las paredes bacterianas, y actuan como inhibidores del desarrollo bacteriano.

Los microorganismos presentes en la miel son aquellos capaces de tolerar la alta concentración de azúcares, acidez y otras propiedades antimicrobianas de la miel y pueden agruparse en 4 grandes categorías. (Snowdon and Cliver, 1996):

- Microorganismos que aparecen frecuentemente en la miel (levaduras osmofílicas y bacterias esporuladas)
- Microorganismos indicadores de la calidad comercial y sanitaria de la miel (coliformes y levaduras)

- Microorganismos que pueden causar enfermedades en humanos (*Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*; etc)
- Microorganismos que causan enfermedades en las abejas (*Paenibacillus larvae*, *Melisococcus plutonius*, *Ascophaera apis*) (Bailey and Ball, 1991).

Si se cumplen las medidas de control en el procesamiento de la miel, resulta un producto con niveles de contaminación microbiana relativamente bajos. Las fuentes primarias de contaminación microbiana en la miel son el polen, los tractos digestivos de las abejas, el polvo ambiental, el aire, el suelo, y las flores (Gilliam, 1979; Gilliam and Valentine, 1976). Las especies de *Bacillus* se encuentran presentes en el aire y el polvo y también en la miel, sugiriendo que el aire y el polvo serían fuentes primarias de contaminación, favorecido por la alta viscosidad de la miel que permite la adherencia de las esporas bacterianas.

Los bacilos aeróbicos formadores de esporas, la mayoría pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Brevibacillus*, son las especies bacterianas que se encuentran más frecuentemente en las superficies externas, intestinos, hemolinfa y tráqueas de las abejas adultas y por consiguiente son las que las abejas introducen con mayor frecuencia. Las especies de *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium* y *Micrococcus* son comunes en el aire y el polvo y también en la miel, sugiriendo que el aire y el polvo serían fuentes primarias de contaminación, mientras que el suelo y las flores serían fuentes de contaminación primaria de levaduras (Snowon and Cliver 1996) (Tabla 1).

Tabla 1. Microorganismos encontrados en miel (Snowdon and Cliver, 1996)

Bacterias	levaduras	Hongos filamentosos
<i>Alcaligenes</i>		<i>Ascopahera</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Debaryomyces</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Brevibacillus</i>	<i>Hansenula</i>	<i>Atichia</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Lipomyces</i>	<i>Bettsia</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Nematospora</i>	<i>Cephalosporium</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Oosporidium</i>	<i>Chaetomium</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Pichia</i>	<i>Coniotechecium</i>
<i>Escherichia</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Hormiscium</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Penicillum</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Shizosaccharomyces</i>	<i>Pereynlia</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Schwanniomyces</i>	<i>Triposporium</i>
<i>Neisseria</i>	<i>Trichosporan</i>	Uredianceae
<i>Paenibacillus</i>	<i>Torula</i>	Ustilaginaceae
<i>Proteus</i>	<i>Torulopsis</i>	
<i>Pseudomonas</i>	<i>Zigosaccharomyces</i>	
<i>Virgibacillus</i>		
<i>Xanthomonas</i>		

Son fuentes de contaminación secundarias: el hombre, los equipos de extracción y manipuleo de los marcos de miel, el viento, el polvo ambiental, insectos, animales y agua. Por otro lado las rutas secundarias de contaminación son aire del sitio de extracción y envasado de la miel, los pisos, paredes y techos de las instalaciones como reservorios de bacterias que entran a la miel. Estas rutas secundarias pueden controlarse por medidas higiénicas *standard* y buenas prácticas de manufactura.

Las esporas de *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* y *Clostridium* pueden mantenerse viables en la miel por largos períodos y germinar cuando se presentan las condiciones adecuadas para su crecimiento. Los recuentos de bacterias esporuladas aeróbicas en la miel oscilan entre 0 y 200 u.f.c. /g de miel, habiendo grandes variaciones en cuanto al número de especies y cantidad de acuerdo con la muestra de miel (Bonhevi and Jordá, 1993).

Se han efectuado numerosos estudios para determinar la incidencia y caracterizar las poblaciones de *Paenibacillus larvae* y de otras especies

patógenas de abejas (Alippi et al., 2004; Genersch and Otten, 2003) aisladas de la miel, pero en relación al género *Bacillus* los estudios se han limitado a determinar su presencia. El primer análisis cualitativo de *Bacillus cereus* en miel data del año 1970 (Tysset, 1970), y en el año 1995 se describe su presencia en muestras de mieles de Argentina (Alippi 1995).

Entre otras especies se ha encontrado *Bacillus megaterium* junto con *B. cereus* y *B. coagulans* como especies predominantes de las muestras de mieles (Kobubo et al 1984). Un relevamiento de mieles argentinas (n= 394) realizado durante los años 1999 y 2001 mostró una alta frecuencia de *Bacillus cereus* (28 %) y *Bacillus megaterium* (14 %) y en menor proporción (6%) a *Brevibacillus laterosporus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans*, y *Bacillus pumilus* (Alippi et al, 2004)

MIEL Y SU IMPORTANCIA PARA LA REPÚBLICA ARGENTINA

La República Argentina es el tercer productor internacional de miel. Se exporta alrededor del 98% lo que representa un ingreso aproximado de 110 millones de dólares y como país exportador, se ubica en el primer lugar, con un volumen de 69.000 t por año. En el país existen aproximadamente 2.800.000 colmenas estimándose que en nuestras áreas agrícolas se podría mantener un *stock* de hasta 4.5000.00 (<http://www.alimentosargentinos.gov.ar/2007>). La Provincia de Buenos Aires concentra alrededor del 60% de la producción de miel y registra los mayores rendimientos por colmena.

Nuestro país se ha caracterizado por exportar miel a granel, de calidad reconocida por los principales fraccionadores de países tan exigentes como

Japón, Alemania o EE.UU. El mercado mundial se distingue en el nuevo milenio, como un mercado firme con tendencia creciente de los precios. La miel argentina es muy cotizada por su color claro pero está compitiendo en la franja de menores precios al venderse como materia prima a granel, sin tipificación ni control de calidad. Para explotar convenientemente los mercados de las mieles ecológicas, monoflorales o artesanales se requiere el ajuste de tecnología, la organización de un control de calidad y la correcta adecuación a las normativas vigentes de los países compradores, razón por la cual la tipificación de especies bacterianas comúnmente presentes adquiere una mayor trascendencia.

DIVERSIDAD MICROBIANA, IMPORTANCIA DE SU ESTUDIO, MECANISMOS QUE GENERAN DIVERSIDAD

Biodiversidad (neologismo del inglés *Biodiversity*, a su vez del griego *bio-*, vida, y del latín *diversitas,-atis*, variedad), también llamada diversidad biológica, es el término por el cual se hace referencia a la amplia variedad de seres vivos sobre la tierra y los patrones naturales que conforma; que es el resultado de miles de millones de años de evolución según procesos naturales y una influencia creciente de las actividades del ser humano (www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf)

A principios del siglo XX, los ecólogos Jaccard y Glesson propusieron en distintas publicaciones los primeros índices estadísticos destinados a comparar la diversidad interna de los ecosistemas. A mediados del siglo XX, el creciente interés científico incluyó el desarrollo del concepto que describe la complejidad y organización, hasta que en 1980, Thomas Lovejoy propuso la expresión

“diversidad biológica” (Lovejoy, 1980). Crisci y López definieron a la diversidad biológica como la variedad y variabilidad de los seres vivos y de los complejos ecológicos que ellos integran. La misma abarca los distintos ecosistemas, especies y genes y su abundancia relativa (Crisci and López., 1993). Se desconoce el rol de la diversidad microbiana de la naturaleza, conociéndose únicamente entre el 1 y 5 % del protoplasma microbiano estimado en un 50 % del total del planeta (Rosado et al. 1997). Puesto que solo es posible aislar el 20 % de los microorganismos en cultivo puro debido al desconocimiento de las condiciones de cultivo (Muyzer, 1999), la clasificación en base a características fisiológicas y bioquímicas es muy poco probable. Por lo tanto, para un mejor entendimiento de la diversidad microbiana y su rol en el ecosistema es necesario utilizar otro tipo de técnicas en las que el cultivo del microorganismo, no es indispensable, tales como las desarrolladas en base a técnicas moleculares. Los ecologistas han desarrollado diferentes herramientas para medir la biodiversidad y describir mediante parámetros estadísticos a una comunidad de individuos (Bomeman et al., 1996; Eichner et al., 1999).

La ecología microbiana molecular, estudia a los microorganismos cultivados y los no cultivados mediante marcadores moleculares, que se caracterizan por conservarse en los distintos niveles jerárquicos de la clasificación: Familia, género, especie, subespecie y cepa, y mantenerse neutros frente al ambiente.

La diversidad de una comunidad biológica es un concepto clave en ecología puesto que permite la caracterización de la misma y su cuantificación. El análisis de los fenómenos tales como, la sucesión, colonización, respuesta a cambios ambientales y competencia entre microorganismos.

El desarrollo de la biología molecular, ha permitido incorporar criterios clasificatorios basados en el análisis genómico como por ejemplo, presencia o ausencia de un gen; variabilidad de una determinada secuencia; expresión de una proteína determinada; etc. En muchos casos la caracterización fenotípica no alcanza para la clasificación de un determinado grupo o conduce a agrupamientos groseros, mientras que la diversidad genotípica revelada puede resultar tan grande que dificulte su identificación y clasificación. A raíz de esta dualidad, en los últimos años surgió la necesidad de combinar estudios fenotípicos y genotípicos a través de una taxonomía polifásica para lograr la caracterización de una población (Graham et al, 1991).

Entre los mecanismos que introducen variabilidad genética por transferencia horizontal de genes podemos mencionar: a la transformación, transducción y conjugación. En la transformación el ADN libre se incorpora, integra y mantiene estable durante la herencia; en la traducción la información genética se trasmite desde una célula dadora a una receptora por un proceso mediado por bacteriófagos, en la conjugación es necesario contacto célula-célula para poder transferir los elementos móviles.

HIPÓTESIS DE TRABAJO.

En base a lo expuesto anteriormente se plantearon las siguientes hipótesis:

- Las poblaciones de *Bacillus cereus* y *Bacillus megaterium* presentes en las mieles argentinas son heterogéneas.
- En la miel se encuentran cepas productoras de enterotoxinas que pasan inadvertidas porque las técnicas de detección existentes no son aptas para un diagnóstico rápido y de certeza.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la biodiversidad de cepas de *Bacillus cereus* y *Bacillus megaterium* aisladas de mieles.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conformar un cepario con aislamientos de *Bacillus cereus* y *Bacillus megaterium* aisladas de miel y cepas de referencia provenientes de colecciones internacionales.
- Investigar la diversidad fisiológica y quimiotaxonómica en la población de *B. cereus* y especies relacionadas contaminantes de miel.
- Evaluar el grado de diversidad de las poblaciones de *B. cereus* y *B. megaterium* investigadas mediante *fingerprints* de ADN generados por rep-PCR usando primers BOX-, REP- y ERIC.
- Identificar las diferentes toxinas provenientes de los aislamientos de las poblaciones de *B. cereus* y *B. megaterium*.
- Desarrollar un método de diagnóstico rápido de cepas de *B. cereus* productoras de enterotoxinas mediante marcadores moleculares.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

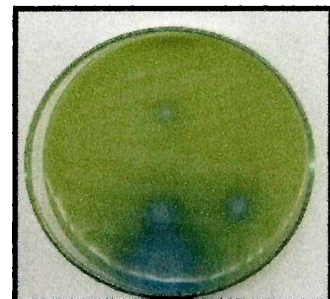
- Alippi, A.M. 1995. Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium. *Microbiología SEM* 11: 343 – 350.
- Alippi A.M; Reynaldi, F.J; López, A.C; De Giusti, M.R. and Aguilar O.M. 2004. Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae larvae* and incidence of American Foulbrood in Argentinean honeys from Buenos Aires Province. *Journal of Apicultural Research* 43: 135-143.
- Ash, C; Priest, F. G and Collins, M. D. 1991. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek J. Microbiol.* 64: 253-260.
- Bailey, L and Ball, B.V. (Eds.) 1991. *Honey Bee Pathology, Second Edition*, Academic Press, London.
- Beecher, D.J; Olsen, T.W; Somers, E.B and Wong A.C.L. 2000. Evidence for contribution of tripartite hemolysis BL, phosphatidylcholine-preferring phospholipase C., and collagenase to virulence of *Bacillus cereus* endophthalmitis. *Infection and Immunity* 68: 5269-5276.
- *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2^{da} Edition 2001*
- Bonhevi, J.S and Jordá, R.E. 1993. The microbiological quality of honey as determined by aerobic colony counts. *Journal of Food Protection* 56:336-337.
- Borneman, J. P.W ; Skroch, K.M; O'Sullivan, J. A. N.G; Rumjanek, J.L; Jansen, J. Nienhuis, and E.W. Triplett. 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *App Env Microbiol.* 62: 1935-1943.
- Claus, D and Berkeley, R.C.W. 1986. Genus *Bacillus*. Cohn 1872, 174, In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* , Vol.2, Baltimore Williams and Wilkins, pp.1105-1139.
- Claus, D and Frize, D. 1989. Taxonomy of *Bacillus*, In: Harwood, C.R. (Ed.), *Bacillus. Biotechnology handbooks Vol. 2*, Plenum Press, New York, USA, pp.5-26.
- Crisci, J.V and López M.F. 1983. *Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica*. Monografía N° 26. Serie de Biología. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. Programa regional de Desarrollo Científico Y Tecnológico. Washington, D: C.136p.
- Daffonchio, D; Cherif, A and Borin S. 2000. Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S-23S internal transcribed spacers describe genetic relationships in the "Bacillus cereus group". *Appl Environ Microbiol.* 12:5460-8.

- Eichner, C. A. R. W; Erb, K. N. Timmis and I. Wagner-Dobler. 1999. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from shocks in the activated sludge microbial community. *App Env Microbiol.* 65:102-109.
- European Commission, 1997. Harmonization of safety criteria for minimally processed foods. Inventory report FAIR concerted action FAIR CT96-1020.
- Genersch, E and Otten. C. 2003. The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) for genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Apidologie.* 34: 195–206.
- Gilliam, M. 1979. Microbiology of pollen and bee bread: the genus *Bacillus*. *Apidologie* 10: 269-274.
- Gilliam, M. and Valentine, D. K. 1976. Bacteria isolated from the intestinal contents of foraging workers honey bees, *Apis mellifera*: the genus *Bacillus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 28: 275-276.
- Guerra-Cantera, M and Raymundo, A. 2005 Utilization of a polyphasic approach in the taxonomic reassessment of antibiotic- and enzyme-producing *Bacillus* spp. isolated from the Philippines *World Journal of Microbiology and Biotechnology.*21:635-644.
- Graham, P. H; M. J. Saqdowsky, H. H. Keyser; Y. M. Barnett; R. S. Bradley; J. E. Cooper; D. J. De Ley; B. D. W. Jarvis; E. B. Roslycky; B. W. Strijdom and J. P. W. Young. 1991. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. *Int J. Syst Bact.* 41:582- 587.
- Granum, P.E. 1994. *Bacillus cereus* and its toxins. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* 76: 61S-66S.
- Haque, A; and Russell, N.J. 2005. Phenotypic and genotypic characterization of *Bacillus cereus* isolated from Bangladeshi rice. *Int Journal of Food Micro.* 98, 23–34.
- Helgason, E; Tourasse, N.J; Meisal, R; Caugant, D.A and Kolsto, A.B. 2004. Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *App Env Microbiol.* 70: 191–201.
- in't Veld, P.H; Ritmeester, W. S; Delfgou-van Asch E.H.M; Dufrenne, J.B; Wernars, K.; Smit, E.; and van Leusden F.M. 2001. Detection of genes encoding for enterotoxins and determination of the production of enterotoxins by HBL blood plates and immunoassays of psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* isolated from pasteurised milk. *International Journal of Food Microbiology.* 64: 63-70.
- Kokubo, Y; Jinbo, K; Kaneko, S; and Matsumoto, M. 1984. Prevalence of spore-forming bacteria in honey. *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res Lab. Pub. Health.*35: 192-196.
- Lovejoy. T.E. 1980. *Conservation Biology: An evolutionary-ecological perspective.* Sinauer Associates.
- Molan, P., 1992 a. The Antibacterial activity of honey: The nature of the antibacterial activity. *Bee World* : 73, 5-28

-
- Molan, P.C., 1992 b. The Antibacterial activity of honey: 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. *Bee World* 73: 59-76.
 - Muyzer, G. 1999 .DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiol.* 2:317-322.
 - Pirttijarvi, T.S.M; Andersson, M.A; Scoging, A.C. and Salkinoja-Salonen, M.J. 1999. Evaluation of methods for recognizing strains of the *Bacillus cereus* group with food poisoning potential among industrial and environmental contaminants. *System. Appl. Microbiol.* 22: 133-144.
 - Rosado, A. S; G. F. Duarte, L. Seldin, and J. D. van Elsas. 1997. *Molecular Microbial Ecology: A Minireview. Revista de Microbiologia.* 28:135-147.
 - Slepecky, R.A and Hemphill, H. E. 1992 The genus *Bacillus* –nonmedical, In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M. Harder, W., Schleifer, K-H (eds.), *The procaryotes, a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.* Vol II Springer-Verlag, Berlin, pp 1663-1696.
 - Snowdon, J.A. and Cliver, D.O. 1996. Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology* 31: 1-26.
 - Tysset, C; Durand; C and Taliergio. O. 1970 Contribution to the study of the microbial contamination and the hygiene of commercial honey. *Rec. Med Vet.* 146: 1471-1492.
 - Vila-Bóas, G. T., Peruca, A.P.S., and Arantes O.M.N. 2007. Review. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringensis*. *Can. J. Microbiology.* 53: 673-687.

CAPITULO I

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *BACILLUS CEREUSY* ESPECIES RELACIONADAS



CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

En la naturaleza, las poblaciones microbianas son muy heterogéneas, por lo tanto para estudiar a los microorganismos y sus propiedades es conveniente cultivarlos en forma pura.

Los cultivos puros se obtienen utilizando un conjunto de procedimientos y técnicas desarrolladas, entre otros, por Robert Koch durante el siglo XIX como es el uso de medios sólidos utilizando como solidificante el agar y como ambiente de cultivo las placas de Petri, permitiendo separar las colonias sobre la superficie de los medios, siendo el aspecto de las colonias una de las características para diferenciar distintas especies microbianas.

El estudio y análisis de las características de los cultivos de microorganismos permite conocer algunas de las propiedades fenotípicas propias de cada grupo. Para realizar el estudio de la morfología bacteriana, se utilizan dos tipos de tinciones: Tinción diferencial que permite distinguir tipos de microorganismos en función de diferencias en su estructura y composición química basadas en las propiedades de la pared celular bacteriana y tinción estructural, que se emplea para diferenciar estructuras que pueden estar presentes en los microorganismos, como por ejemplo cápsulas, endosporas, flagelos, inclusiones, etc. La tinción de Gram es un tipo de tinción diferencial empleada en Microbiología para separar a las bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas de

acuerdo con su reacción a la tinción. Esta tinción tiene gran importancia en taxonomía bacteriana ya que indica diferencias fundamentales en la pared celular de las distintas bacterias. Mientras que las bacterias Gram negativas son constantes en su reacción, los microorganismos Gram positivos pueden presentar respuestas variables en ciertas condiciones (son Gram lábiles). Por ejemplo, los cultivos viejos de algunas bacterias Gram positivas pierden la propiedad de retener el cristal violeta, y en consecuencia, se tiñen por la safranina apareciendo como Gram negativas. Para explicar el mecanismo de la tinción de Gram se han propuesto varias hipótesis fundadas en la naturaleza química de las paredes celulares.

Las inclusiones lipídicas se encontraron en varias especies de *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Spirillum*, *Pseudomonas* y otros géneros. Un lípido hallado habitualmente como material de reserva es el polímero del ácido poli- β -hidroxi-butírico, el cual se pone de manifiesto utilizando colorantes liposolubles, como los colorantes de Sudán (Gordon et al., 1973).

Algunos géneros de bacterias Gram-positivas, como *Clostridium*, *Bacillus* y *Paenibacillus* producen formas de resistencia llamadas esporas, que debido a su ubicación en el interior de la célula bacteriana toman el nombre de endosporas. Las mismas resisten a condiciones de estrés como temperaturas extremas, falta de agua y exposición a muchos compuestos tóxicos y radiaciones. El diámetro de la endospora puede ser el mismo, más pequeño o mayor que el de la célula vegetativa y su localización terminal (en un extremo), subterminal (cerca de un extremo) o central. Las esporas de *Bacillus cereus* son centrales y no engrosan esporangio midiendo en promedio entre 1.0 μm de ancho x 1.5 μm de largo, en cambio, el tamaño

promedio de las esporas de *Bacillus megaterium* es de 1.2 μm de ancho x 2.0 μm de largo.

Las bacterias formadoras de esporas constituyen un problema en la industria alimentaria porque tienen posibilidad de sobrevivir en caso de cualquier defecto en el tratamiento térmico y porque al germinar algunas especies producen toxinas que ocasionan enfermedades. Corrientemente se utiliza la tinción de Schaeffer-Fulton para diferenciar endosporas de células vegetativa.

Para el aislamiento y recuento de *Bacillus cereus* a partir de alimentos se utiliza un medio de diagnóstico semi selectivo Agar BEMBA, de la sigla en inglés: Polymyxin / egg / Yolk / mannitol / B T blue agar (Holbrook and Anderson, 1980). El bromotimol del medio se emplea como indicador de pH, para confirmar si el organismo utiliza manitol como fuente carbonada, acidificando el medio y virando al color amarillo del indicador.

El agregado de Polimixina B, antibiótico que no inhibe el desarrollo de *B. cereus*, que habitualmente lo sintetiza, inhibe el desarrollo de un gran número de grupos bacterianos mayoritariamente Gram (-).

La constitución del medio descrito hace inferir que los microorganismos que desarrollan en el comparten un perfil metabólico que incluye organismos aeróbicos con sistemas de protección a las especies reactivas del oxígeno como las peroxidasas; que en condiciones de anoxia pueden respirar anaeróticamente (anaerobios facultativos); con ciclos anapleuróticos que les permite desarrollar cuando la fuente de energía es el piruvato; que comparten la vía fermentativa con acetoina como intermediario y como producto final el 2,3 butanodiol; que excretan enzimas como las α amilasas

que degradan el almidón atacando los enlaces 1,4 α -glicosídicos y las lipasas que hidrolizan los lípidos liberando como resultado de ello glicerol y ácidos grasos y que tienen actividad proteolítica por la acción de exopeptidasas.

La presencia de manitol en el medio semiselectivo permite diferenciar a *B. cereus* de los microorganismos que tienen la capacidad de fermentar el manitol como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus megaterium*. Las colonias típicas de *B. cereus* aparecen crenadas, filamentosas de aproximadamente 5 mm de diámetro a las 24 horas de incubación, y de color turquesa (*peacock blue*), rodeadas por un precipitado opaco de ácidos grasos, por la actividad de las lipasas (lecitinasas). A las 48 horas de incubación presentan el mismo color con un centro grisáceo (Harwood, 1989). Estas características no diferencian *B. cereus* del resto de las especies del "grupo *cereus*" (*Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides* y *Bacillus weihenstephanensis*), en estos casos es necesario efectuar pruebas adicionales para su identificación.

Otros microorganismos que pueden desarrollarse en este medio son: *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* y *Proteus vulgaris*, los cuales se diferencian de los anteriores por producir una reacción combinada de lipólisis-proteólisis de las lipoproteínas presentes en la yema de huevo, lo cual se observa como un aclaramiento alrededor de la colonia (*clearing*) (Hopton, 1961).

En base a lo dicho anteriormente los aislamientos se caracterizan por un conjunto de reacciones que permiten diferenciar a los microorganismos en base a su metabolismo. Entre otros aspectos, se analiza la acción de la

bacteria sobre los hidratos de carbono (qué fuente de carbono utiliza, en qué condiciones, cómo la utiliza, qué productos se obtienen), la liberación de exoenzimas, metabolitos y toxinas al medio de cultivo, etc.

La identificación debe hacerse a partir de un cultivo puro (18-24 horas). Para realizar las caracterizaciones es necesario efectuar las pruebas en condiciones estandarizadas (en cuanto al inóculo, los reactivos, las condiciones de incubación y el tiempo de lectura) y utilizar más de una prueba en cada caso.

Por todo lo expuesto anteriormente, el conjunto el conjunto de pruebas utilizadas para la caracterización fenotípica de los grupos bacterianos estudiados en la presente tesis fueron: Tinción de Gram; tinción de inclusiones lipídicas, tinción de esporas; coloración de inclusiones cristalinas, producción de catalasas, lecitinasas, gelatinasas, tirosinasas; α amilasas; hemolisinas, lipasas; utilización de arabinosa y manitol.

HIPÓTESIS. En la miel existen poblaciones del género *Bacillus* con características metabólicas atípicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 OBTENCIÓN Y SELECCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS

Los aislamientos del “*grupo cereus*” y *Bacillus megaterium* se obtuvieron a partir de muestras de mieles provenientes de diferentes partidos de la provincia de Buenos Aires (n=433) y de otros países: EEUU, Italia, Brasil, México, Canadá, Chile, Francia y España (n=18), para realizarlos se empleó la técnica de Alippi (Alippi, 1995), con las siguientes modificaciones:

Las mieles se homogenizaron en un baño María a 40°C– 45°C durante 15 minutos. Cada muestra se diluyó al 50 % con buffer fosfato 0,01M pH 7.2 (Anexo I) y, se centrifugó a 3500g durante 40 minutos, descartando el sobrenadante y dejando 3 ml del fluido, junto con el sedimento. Con el propósito de inducir la germinación de las esporas presentes en la miel y eliminar las células vegetativas de bacterias, hongos y levaduras, los tubos se sometieron a un *shock* térmico a 80 °C en Baño María, durante 10 minutos previa agitación en *vortex*. Luego se plaqueron 10 µl del fluido en placas de agar PEMBA (Holbrook and Anderson, 1980) (Anexo I) y se incubaron a 37°C en condiciones aeróbicas, seleccionándose las colonias que desarrollaron entre las 48 h. y las 96 hs (Lancette and Harmon., 1980).

Se realizó *stock* de los aislamientos en caldo triptona soya (TS) (Anexo I) con glicerol al 20% V/V a -80°C, hasta el momento de ser usadas y en el corto plazo se mantuvieron en estrías de triptona soya a 4 °C.

1.2. CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS

1.2.1 TÉCNICAS DE COLORACIÓN

1.2.1.1 TINCIÓN DE GRAM

Se realizó la tinción de Gram según técnica de Hucker (1921). Sobre un portaobjetos, se preparó un film bacteriano en agua destilada, se dejó secar al aire y fijó por dos pasajes a la llama. Se agregó la solución de cristal violeta dejándola actuar un minuto y se lavó con agua corriente durante unos segundos. Posteriormente se agregó solución de lugol, dejándolo actuar por 1 minuto. Se decoloró con alcohol etílico de 96 ° durante unos 10 segundos, se enjuagó y se volvió a colorear durante 30 segundos con safranina, por último se lavó levemente, se secó el preparado con papel secante y se observó al microscopio óptico utilizando objetivo de inmersión (Anexo II) **Observación:** Los organismos Gram (+) se tiñen de color azul- violeta, los organismos Gram (-) aparecen de color rojo – rosado.

1.2.1.2. TINCIÓN DE INCLUSIONES LIPÍDICAS

Para detectar las inclusiones lipídicas se empleó la metodología de Harmon et al (1991).

Los frotis bacterianos se cubrieron durante 10 minutos con solución de Sudán Black B, se aclararon con unas gotas de xilol, se secaron con papel secante y se cubrieron con safranina, luego de 30 segundos de exposición se enjuagaron, se secaron y se observaron al microscopio bajo objetivo de

inmersión. (Anexo II). **Observación:** Las células vegetativas se tiñen de color rojo y las inclusiones de color negro.

1.2.1.3 TINCIÓN DE ESPORAS DE SCHAEFFER- FULTON

Para determinar la presencia, tamaño, forma y disposición de las esporas dentro del esporangio se utilizó la tinción de Schaeffer- Fulton (Clark, 1981).

Los frotis bacterianos se secaron al aire y se fijaron a la llama por tres pasajes. Cada uno de los preparados se cubrió con un rectángulo de papel de filtro y saturó con la solución de verde de malaquita. Así fueron colocados en Baño María a 100 °C durante 5 minutos, y luego de enfriarlos, se lavaron con agua corriente durante 30 segundos, para ser cubiertos con la solución al 5 % de safranina durante 30 segundos. Los preparados se lavaron muy ligeramente y secaron con papel secante. Se observaron al microscopio óptico bajo objetivo de inmersión. (Anexo II). **Observación:** Las esporas se tiñen de color verde y las células vegetativas de color rojo. (Figura 1.2)

Se determinó el tamaño promedio de las esporas y células vegetativas. El promedio y la desviación Standard fueron calculados en base a medidas tomadas en 10 campos diferentes en un total de 50 repeticiones. (Tablas 1.3 y 1.4).

1.2.1.4. TINCIÓN TRIPLE

Para observar simultáneamente esporas, inclusiones lipídicas y células vegetativas, se utilizó una técnica de coloración triple (Holbrook and Andersson, 1980)

Los frotis bacterianos se cubrieron con un rectángulo de papel de filtro y se saturaron con verde de malaquita. Así fueron colocados en Baño María a 100°C durante 4 minutos, se llevaron a temperatura ambiente y se lavaron con agua corriente durante 30 segundos. Se cubrieron con Sudán Black durante 5 minutos y se aclararon con xilol por 5 segundos. Luego se secaron con papel secante, tiñeron con solución al 5 % de safranina durante 30 segundos, se lavaron muy ligeramente y secaron con papel secante para ser examinados al microscopio óptico bajo objetivo de inmersión. (Anexo II). **Observación:** Las esporas se tiñen de color verde, las células vegetativas de color rosa y las inclusiones lipídicas de color negro.

1.2.1.4 COLORACIÓN DE INCLUSIONES CRISTALINAS

Se utiliza para poner de manifiesto la excreción de endotoxinas entomotóxicas, que se forman durante la esporulación para diferenciar a *B. thuringensis* del resto “grupo *cereus*” y de *B. megaterium*.

Se realizó una tinción de inclusiones cristalinas empleando la metodología de Hannay (1953). Los aislamientos se desarrollaron en agar nutritivo e incubaron a 30°C durante 24 h. Luego fueron llevados a temperatura ambiente por 3 días. Los frotis en agua destilada, se secaron al aire y fijaron a la llama, posteriormente se cubrieron con metanol durante 30 segundos, se secaron al aire y cubrieron nuevamente con solución de fucsina fenicada y se expusieron a la llama hasta observar desprendimiento de vapor, se enjuagaron, secaron y examinaron en el microscopio óptico bajo objetivo de inmersión. (Anexo II). **Observación:** Cristales de color morado con forma piramidal,

romboidal, cuboidal o amorfos, fuera o en el interior de la célula bacteriana como inclusiones parasporales. (Figura 1.3).

1.2.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS MEDIANTE PRUEBAS BIOQUÍMICAS, BASADAS EN REACCIONES METABÓLICAS

Todos los aislamientos que presentaron inclusiones lipídicas y esporas que no engrosaron el esporangio, se evaluaron por una selección de pruebas bioquímicas, de acuerdo con protocolos estandarizados (Gordon et al., 1973; Lancette and Harmon, 1980; Pirttijarvi et al., 1999) que se detallan a continuación.

1.2.2.1. REACCIÓN DE CATALASA

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Se encuentra presente en la mayoría de los microorganismos aerobios y anaerobios facultativos que contienen citocromo.

Se tomaron entre una o dos colonias bacterianas de un cultivo de 24h con un palillo estéril, se transfirieron a un portaobjetos y sobre ellas se agregó unas gotas de H_2O_2 de 30V. **Observación:** Presencia de burbujas, en el caso de reacción positiva que indican la presencia de oxígeno.

1.2.2.2. PRODUCCIÓN DE LECITINASA

Las lecitinasas son lipasas que actúan sobre la lecitina de la yema de huevo, produciendo un precipitado de ácidos grasos, que se visualiza como halos opacos alrededor de las colonias.

Se preparó el medio basal de agar nutritivo y luego de enfriarlo a 45 °C se le adicionó una solución de yema de huevo estéril al 5 %, se agitó vigorosamente y se plaqueó en cajas de Petri. Una vez sólido, los aislamientos se sembraron en posición central e incubaron a 30C°. Se evaluó la formación de halos luego de 2, 4 y 7 días de incubación (Anexo I). **Observación de Reacción positiva:** Presencia de un precipitado de ácidos grasos alrededor de las colonias (Figura 1.4 a)

1.2.2.3HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN

El almidón es un biopolímero que está compuesto por dos glucanos amilosa y amilopectina, por lo cual su transporte al interior de la célula es dificultoso. Los microorganismos que excretan amilasas hidrolizan esos polímeros hasta oligo o monosacáridos que son las fuentes de energía para su desarrollo. La hidrólisis de almidón puede determinarse en medios sólidos conteniendo almidón. Se empleó agar nutritivo suplementado con 0.2 % de almidón soluble. Las placas sembradas se incubaron a 30 °C durante 7 días, al cabo de los cuales se cubrieron con Lugol. (Anexo II). **Observación:** Reacción positiva de formación de halos transparentes sobre fondo de color violeta-púrpura (Figura 4d)

1.2.2.4. PRODUCCIÓN DE ACETOINA MEDIANTE LA REACCIÓN DE VOGUES-PROSKAUER (V-P) Y DETERMINACIÓN DE PH EN CALDO V-P.

Consiste en comprobar si el microorganismo estudiado fermenta la glucosa siguiendo la vía butilén glicólica detectando un producto intermedio de la reacción que es el acetil-metil-carbinol o acetoína.

Los aislamientos se desarrollaron durante 7 días a 30 °C en caldo TS adicionado con 0.5% de glucosa. Pasado el tiempo de incubación se tomaron dos alícuotas de 1 ml del cultivo, a una de ellas se le adicionó 3 gotas de reactivo A + 3 gotas del reactivo B y se evaluó a los 15 y 30 min, a la segunda alícuota se le midió el pH con peachímetro (Anexo II). **Observación:** Reacción (+): coloración rojo-rosada, que indica la presencia de acetoina, en la parte superior del tubo (en contacto con el aire).

1.2.2.5. REDUCCIÓN DE NITRATOS.

Esta prueba permite determinar la capacidad de un microorganismo de reducir el nitrato a nitrito o a nitrógeno libre por utilización del nitrato como aceptor final de electrones en la respiración.

Se desarrollaron los aislamientos en caldo nitrato y luego de 3 y 7 días de incubación a 30 °C, se trasvasó 1 ml del cultivo a un tubo y se adicionaron tres gotas de la solución A + 3 gotas de la solución B del Reactivo de Griess. (Anexo II). **Observación:** una coloración rojiza indica reacción positiva (NO_2). Una reacción negativa (coloración amarilla) puede deberse a la producción de nitrógeno (eventualmente señalado por la presencia de micro-burbujas) en el segundo caso se agregan 2 o 3 mg de Zn. Luego de 5 minutos, si la coloración continua amarilla, indica reacción positiva (N_2), en cambio se observa cambio de color al rojo, la reacción es negativa, ya que los nitratos presentes en el tubo han sido reducidos a nitritos por el Zn.

1.2.2.6. UTILIZACIÓN DE ARABINOSA Y MANITOL.

Analiza el metabolismo de los hidratos de carbono, confirmando cuando el organismo utiliza manitol o arabinosa como fuente carbonada, que se observa como un cambio de color en el medio por acidificación del mismo.

Los aislamientos se sembraron en forma de estrías, en tubos tapa con rosca, con el carbohidrato a probar y azul de bromotimol como indicador de pH. Luego de incubarlos a 30 °C se observaron cada 7 días hasta cumplidos los 28 días, registrando los cambios de color. (Anexo I). **Observación.** Una coloración amarilla indica que ese aislamiento ha utilizado el hidrato de carbono ensayado, por acidificación del medio y viraje del indicador de pH.

1.2.2.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TIROSINASA

El pardeamiento enzimático es una reacción de oxidación en la que interviene como sustrato el oxígeno molecular, catalizada por un grupo de enzimas entre ellas la tirosinasa.

Los aislamientos se sembraron como una estría única en posición central, en placas de agar nutritivo suplementado con L-Tirosina al 0,5%, se incubaron a 30°C y se observaron a los 7 días. **Observación:** Reacción positiva: formación de un precipitado marrón rodeando y por debajo de la estría que indica la producción de melanina. (Figura 4g)

1.2.2.8 DETERMINACIÓN DE LA LIQUEFACCIÓN DE LA GELATINA

Esta prueba indica si los microorganismos sintetizan enzimas proteolíticas que licuan la gelatina (gelatinasas)

Se preparó agar nutritivo adicionado con gelatina al 4 % P/V, en tubos tapa con rosca mantenidos en heladera. Los aislamientos se sembraron en profundidad, y se incubaron a 30 °C durante 7 días, utilizando un control negativo. Para realizar la lectura, previamente se colocaron los tubos a 4 °C durante 30 minutos. (Anexo I) **Observación:** En el caso de una reacción positiva, se observa una licuefacción del medio contrastado con el testigo.

1.2.2.9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD β -HEMOLÍTICA Y PATRÓN HEMOLÍTICO DISCONTINUO

La hemoglobina es una heteroproteína de la sangre que transporta oxígeno desde los órganos respiratorios hasta los tejidos en mamíferos, ovíparos y otros animales. La forman cuatro cadenas polipeptídicas (globinas) a cada una de las cuales se une un grupo hemo, cuyo átomo de hierro es capaz de unirse de forma reversible al oxígeno. El grupo hemo se forma por:

1. Unión de la Succinil CoA (formado en ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico) a un aminoácido glicina formando un grupo pirrol.
2. Cuatro grupos pirrol se unen formando la Protoporfirina IX.
3. La protoporfirina IX se une a una molécula de hierro ferroso (Fe^{2+}) formando el grupo hemo.

Las hemolisinas son enzimas que lisan los hematíes. Las bacterias que producen estas enzimas lisan los glóbulos rojos, esto se observa en forma de halos transparentes alrededor de las colonias bacterianas cuando se cultivan en medios con sangre. Actualmente hay descritas 5 hemolisinas: alfa, beta, gamma, delta y delta-variante que producen los diferentes tipos de hemólisis que se detallan a continuación.

Alfa hemólisis. Parcial destrucción de los glóbulos rojos cerca de la colonia, acompañado de una coloración verde marrón del medio, dado que el grupo heme de la hemoglobina es oxidado a biliverdina.

Beta hemólisis. Una zona clara, incolora alrededor de la colonia por destrucción completa de los glóbulos rojos.

Hemólisis beta discontinua. Pequeño halo de células parcialmente lisadas adyacente a la colonia bacteriana, rodeada por una zona de hemólisis completa

Gamma hemólisis. Se produce cuando la hemólisis es incompleta que se observa como una decoloración en la superficie de las colonias, pero no hay formación de biliverdina.

Alfa-beta hemólisis. Colonias que presentan alfa hemólisis primaria, que es una hemólisis alfa que se extiende de la colonia hacia abajo con beta hemólisis

Los aislamientos se sembraron en agar nutritivo suplementado con 0,15M de ClNa + 5% de sangre ovina (Anexo I) y se incubaron a 30 °C. Las placas fueron evaluadas a los 24, 48 y 72 h.

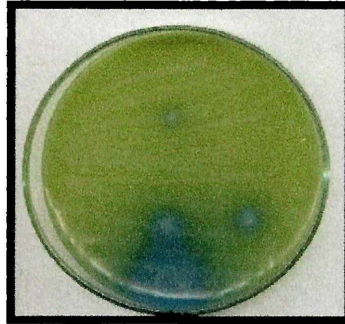
Todos los medios de cultivo y soluciones utilizadas se detallan en los **ANEXOS I Y II**

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

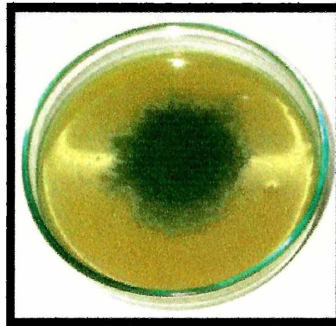
Se obtuvieron 132 aislamientos de *B cereus*, 53 de *B. megaterium*, 7 de *B. mycoides* y 5 *B. thuringensis*, los cuales se identificaron en base a características morfológicas, color de las colonias en agar PEMBA y técnicas de coloración. En la figura 1.1 se observan los tres tipos de morfología de colonia obtenidos en agar PEMBA. En el Apéndice (Tablas 1A y 2A) se detalla el origen de los aislamientos y se incluyen tres cepas de colecciones internacionales de referencia.

Figura 1.1 Colonias de los aislamientos de muestras de mieles en agar PEMBA. **A.** Colonias crenadas y de color turquesa de *Bacillus cereus* sobre fondo verde manzana. **B.** Desarrollo rizoidal color turquesa de *Bacillus mycoides*. **C.** Colonias de *Bacillus megaterium* color amarillas con *clearing* del medio.

A



B



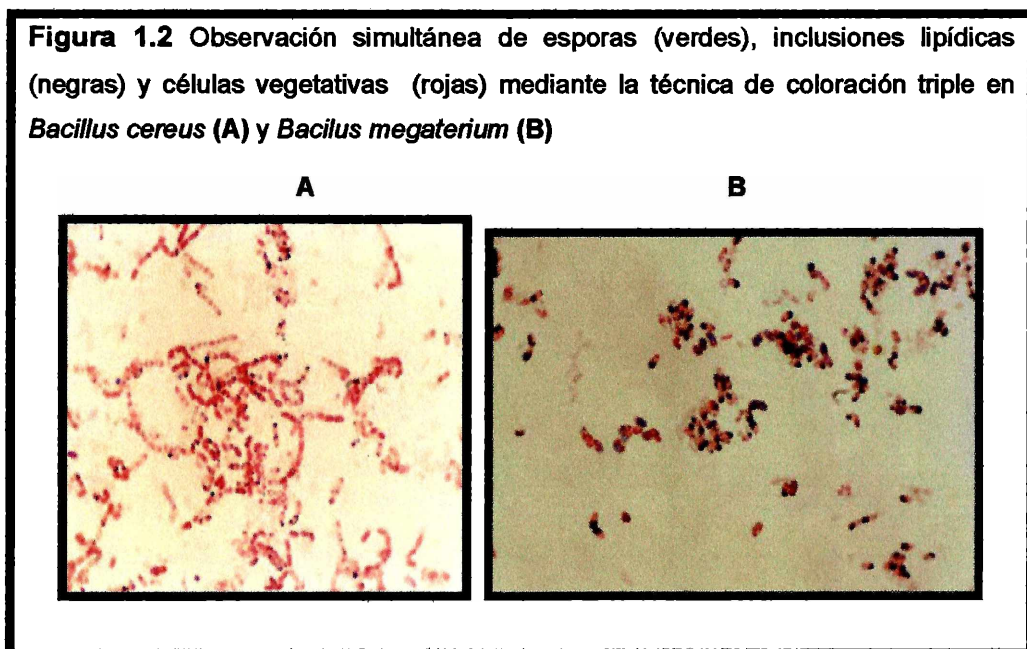
C



Todos los aislamientos resultaron Gram (+), presentaron inclusiones lipídicas que se tiñen de color negro dentro de las células vegetativas que se tiñen de rojo (Figura 1.2) y esporas centrales que no engrosaron el esporangio.

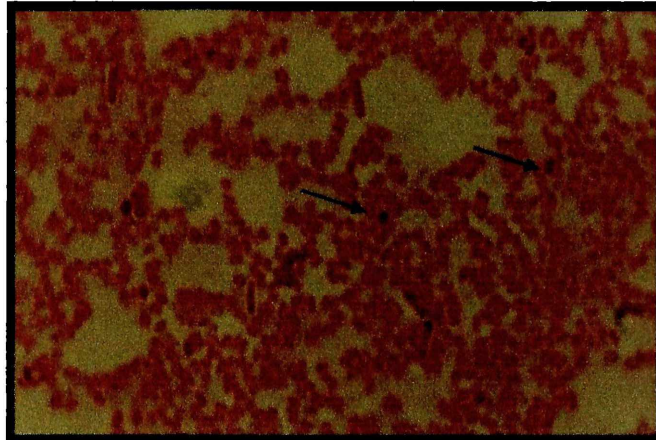
Para los *Bacillus* del “grupo *cereus*” el tamaño promedio de las esporas fue de 0,5 μm de ancho x 1,2 μm de largo, en cambio para *Bacillus megaterium* fue de 0,75 μm de ancho x 1,4 μm de largo.

Con respecto a las células vegetativas las del “grupo *cereus*” presentaron un tamaño promedio de 1,1 μm de ancho x 3 μm de largo en cambio para *Bacillus megaterium* fue de 1,2 μm de ancho, x 3,5 μm de largo



La tinción de cristales entomotóxicos, permitió diferenciar a *B. thuringensis* del resto de las especies del “grupo *cereus*” y de *B megaterim*. Se observaron cristales de color morado fuera o en el interior del cuerpo bacteriano como inclusiones parasporales en 5 de los aislamientos (2%). (Figura 1.3).

Figura 1.3 Cristales entomotóxicos de *Bacillus thuringensis*. La flecha indica los cristales teñidos de color morado intenso.



Los resultados de las características morfológicas y las reacciones de tinción, como la presencia de inclusiones lipídicas, el tamaño y posición central de las esporas bacterianas de los aislamientos de *B. cereus* y *B. megaterium*, resultaron acordes con datos bibliográficos (Harmon et al. 1991).

Todos los aislamientos de *B. cereus* presentaron el mismo perfil metabólico donde se incluyen organismos con sistemas de protección a las especies reactivas al oxígeno (peroxidasas); actividad proteolítica (gelatinasas) y ausencia de fermentación de arabinosa. Dentro de las diferencias metabólicas típicas de la especie (Gordon et al, 1973; ISO, 1993), los resultados mostraron que el 71 % de los aislamientos fermentó la glucosa siguiendo la vía butilén glicólica; el 94 % de los mismos sintetizaron lipasas (Figura 1.a); un 84 % degradó el almidón a través de las α amilasas (Figura 1.c). El 86 % utilizó el nitrato como aceptor final en la cadena de electrones y un 64 % presentó una reacción de oxidación en la que interviene como sustrato el oxígeno molecular (actividad tirosinasa) (Figura 1.e); el 91% de los

aislamientos lisó los globulos rojos por intermedio de beta hemolisinas, y un 11 % de ellos presentó un patrón discontinuo deβ hemólisis. (Figura 1.d).

Durante el trabajo fueron encontradas algunas cepas de *B. cereus* con características metabólicas atípicas representadas por aislamientos sin la capacidad de hidrolizar los lipidos mediante las lecitinasas (4%); sin la capacidad de utilizar el manitol como fuente de carbono (14 %) y sin la capacidad de lisar los glóbulos rojos (5 %). Estas características diferenciales fueron observadas por otros autores cuando analizaron aislamientos de *B. cereus* provenientes de muestras ambientales y de la industria láctea (Pirttijarvi et al., 1998 y 1999), lo que indicaría que *B. cereus* podría desarrollar en otros nichos ecológicos. Asimismo, la ausencia de lecitinasas y falta de actividad hemolítica podrían estar correlacionadas con la falta de toxicidad de esos aislamientos.

Con respecto a *B. megaterium*, todos los aislamientos presentaron un mismo perfil metabólico en el que se incluyen organismos con sistemas de protección a las especies reactivas del oxígeno (peroxidases); actividad proteolítica (gelatinasas) y fermentación de la arabinosa. Dentro de las diferencias metabólicas (Gordon et al, 1973; ISO, 1993), los resultados mostraron que el 31 % de los aislamientos fermentó la glucosa siguiendo la vía butilén glicólica; un 84 % degradó el almidón a traves de las α amilasas, el 86 % utilizó el nitrato como aceptor final en la cadena de electrones y un 21 % presentó una reacción de oxidación en la que interviene como sustrato el oxígeno molecular. No obstante, se encontraron algunas cepas de *B. megaterium* con características metabólicas no citadas, previamente que estarían representadas por aislamientos con la capacidad de hidrolizar los

lípidos por medio de las lecitinasas (4%); un 13% no fermentó el manitol y un 75 % presentó actividad hemolítica a través de β hemolisinas.

La producción de beta hemolisinas representa el primer registro a nivel mundial de actividad hemolítica en aislamientos de *B. megaterium* y podría estar correlacionada con la producción de toxinas como ha sido citado en *B. cereus*.

Es importante destacar que tanto en *B. cereus* (19%) como en *B. megaterium* (72%), se observó una reacción de clarificación (*Clearing*) en agar nutritivo suplementado con yema de huevo, la cual nunca había sido determinada en el género *Bacillus*. Esta reacción de clarificación (*clearing*), podría relacionarse con una actividad proteolítica –lipolítica, como en el caso de *Staphylococcus aureus* cuando desarrolla en dicho medio (Hapton 1991).

La alta proporción de *Bacillus cereus* (30%) encontrada en muestras de mieles, no debería ser subestimada ya que muchas de estas cepas son productoras de enterotoxinas. La diferencia entre los valores encontrados por otros autores (Iurlina et al, 2005), y los encontrados en este trabajo, podría deberse a la presencia de cepas con características metabólicas atípicas detectadas. El hecho de no considerarlas implicaría una disminución del 5 % en el valor real de los recuentos rutinarios de *Bacillus cereus* en alimentos.

Según el Código Alimentario Argentino, la miel debe responder a las siguientes características microbiológicas: a). Gérmenes aerobios no patógenos un máximo de 150×10^3 UFC/g, b). Hongos un máximo de 10^2 UFC/g y c). Ausencia de gérmenes patógenos, sin tipificar los diferentes microorganismos incluidos en a). Por lo tanto, en diagnósticos de rutina no se asocia a una ETA por consumo de miel contaminada.

En el presente trabajo de tesis el 25 % de *B. cereus* y el 2 % de *B. megaterium* produjeron algún tipo de toxinas (Capítulo 3), razón por la cual es recomendable considerar a *B. megaterium* en los análisis de rutina.

Figura 1.4. Caracterización de los aislamientos mediante pruebas bioquímicas, basadas en reacciones metabólicas. a) Actividad lecitinasas b) Reacción de *clearing* c) Actividad amilasa d) Actividad beta hemolítica e) Actividad tirosinasa.

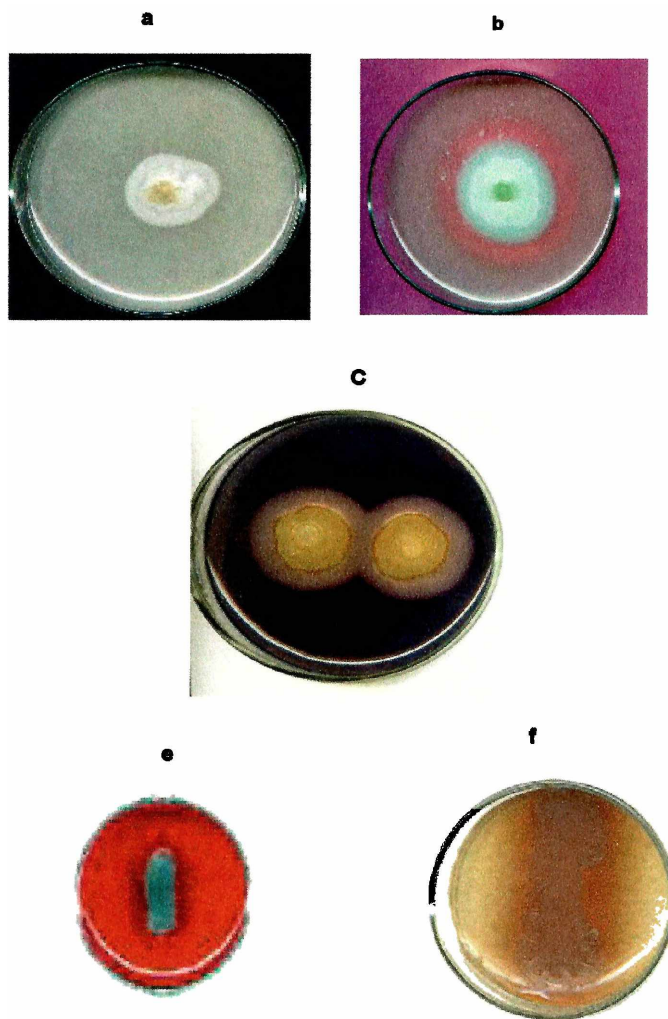


Tabla 1.1. Propiedades Bioquímicas y características morfológicas de las cepas de *Bacillus cereus* aisladas de miel.

cepa	Reacción V-P/ pH en caldo V-P	Producción de lecitinasa	Utilización De manitol	Hidrólisis de almidón	Reducción de nitratos	Descomposición de L-Tirosina	Actividad β hemólisis	Utilización de D(-)arabinosa	Esporas (μ m)		Células vegetativas (μ m)	
									Largo ^a	Ancho ^a	Largo ^a	Ancho ^a
ATCC11778 ^b	+ 4.79	+	-	+	+	+	+	-	1	0,95±0,16	2,45±0,09	1
Bc1	+ 4,92	+	-	+	+	+	+	-	1	0,70±0,15	2,50±0,09	1
Bc2	+ 4,97	+	-	+	+	+	+	-	1,15±0,16	1	4,10±0,97	1
Bc3	+ 5,66	+	+	+	+	+	+	-	1	1	2,50±0,15	1
Bc4	+ 5,22	+	-	+	+	+	+	-	1	1	2,94±0,75	1
Bc5	+ 5,14	+	-	+	+	-	+	-	1,06±0,13	0,70±0,25	3,60±0,73	1
Bc6	+ 5,04	+	-	+	+	+	+	-	1	1	1,04±0,08	1
Bc7	+ 4,99	+	-	+	-	+	+	-	1	0,91±0,15	2,92±0,72	1
Bc8	+ 5,55	+	-	-	-	-	+	-	1	1	3,13±0,49	1
Bc9	+ 5,07	+	-	-	-	-	+	-	1,27±0,09	1	3,52±0,47	1,05±0,09
Bc10	+ 5,05	+	-	-	+	+	+	-	1,11±0,10	1	2,27±0,64	1,16±0,16
Bc11	+ 4,97	+	-	-	+	-	+	-	1,12±0,16	1	3,19±0,83	1
Bc12	+ 5,52	+	-	+	+	-	+	-	1	1	3,56±0,74	0,96±0,08
Bc13	- 5,69	+	-	+	+	-	-	-	1	0,5	2,80±0,64	0,5
Bc14	+ 4,92	+	-	+	+	+	+	-	1	0,85±0,24	3,03±1,25	1
Bc15	- 5,83	+	-	+	+	-	+	-	1,06±0,13	1	2,70±0,61	1
Bc16	+ 5,66	+	+	+	+	+	+	-	1	1	3,31±0,62	0,89±0,19
Bc17	+ 5,27	+	-	+	+	-	+	-	1	1	2,64±0,70	1
Bc18	- 6,86	+	-	+	+	-	+	-	1	1	3,30±0,72	0,65±0,16
Bc19	+ 6,65	+	-	+	+	-	+	-	1	0,5	3,05±0,10	1
Bc20	+ 5,06	+	-	+	+	+	+	-	1,20±0,15	1	3,57±0,73	1
Bc21	+ 4,96	+	-	+	+	+	D	-	1	1	2,50±0,23	1
Bc22	+ 5,09	+	-	+	+	+	+	-	1	0,64±0,21	2,56±0,72	1
Bc23	+ 5,19	+	-	+	+	+	+	-	1,27±0,09	1	2,97±0,53	1
Bc24	+ 5,82	+	-	+	+	+	+	-	1,06±0,13	1	2,80±0,60	0,90±0,15
Bc25	- 5,17	+	-	-	-	+	D	-	1	0,92±0,19	2,83±0,65	1
Bc26	+ 4,39	+	-	+	+	+	+	-	1,15±0,16	1	3,11±0,99	1
Bc27	+ 4,15	+	-	+	+	-	+	-	1	0,5	2,86±0,64	1
Bc28	+ 5,66	+	-	+	+	+	+	-	1	1	3,30±0,72	1
Bc29	+ 4,20	+	-	+	+	+	+	-	1,26±0,20	1	3,43±0,59	1
Bc30	+ 4,96	+	-	+	+	-	+	-	1	1	2,69±0,70	1
Bc31	+ 4,44	+	+	+	+	-	+	-	1,09±0,15	1	2,60±0,48	1,08±0,14
Bc32	+ 5,07	+	-	+	+	+	+	-	1	1	2,73±0,68	1
Bc33	- 5,02	+	-	+	+	-	+	-	1	1	2,73±0,77	1,11±0,15
Bc34	+ 4,34	+	-	+	+	+	+	-	1	1	2,62±0,74	1
Bc35	- 5,90	+	-	+	+	+	+	-	1	0,5	1,80±0,42	0,5
Bc36	- 5,79	+	-	+	+	-	+	-	1,45±0,40	1	4,06±0,93	1
Bc37	- 5,70	+	-	+	+	-	D	-	1,04±0,08	0,94±0,12	2,67±0,50	1
Bc38	+ 5,86	+	-	+	+	-	+	-	1,2±0,42	1	2,56±0,87	1
Bc39	+ 5,17	+	-	+	+	-	-	-	1	0,5	2,48±0,68	1
Bc40	+ 5,04	+	-	+	-	-	+	-	1,42±0,51	1	3,78±0,86	1

Continuación Tabla1. 1

cepa	Reacción V-PI pH en caldo V-P	Producción de lecitina	Utilización De manitol	Hidrólisis de almidón	Reducción de nitratos	Descomposición De L-Tirosina	Actividad β hemólisis	Utilización de D (-)arabinosa	Esporas (μ m)		Células vegetativas (μ m)	
									Largo ^a	Ancho ^a	Largo ^a	Ancho ^a
Bc41	+ 5.04	+	-	+	+	+	+	-	1	1	2.89±0.37	1
Bc42	+ 5.65	+	-	+	-	-	+	-	1.31±0.17	1	3.0±0.58	1.05±0.12
Bc43	- 5.81	+	+	+	+	+	+	-	1	1	2.42±0.68	1
Bc44	+ 5.4	+	-	+	+	-	+	-	1.22±0.27	1	2.40±0.54	1
Bc45	- 4.80	+	-	-	+	+	+	-	1.27±0.09	1	3.52±0.47	1.05±0.09
Bc46	- 5.96	+	-	+	+	+	+	-	1.48±0.43	1	2	1
Bc47	+ 4.88	+	-	+	-	-	D	-	1.20±0.13	1	3.20±0.60	1
Bc48	+ 5.26	+	-	+	+	+	D	-	1	1	2.80±0.58	1
Bc49	- 4.12	+	+	+	+	+	+	-	1.30±0.20	1	3.20±0.97	1
Bc50	- 4.58	+	+	+	+	+	+	-	1	0.62±0.20	2.84±0.80	1
Bc51	+ 5.11	+	-	-	+	+	+	-	1.36±0.26	1	2.78±0.73	1
Bc52	+ 4.08	+	-	+	+	+	+	-	1	1	2.77±0.74	1
Bc53	- 5.4	+	-	-	+	-	-	-	1	1	2.48±0.86	1
Bc54	+ 5.3	+	-	+	+	+	D	-	1.03±0.09	1	3.39±0.46	1
Bc55	- 4.0	+	+	+	+	-	+	-	1.20±0.27	1	3.20±0.59	1
Bc56	+ 4.40	+	+	+	+	-	+	-	1.32±0.23	1	3.04±0.78	1
Bc57	- 4.02	+	+	+	+	+	+	-	1.24±0.13	1	2.50±0.67	1
Bc58	- 4.58	+	+	+	+	-	-	-	1.22±0.14	1	2.96±0.86	1
Bc59	- 4.57	+	-	+	+	+	+	-	1.34±0.16	1	3.15±0.87	1
Bc60	+ 5.0	+	-	+	+	-	-	-	1.33±0.29	1	3.18±0.65	1
Bc61	+ 4.50	-	-	+	+	+	+	-	1.83±0.39	1	3.03±1.16	1
Bc62	- 6.08	+	+	+	+	+	-	-	1	1	3.71±0.78	1
Bc63	- 5.82	+	-	+	+	+	+	-	1.18±0.15	1	3.38±0.62	1
Bc64	- 5.20	+	-	+	+	+	+	-	1	1	2.72±0.72	1
Bc65	- 5.15	+	+	+	+	+	+	-	1	1	3.15±0.87	1
Bc66	+ 6.62	+	-	+	-	-	+	-	1	0,5	1.97±0.09	1
Bc66	+ 6.08	+	-	+	+	-	+	-	1.19±0.16	1	2.92±0.92	1
Bc67	+ 5.77	+	-	+	+	+	+	-	1.17±0.16	1	2.54±0.49	1
Bc68	- 5.46	+	-	+	+	+	+	-	1.17±0.09	1	2.52±0.25	1
Bc69	- 5.25	+	-	+	+	+	+	-	1	0,60±0.11	2.92±0.72	1
Bc70	- 5.33	+	-	+	+	+	+	-	1.30±0.29	1	3.60±0.67	1
Bc71	+ 6.47	+	-	+	-	-	+	-	1.84±0.24	1	3.25±0.83	1
Bc72	- 5.13	+	-	+	+	-	D	-	1	1	2.70±0.55	1.16±0.10
Bc73	- 5.08	+	-	+	+	-	+	-	1.88±0.10	1	2.79±0.61	1
Bc74	- 5.07	+	-	+	+	+	D	-	1.05±0.09	1	2.89±0.78	1
Bc75	+ 6.09	+	-	+	-	-	+	-	1.02±0.10	1	2.70±0.66	1
Bc76	+ 5.37	+	-	+	+	-	+	-	1.18±0.16	1	2.67±0.63	1
Bc77	+ 5.47	+	-	+	+	-	+	-	1.10±0.15	1	2.80±0.72	1
Bc78	+ 5.28	+	-	-	+	-	+	-	1.06±0.13	1	3.16±0.46	1
Bc79	+ 5.48	+	-	-	+	-	+	-	1	0.95±0.12	2.58±0.65	1
Bc80	+ 5.35	+	-	-	+	+	+	-	1.05±0.08	1	2.29±0.40	1
Bc81	+ 5.38	+	-	-	+	+	D	-	1.06±0.09	1	2.17±0.47	1
Bc82	+ 5.38	+	-	-	+	+	+	-	2.56±0.65	1	1.06±0.09	1

Continuación Tabla 1.1

cepa	Reacción V-P/ pH en caldo V-P	Producción de lecitinasa	Utilización De manitol	Hidrólisis de almidón	Reducción de nitratos	Descomposición De L-Tirosina	Actividad β hemólisis	Utilización de D (-)arabinosa	Esporas (μ m)		Células vegetativas (μ m)	
									Largo ^a	Ancho ^a	Largo ^a	Ancho ^a
Bc83	+ 5.32	+	-	-	+	+	+	-	1,02±0,06	1	2,49±0,60	1
Bc84	+ 5.40	+	-	-	+	+	D	-	1	1	2,56±0,72	1
Bc85	+ 5.33	+	-	-	+	+	+	-	1,37±0,16	1,03±0,08	3,54±0,76	1,06±0,09
Bc86	+ 5.08	+	-	-	+	+	-	-	1	0,80±0,15	2,89±0,66	1,04±0,08
Bc87	+ 5.18	+	-	-	+	+	+	-	1	0,5	3,42±0,79	1
Bc88	+ 5.30	+	-	-	+	+	D	-	1	0,70±0,16	3,30±0,90	1
Bc89	+ 6.26	+	-	-	+	+	+	-	1,01±0,22	1	2,89±0,09	1
Bc90	- 5.17	+	-	-	+	+	+	-	1,05±0,56	1	3,15±0,65	1
Bc91	+ 4.88	+	-	+	+	+	D	-	1,25±0,23	1	3,30±0,39	1
Bc92	+ 6.05	+	-	+	+	+	D	-	1	1	2,56±0,55	1
Bc93	+ 5.09	+	-	+	+	+	+	-	1,01±0,37	1	2,80±0,09	1
Bc94	- 6.00	+	-	-	+	-	+	-	1,08±0,28	1	4,20±0,94	1
Bc95	+ 6.09	+	-	+	+	+	-	-	1	1	2,95±0,97	1,2
Bc96	+ 5.06	+	-	+	+	-	D	-	1,14±0,09	1	3,62±0,46	1
Bc97	+ 5.25	+	-	-	+	+	+	-	1,01±0,10	1	2,70±0,96	1
Bc98	+ 5.47	+	-	+	+	+	+	-	1,11±0,10	1	2,14±0,57	1
Bc99	- 4.93	+	-	+	+	+	+	-	1,08±0,10	1	2,70±0,74	1
Bc100	+ 5.46	+	-	+	+	-	+	-	1,12±0,10	1	2,90±0,63	1
Bc101	+ 5.49	+	-	-	+	-	+	-	1	0,97±0,07	2,30±0,57	0,96±0,08
Bc102	+ 5.52	+	-	+	+	+	+	-	1,53±0,32	1	4,01±0,55	1,08±0,10
Bc103	+ 5.57	+	-	-	+	+	+	-	1,67±0,37	1,02±0,06	2,44±0,60	1
Bc104	+ 5.56	+	-	+	+	-	+	-	1,60±0,35	1	2,50±0,65	1
Bc105	+ 5.65	+	-	-	-	+	+	-	1,82±0,25	1	2,58±0,72	1
Bc106	+ 5.41	+	+	+	+	+	D	-	1,75±0,26	1	2,68±0,50	1,01±0,10
Bc107	+ 5.50	+	-	+	+	+	+	-	1,77±0,30	1,02±0,09	3,01±0,65	1
Bc108	+ 5.73	+	-	+	-	+	+	-	1,76±0,39	1	2,80±0,62	1
Bc109	+ 5.47	+	-	+	+	+	+	-	1,12±0,35	0,98±0,15	3,20±0,75	1
BC110	+ 5.83	+	-	+	-	+	-	-	1,08±0,10	0,96±0,08	2,72±0,72	1
Bc111	+ 5.83	+	-	+	+	+	+	-	1,10±0,50	0,95±0,09	3,40±0,25	1,01±0,78
Bc112	+ 6.04	+	-	+	+	+	+	-	1,26±0,22	1	3,63±0,39	1
Bc113	+ 6.87	-	+	-	-	-	+	-	1	0,5	2	0,5
Bc114	- 6.16	+	-	+	+	+	D	-	1,32±0,29	1	3,42±0,41	1
Bc115	+ 5.52	+	-	+	+	-	+	-	1	1	3,62±0,46	1
Bc116	- 6.32	+	-	-	-	+	+	-	1	1	2,35±0,51	1
Bc117	+ 5.80	+	-	-	+	+	+	-	1,20±0,08	1	2	1
Bc118	- 6.8	+	-	-	+	+	-	-	1	0,92±0,10	2,47±0,70	1,02±0,06
Bc119	- 6.8	+	-	-	+	+	-	-	1	0,90±0,10	2,57±0,71	1
Bc120	- 5.73	+	-	-	+	+	-	-	1	1	2	1
Bc121	- 5.89	+	-	-	+	+	+	-	1,50±0,25	1	2,10±0,09	1
Bc122	+ 5.45	+	+	-	+	+	-	-	1,12±0,10	1	3,96±0,70	0,86±0,09
Bc123	- 8.90	+	-	+	+	+	+	-	1,43±0,31	1	2,77±0,48	1
Bc124	- 5.81	+	-	+	+	+	+	-	1,15±0,09	1	1,89±0,33	1
Bc125	+ 5.47	-	+	+	-	+	-	-	1,92±0,25	1	3,30±1,08	1

Continuación Tabla 1.1

Cepa	Reacción V-P pH en caldo V-P	Producción de lecitinas	Utilización de manitol	Hidrólisis de almidón	Reducción de nitros	Descomposición de L. tirosina	Actividad β hemólisis	Utilización de D(-) Arabinosa	Esporas (μ m)		Células vegetativas (μ m)	
									Largo ^a	Ancho ^a	Largo ^a	Ancho ^a
Bc126	+ 5.60	+	-	-	+	+	-	-	1	1	2.56 \pm 0.73	1
Bc127	+ 6.3	-	+	+	-	+	+	-	1,61 \pm 0,36	1	2,18 \pm 0,35	1
Bc128	+ 5.46	-	+	+	+	+	+	-	1.20 \pm 0.45	1	2	1
Bc129	+ 5.43	-	+	+	+	+	+	-	1,11 \pm 0,10	1	3,16 \pm ,31	1
Bc130	- 7.33	+	-	-	+	+	+	-	1.05 \pm 0.09	1	2.64 \pm 0.73	1
Bc131	- 6.38	+	-	-	+	-	+	-	1	1	2.86 \pm 0.09	1
Bc132	+ 7.57	+	-	-	+	+	+	-	1.01 \pm 0.08	1	2.55 \pm 0.07	1

Tabla 1.2. Propiedades Bioquímicas y características morfológicas de *Bacillus thuringensis*, *Bacillus mycoides* y *Bacillus megaterium* aislados de miel.

cepa	Reacción V-P pH en caldo V-P	Producción de lecitinas	Utilización De manitol	Hidrólisis de almidón	Reducción de nitros	Descomposición de L-Tirosina	Actividad β hemólisis	Utilización de D (-)arabinosa	Esporas (μ m)		Células vegetativas (μ m)	
									Largo ^a	Ancho ^a	Largo ^a	Ancho ^a
NRRLB-939	- 5.93	-	+	+	+	-	-	+	1	1	3 \pm 0,98	1
Bm1	- 5.23	-	+	-	-	-	-	+	1	1	1,5 \pm 0,71	1
Bm2	- 4.58	-	+	+	+	-	D	+	1,15 \pm 0.16	1	4.10 \pm 0.97	1
Bm3	+ 5.55	-	+	+	+	-	+	+	1	1	2.50 \pm 0.15	1
Bm4	+ 5.40	-	+	+	+	-	+	+	1	1	2,94 \pm 0,75	1
Bm5	- 4.94	-	+	+	+	+	-	+	1,06 \pm 0,13	0,70 \pm 0,25	3,60 \pm 0,73	1
Bm6	+ 6.08	-	+	+	+	-	+	+	1	1	1,04 \pm 0,08	1
Bm7	- 5.86	-	+	+	+	-	+	+	1,8 \pm 0,52	1	2,8 \pm 0,65	1
Bm8	- 4.59	-	+	+	+	+	D	-	1	1	2,8 \pm 0,81	1,8 \pm 0,16
Bm9	- 6.09	+	+	+	+	+	D	+	1	1	2,44 \pm 0,73	1
Bm10	+ 5.94	-	+	-	+	-	+	+	1,4 \pm 0,35	1	2,98 \pm 0,95	1,37 \pm 0,18
Bm11	- 4.01	-	+	+	+	-	+	+	1	0,8 \pm 0,26	2	1
Bm12	+ 5.31	-	+	+	+	+	+	+	1	1	3,56 \pm 0,74	0,96 \pm 0,08
Bm13	+ 5.42	-	+	+	+	-	+	+	1	0,85 \pm 0,24	3,03 \pm 1,25	1
Bm14	- 6.68	-	-	+	+	-	+	+	1,5 \pm 0,13	1	3,2 \pm 0,67	1
Bm15	+ 6.50	-	+	+	+	-	+	+	1,5 \pm 0,24	1	3,37 \pm 0,66	0,97 \pm 0,10
Bm16	+ 4.65	-	+	-	-	-	+	+	0,83 \pm 0,25	0,7 \pm 0,42	2,88 \pm 0,54	1
Bm17	+ 5.84	-	-	+	+	-	+	+	1,21 \pm 0,15	1	3,21 \pm 0,65	0,97 \pm 0,10
Bm18	+ 6.86	-	+	+	+	-	+	+	1,33 \pm 0,30	0,89 \pm ,15	2,95 \pm 0,81	1
Bm19	+ 5.98	-	-	-	-	-	+	+	1	0,72 \pm 0,21	3,0 \pm 0,97	0,5
Bm20	+ 5.52	-	+	+	+	-	α	+	1,04 \pm 0,08	0,94 \pm 0,09	2,63 \pm 0,78	1
Bm21	+ 6.38	-	-	+	+	-	-	+	1,2 \pm 0,10	1	2,32 \pm 0,47	1
Bm22	+ 6.36	-	+	+	+	-	+	+	1	1	2,62 \pm 0,97	1
Bm23	- 7.22	-	+	+	+	-	-	+	1,06 \pm 0,13	1	2,31 \pm 0,62	1
Bm24	- 5.77	-	+	+	-	+	-	+	1	0,5	4,7 \pm 0,14	1
Bm25	+ 6.43	-	+	+	+	-	-	+	1,15 \pm 0,16	1	3,11 \pm 0,99	1

Continuación Tabla 1.2

cepa	Reacción V-P pH en caldo V-P	Producción de lecitinasa	Utilización De manitol	Hidrólisis de almidón	Reducción de nitratos	Descomposición del-Tirosina	Actividad β hemólisis	Utilización de D (-)jarabinosa	Esporas (μ m)		Células vegetativas (μ m)	
									Largo ^a	Ancho ^a	Largo ^a	Ancho ^a
Bm26	+ 5.78	-	+	+	+	-	-	+	1	0,5	2,86±0,64	1
Bm27	+ 6.19	-	+	+	+	-	-	+	1,10±0,12	1	3,20±0,45	074±0,12
Bm28	+ 5.97	-	+	+	+	-	+	+	1,26±0,20	1	3,43±0,59	1
Bm29	- 4.06	-	+	+	+	+	D	+	1,06±0,11	1	4,7±,98	1
Bm30	- 5.55	-	+	+	+	-	+	+	1	1	3,10±0,97	1
Bm31	+ 6.14	-	+	+	+	-	+	+	1	1	2,73±0,68	1
Bm32	- 6.11	-	+	+	+	-	-	+	1	1	2,73±0,77	1.11±0.15
Bm33	+ 6.10	-	+	-	+	-	+	+	1	1	2,62±0,74	1
Bm34	- 6,22	-	-	-	-	+	+	-	1,11±0,15	1	2,9±0,98	1,2±0,10
Bm35	+ 6.30	-	+	+	+	-	+	+	1	0,8	2,47±0,96	1
Bm36	- 5.79	-	-	+	+	+	+	-	1,75±0,26	1	3,15±0,89	1
Bm37	- 7.87	-	-	+	+	-	-	+	1,2±0,42	1	2,56±0,87	1
Bm38	- 8.01	-	+	+	+	-	+	+	1	0,95±0,16	2,45±0,09	1
Bm39	- 7.11	-	+	+	+	-	-	+	1	1	2,44±0,66	062±0,20
Bm40	+ 6.70	-	+	+	+	-	+	+	1,10±0,12	1	2	1
Bm41	+ 6.70	-	+	+	+	-	+	+	1	0,5	2,75±0,89	0,5
Bm42	+ 5.39	-	+	+	+	-	+	+	1	5	2,54±0,71	1
Bm43	+ 6.73	-	+	+	+	-	+	+	1	0,5	2,72±0,81	1
Bm44	+ 6.19	-	+	+	+	-	+	+	1,22±0,27	1	2,40±0,54	1
Bm45	+ 6.89	-	+	+	+	-	+	+	1,2±0,26	0,65±0,25	3,15±0,52	0,65±0,5
Bm46	- 6.29	-	+	+	+	-	+	+	1	0,5	2,42±0,60	0,5
Bm47	+ 5.48	-	+	+	+	-	+	+	1,10±0,12	1	2	1
Bm48	- 4.0	-	+	-	+	+	+	+	1,20±0,16	1	2,76±0,77	1
Bm49	+ 6.43	-	+	+	+	-	+	+	1	1	2,65±0,72	1,15±0,16
Bm50	+ 5.57	-	+	-	-	-	+	+	1,1±0,69	1	2,5±0,98	1
Bm51	+ 5.01	-	-	+	+	+	+	+	1,1±0,11	1	1,8±0,45	1
Bm52	- 6.88	-	+	+	+	-	+	+	1	0,5	2,50±0,71	1
ATCC10206 ^b	+ 5.01	+	-	-	+	-	+	-	1	0,99±0,18	2,55±0,09	1
Bmy1	+ 6.8	+	-	+	+	+	+	-	0,5 ±0,56	1	1 ±0,45	2,4±0,55
Bmy2	- 6.38	+	-	+	+	-	+	-	0,5 ±0,26	1	1±0,65	2,2±0,67
Bmy3	- 4.69	+	-	-	+	+	+	-	1 ±0,35	1±0,26	1	3,4±,58
Bmy4	+ 4.98	+	-	+	+	+	-	-	1 ±0,50	1	1	3,6±0,96
Bmy5	- 5.73	+	-	-	+	+	+	-	1±0,77	1	1	3,2±0,35
Bmy6	- 5.70	+	-	+	+	+	+	-	1	1,3 ±0,81	1,3±0,89	3
Bmy7	- 5.79	+	-	-	+	-	-	-	1	1	1	2
CCT 931 ^b	+ 5.26	-	-	+	+	+	+	-	1	0,70±0,15	2,50±0,09	1
Bth1	- 5.4	-	-	-	+	-	-	-	1,11±0,16	1	4,10±0,97	1
Bth2	- 6.08	-	+	+	+	+	-	-	1	1	2,50±0,15	1
Bth3	+ 5.83	-	-	+	-	+	-	-	1	1	2,94±0,75	1
Bth4	- 5,99	-	-	+	+	+	+	-	1,16±0,15	0,75±0,35	3,60±0,73	1
Bth5	- 6,14	-	-	+	+	+	+	-	1	1	3,2±0,76	1

V-P: Voges –Proskauer

^b Cepas de referencia: ATCC American Type Culture Collection

D: Hemólisis discontinua en placas agar sangre

NRRL Northern Regional Research Laboratory

^a: Promedio \pm Desviación Standard

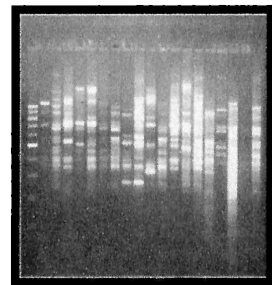
CCT Coleção de Culturas Tropical

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Alippi, A.M. 1995. Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium. *Microbiología SEM* 11: 343 – 350.
- Alippi, A.M; Reynaldi, F.J; López, A.C; De Giusti, M.R, and Aguilar, O.M. 2004. Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae* and incidence of American Foulbrood in Argentinean honeys from Buenos Aires Province. *J of Apicu Research* 43, 135–143.
- Clark, G. 1981 (Editor). Staining procedures. 4th ed. Williams and Wilkins, Baltimore. 512 pp.
- European Commission, 1997. Harmonization of safety criteria for minimally processed foods. Inventory report FAIR concerted action FAIR CT96-1020.
- Gordon, R.E; Haynes, W.C; and Peng, C. H.-N. 1973. *The genus Bacillus*. Agriculture Handbook No. 427, USDA Washington, D.C. 283 pp
- Harmon, S.M; Katter, D; and Lancett, G. 1991. Lipid globule staining to aid in differentiating *Bacillus* species. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74: 649-651.
- Hannay, C.L. 1953. Crystalline inclusions in aerobic spore forming bacteria. *Nature* 172, 1004.
- Harwood, C R. 1989. Vol II. *Bacillus*, Biotechnology Handbooks N° 2. Plenum press, New York, 414 pp
- Hucker, G.J. 1921. A new Modification and application of the Gram stain. *J Bacteriol.* 4:395-397.
- Holbrook, R; and Andersson, J.M. 1980. An improved selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Can. J. Microbiol.* 26: 753-759.
- Hopton, J. 1961. A selective médium for the isolation and eumeration of coagulase positive *Stehylococci* from foods. *J. Appl. Bact.* 24: 121-124.
- ISO, 1993. Microbiology, General guidance for the enumeration of *Bacillus cereus* colony count technique at 30°C. Standard 7932, 2nd ed. International Organization for Standardization, Geneve, Switzerland.
- Iurlina, M.O; and Fritz, R. 2005. Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *International Journal of Food Microbiology* 105: 297–304.
- Lancette, G.A., and Harmon, S.M. 1980. Enumeration and confirmation of *Bacillus cereus* in foods: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63: 581- 586.
- Pirttijarvi, T.S.M; Ahonen, L.M; Maunuksela, L.M; and Salkinoja-Salonen, M.J. 1998. *Bacillus cereus* in a whey process. *International Journal of Food Microbiology.* 44: 31-41.
- Pirttijarvi, T.S.M; Andersson, M.A; Scoging, A.C; and Salkinoja-Salonen, M.J. 1999. Evaluation of methods for recognizing strains of the *Bacillus cereus* group with food poisoning potential among industrial and environmental contaminants. *System. Appl. Microbiol.* 22: 133-144.

CAPITULO II

VARIABILIDAD GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS DE *BACILLUS CEREUS* Y *BACILLUS MEGATERIUM*



Capítulo II

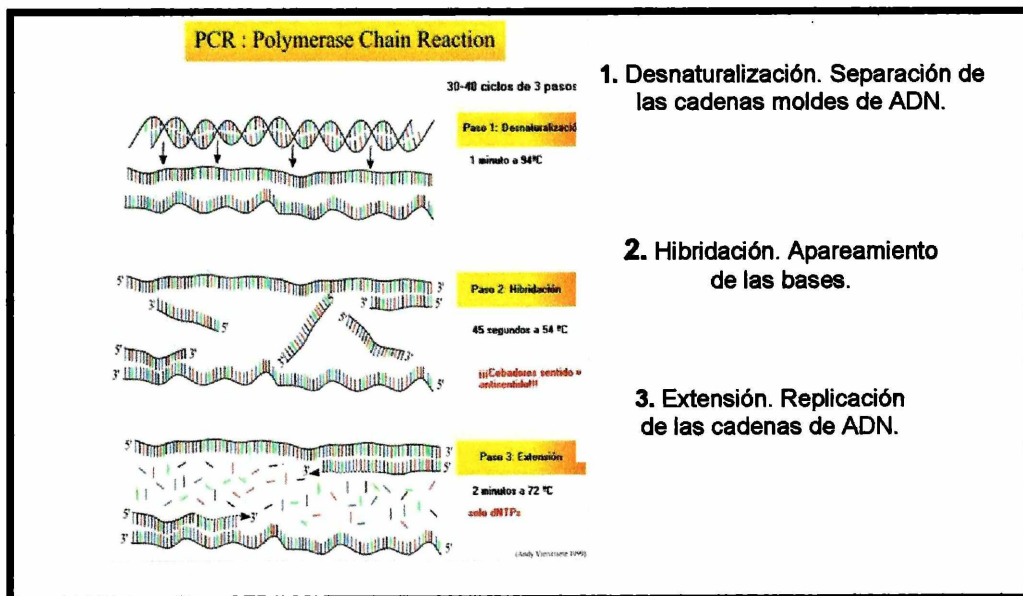
INTRODUCCIÓN**TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

Los avances en la biología molecular han permitido la introducción de métodos basados en el uso de técnicas electroforéticas para la separación de macromoléculas. Entre los métodos moleculares se destacan los genéticos, que estudian el contenido de ADN, tanto cromosómico como plasmídico. Dado que la molécula de ADN es muy estable, y la marca genética a rastrear es el genoma completo o una región concreta de ADN, los análisis a nivel genético serían más precisos que los fenotípicos.

Kary Mullis en 1986 dio a conocer una técnica para la síntesis "in Vitro" de secuencias específicas de ADN a la cual denominó reacción en cadena de la polimerasa o PCR (en inglés Polymerase Chain Reaction). La reacción consiste en la amplificación o replicación enzimática de un fragmento de ADN, pudiendo llegar a copiarse 10^6 veces. Para ello son necesarios un ADN molde, desoxirribonucleótidos (dNTPs), una enzima termoresistente denominada ADN polimerasa y uno (para secuencias aleatorias) o dos (para secuencias conocidas) oligonucleótidos, de entre 10 y 20 pares de nucleótidos complementarios a una región de la secuencia a amplificar. Estos oligonucleótidos reciben el nombre de

iniciadores, cebadores o *primers* y tanto la elección de los mismos como la temperatura utilizada para su hibridación (temperatura de *annealing*), determinaran la especificidad de los fragmentos de ADN obtenidos.

El proceso es cíclico que se compone de varias etapas. **Fase de desnaturalización:** durante la que se consigue la separación de las dos hebras del ADN molde, sometiendo la reacción a una elevada temperatura. **Fase de hibridación:** la temperatura disminuye permitiendo que los iniciadores reconozcan y se unan a sus secuencias complementarias en las cadenas de ADN molde. **Fase de elongación:** la ADN polimerasa se une al iniciador y comienza la síntesis de una hebra complementaria gracias a la incorporación de nucleótidos. El ciclo se repite un número determinado de veces, por lo general entre 30 y 35, con las cadenas sintetizadas actuando como molde. Esta sucesión de ciclos da lugar a un incremento exponencial del número de copias del fragmento de ADN delimitado por los iniciadores.



Los métodos de tipificación genotípicos pueden dividirse en dos grupos: los análisis de restricción y los análisis de amplificación. En los análisis de restricción la comparación del genoma se lleva a cabo mediante el estudio del polimorfismo de los fragmentos de ADN generados *in vitro* por la digestión de enzimas endonucleasas, y su posterior separación electroforética. Dentro de este grupo distinguimos entre aquellos métodos que emplean una electroforesis de campo constante (RFLP, AFLP) o campo pulsante (PFGE).

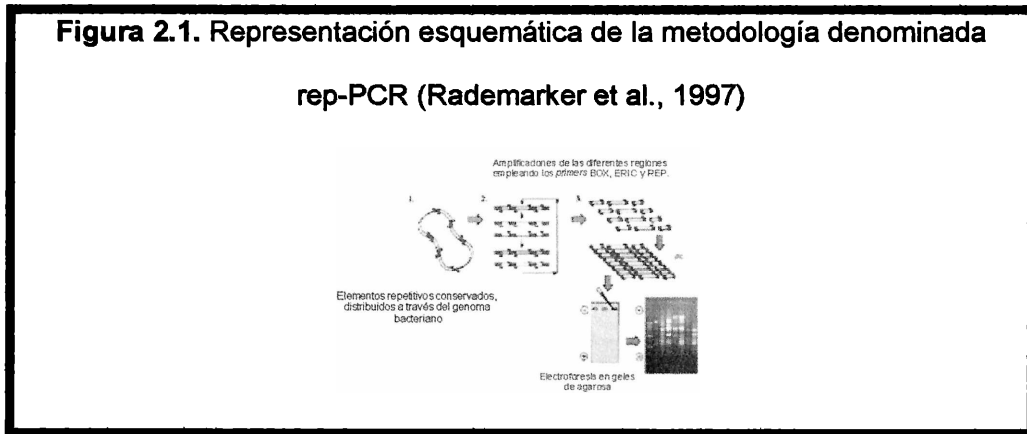
Los análisis de amplificación pueden aplicarse en la amplificación de secuencias conocidas (perfiles de genes determinados) o aleatorias (RAPD, rep-PCR).

La diversidad genética del "*grupo cereus*" ha sido estudiada a través de diferentes metodologías entre las que se citan: MEE (Multilocus Enzyme electrophoresis), PFGE (Pulse-field gel electrophoresis), AFLP (Amplified fragment length polymorphism), (Van Der Zwet et al., 2000), RAPD (Random Amplification of polymorphic DNA), (Ehling-Schulz, 2005) y RFLP (restriction fragment length polymorphism) (Haque and Russell 2005) que se describen a continuación:

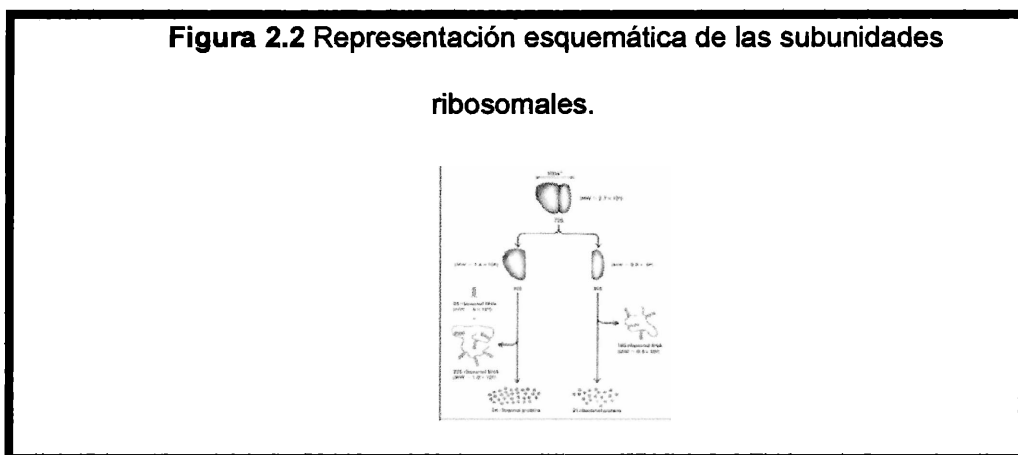
- **MEE.** En esta técnica se comparan las movilidades electroforéticas de distintas enzimas solubles en agua involucradas en el metabolismo. Esta técnica provee información sobre la organización de las variaciones genéticas de una especie. Sin embargo, como mediante este método se evidencia diferencias en las cargas de los aminoácidos, no se revela información a escala fina de las recombinaciones genéticas y esta influenciado por las variaciones metabólicas.

- **PFGE** .Se basa en la generación de patrones de fragmentos de restricción de gran tamaño, obtenidos al digerir el ADN de un organismo con endonucleasas de baja frecuencia de corte. Los fragmentos son separados mediante electroforesis de campo pulsante. La variación de la secuencia de nucleótidos del ADN total de las distintas cepas queda revelada por el polimorfismo de los fragmentos generados.
- **AFLP**. Se basa en el corte del ADN genómico con endonucleasas, generando una cantidad variable de fragmentos. Los fragmentos son amplificados con *primers* de secuencia complementaria a sus extremos; estos *primers* poseen además 1 o 2 bases arbitrarias en uno de sus extremos, lo que resulta en una amplificación selectiva de algunos de dichos fragmentos de ADN. Los polimorfismos observados en los individuos por medio de esta técnica, se deben a que el número de sitios de restricción presentes en el ADN genómico puede variar como resultado de arreglos genéticos (mutaciones, deleciones, inserciones, etc.). Estos cambios en ocasiones, alteran la secuencia de los sitios de corte de las enzimas, o las distancias entre sitios de restricción, generando fragmentos de diferentes tamaños.
- **RAPD**. Consiste en la amplificación al azar de fragmentos de ADN genómico empleando un solo *primer* de secuencia arbitraria. La metodología presenta muchas ventajas pero también ciertas desventajas, como problemas de reproducibilidad intra-laboratorio.

- **PCR-RFLP.** Esta técnica consiste en el corte mediante enzimas de restricción de los productos previamente amplificados por PCR. Si dos amplicones presentan una variación de la secuencia nucleotídica, en los sitios de reconocimientos de las enzimas de restricción, se generarán patrones distintos. Las secuencias de restricción presentan usualmente patrones de distancia, longitud y arreglos diferentes en el ADN de diferentes individuos de una población, por lo que se dice que la población es polimórfica para estos fragmentos de restricción. Dos cepas que presentan perfiles iguales de restricción para 2 enzimas que reconozcan 4 sitios de restricción poseen una similitud de más del 95% en sus secuencias de 16S ARNr (Moyer et al., 1996)
- **rep-PCR.** Se han identificado tres familias de elementos repetitivos, incluyendo la secuencia de 35-40 pb REP (Repetitive Extragenic Palindromic), la secuencia de 124-127 pb ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) y el elemento BOX de 154 pb (Versalovic et al., 1994; Rademarker et al., 1997). Estas secuencias se encuentran distribuidas en posiciones definidas a lo largo del genoma, lo cual motivó el desarrollo de una metodología que se denominó rep-PCR para mostrar las variaciones entre los genomas debido a sus localizaciones relativas. Los elementos repetitivos pueden estar presentes en ambas orientaciones, y se han diseñado oligonucleótidos para iniciar la síntesis hacia fuera de las secuencias repetitivas (ERIC y REP) y para la subunidad boxA de BOX en la reacción de PCR, entre otros.(Figura 2.1)

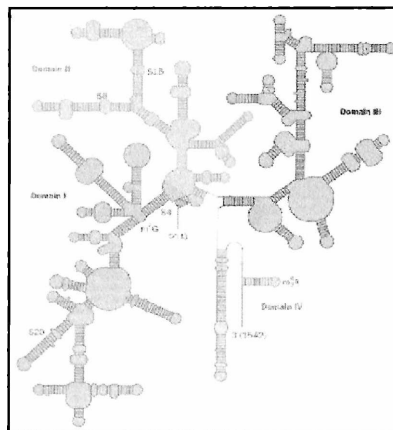


La síntesis de proteínas ocurre en los ribosomas que por ello son constituyentes fundamentales tanto de células eucariotas como de las procariontas. Su composición es de un 35% de proteínas y 65% de ARNs. En eubacterias estos ARNs son 16S ARNr, 23S ARNr y 5S ARNr. La molécula de 16S ARNr forma junto con 21 proteínas la subunidad menor de 30S, mientras que el 23S ARNr junto con el 5S ARNr y 34 proteínas forman la subunidad mayor de 50S. Ambas subunidades se ensamblan para formar el ribosoma funcional con coeficiente de sedimentación de 70S y un diámetro aproximado de 18nm (Figura 2.2)



Entre las principales características del gen 16S ARNr que permiten utilizarlo como marcador filogenético: Los ARNrs están presentes en todos los organismos, su secuencia nucleotídica es altamente conservada en algunas regiones y contiene regiones variables, el porcentaje de mutación es relativamente bajo comparado con otros genes, la estructura primaria de estas moléculas está formada por dominios que han evolucionado independientemente y de esta manera ellos contienen suficientes regiones variables para discriminar entre moléculas diferentes

2.3. Estructura secundaria del gen 16S ARNr. Las zonas más oscuras indican las regiones mas conservadas



En este trabajo se analizará la diversidad genética de *Bacillus cereus* y *B. megaterium* mediante un análisis de amplificación del genoma en forma aleatoria (rep-PCR) (Tabla 2.1) y un análisis de restricción (PCR-RFLP) de un fragmento de 1.1kb, correspondiente al gen 16S rRNA, que se amplifica utilizando dos primers universales (U1 comprendido entre las bases las 514 – 534 de *Escherichia coli* y U2 comprendido entre las bases 1451 -1522 *E coli*) (Tabla 2.2)

RELACIONES TAXONÓMICAS

La taxonomía agrupa a los organismos dentro de un número de grupos cuyas características se mantienen constantes, esto permite la clasificación de las especies. Para estudios evolutivos la clasificación también permite la realización de construcciones filogenéticas (Bruce Weir).

Es necesario distinguir entre datos fenéticos y cladistas. Desde el punto de vista fenético las relaciones están basadas en la similitud a partir de un grupo de características fenotípicas o genotípicas del organismo en estudio, mientras que las relaciones cladistas contienen información de datos ancestrales y pueden ser usados para estudiar las vías de la evolución.

Ambas relaciones son representadas como árboles o dendrogramas (llamados fenogramas o cladogramas, respectivamente).

En general los árboles filogenéticos representan las vías de la evolución y se pueden comparar dendrogramas de las especies con los realizados a partir de los genes. Esta comparación no suele ser igual puesto que los árboles de los genes se construyen a partir de una región reducida del genoma, mientras que los árboles de las especies contienen mayor número de información. Además dos especies pueden tener genes que divergen antes o después de la separación de las especies. En este sentido la elección de la secuencia a comparar juega un papel muy importante en el análisis posterior de los dendrogramas.

Otra distinción que se hace entre los árboles es si son *rooted* (enraizados) o *unrooted* (noenraizados). Un árbol enraizado contiene la noción de un orden temporal, mientras que un árbol no enraizado meramente refleja distancias entre las unidades comparadas y no da la noción de cual es ancestral a cual.

Los agrupamientos generados por una clasificación pueden considerarse como tales cuando cumplen con los siguientes requisitos (William and Dale 1965):

1. En cada clase de más de un objeto debe existir para cada objeto de la clase, otro distinto que comparta con el como mínimo un atributo.
2. El ser miembro de una clase no es en si mismo un atributo.
3. Cada objeto de cualquier clase debe diferir al menos en un atributo de cualquier objeto de otra clase.

Los objetos no pueden clasificarse si se desconocen sus atributos. La clasificación biológica tiene como fin ampliar el conocimiento acerca de los organismos y la comprensión mas profunda de sus propiedades, semejanzas, diferencias e interrelaciones. (Crisci J, 1983).

La taxonomía en biología cumple diferentes funciones entre las cuales se pueden mencionar:

- Identificar y describir la unidad taxonómica básica (especie)
- Encontrar la forma apropiada de catalogar esas unidades

Para evaluar datos y caracteres fenotípicos (organismos vs. caracteres) de las unidades a estudiar se emplea la taxonomía numérica y para evaluar en conjunto datos fenotípicos y genotípicos se emplea la taxonomía polifásica.

TÉCNICAS DE TAXONOMÍA NUMÉRICA

Taxonomía numérica es la rama de la taxonomía, que mediante operaciones matemáticas, calcula la afinidad entre unidades taxonómicas sobre la base del estado de sus caracteres (Crisci J, 1983). Según los principios básicos de Adanson, la taxonomía numérica requiere que se

estudien el mayor número posible de aspectos (rasgos o caracteres) de la biología de los organismos (Sneath and Sokal, 1973)

A pesar de las diversas técnicas numéricas existentes es posible enumerar en ellas una serie de pasos elementales:

- Elección de las unidades. Se eligen los organismos a estudiar y se definen las unidades a clasificar OTU (Unidades taxonómicas operativas)
- Elección de los caracteres. Se escogen aquellos caracteres que mejor describen a las OTU y se registra el estado de los caracteres presentes en ellas.
- Construcción de una matriz básica de datos. Con la información de OTU y caracteres se construye la MBD (Matriz básica de datos)
- Obtención de un coeficiente de similitud. Sobre la base de la MBD y utilizando un coeficiente adecuado para los datos que contiene, se calcula la similitud para cada par posible de unidades taxonómicas.
- Construcción de una matriz de similitud. Con los valores de similitud calculados en el paso anterior y mediante la aplicación de análisis de agrupamientos se obtiene una estructura taxonómica del grupo de estudio.

Para efectuar los dos últimos pasos es necesario elegir un coeficiente de asociación, los cuales miden las coincidencias y diferencias en los estados de caracteres entre dos OTU. Los utilizados en esta tesis fueron:

- SM Simple matching coefficient: mide las presencias y ausencias como proporción del número total de caracteres., dando igual peso a todos. $(a + d / a+b+c+d)$
- J Jaccard: Descuenta las ausencias de caracteres $(a / a+ b+c)$

- **SD Dice: Confiere mayor peso a las coincidencias (duplica el valor de a) $(2a / 2a + b + c)$**

Dónde:

a. Es el número de caracteres en los cuales el mismo estado es compartido por las OTU.

b. Es el número de caracteres en los cuales un estado es poseído por la primer OTU, pero no por otras.

c. Es el número de caracteres en los cuales un estado esta ausente en la primera OTU y presente en la segunda

d. Es el número de caracteres en los cuales el mismo estado esta ausente en ambas OTU.

Luego de escoger las OTU, el paso siguiente es la búsqueda de evidencia taxonómica que permita clasificar esas unidades, por lo tanto todo proceso clasificatorio se basa en diferencias entre los objetos a estudiar (Crisci, 1983). Esta variación esta representada por los caracteres, que se definen como cualquier propiedad que varía en las OTU (Sneath y Sokal, 1973)

El término homología sufrió variaciones hasta 1859, en dónde adquirió un sentido biológico más preciso, debido a la teoría Darwiniana. Se transcriben a continuación algunas definiciones:

- **Dos o mas estados de un mismo organismo o de dos o más organismos son homólogos si se originan filogenéticamente en el mismo estado del mas reciente antecesor común de los organismos comparados (Bock, 1978)**
- **Estados homólogos son aquellos que pueden ser considerados como sucesivos estados de transformación de un estado inicial (Hennig, 1968)**

- Homólogos son los estados de los caracteres de dos o más organismos cuyo origen puede determinarse en el mismo estado del carácter del antecesor común de esos organismos (Mayr, 1969)
- Dos estados son homólogos si se originan filogenéticamente uno del otro, o de una base hereditaria común (Bertalanffy, 1975)

Según Sneath y Sokal (1979), dos estados son homólogos cuando se corresponden en su composición y estructura. La correspondencia en la composición se denomina similitud cualitativa (desde el punto de vista biológico), y la correspondencia estructural es la similitud en cuanto a orden de sus partes; en la estructura de sus fenómenos bioquímicos o en el orden secuencial de las sustancias o estructuras organizadas (Crisci, 1983)

En la historia de la filogenia se pueden describir tres métodos principales de ordenamientos:

1. **Método de matriz de distancia:** Se basa en un grupo de distancias calculadas entre cada par de especies, entre ellos mencionaremos en *neighbor-joining* (NJ). La calidad de los árboles depende de la calidad de las distancias medidas.
2. **Método de máxima parsimonia:** Este método busca la minimización del número de cambios entre especies, requiere además valores constantes de cambios entre especies. Bajo el criterio de parsimonia se elige la hipótesis más simple para explicar los datos y la inferencia de filogenias se realiza seleccionando el o los árboles que presentan el menor número de pasos evolutivos.
3. **Método de máxima verosimilitud (MV):** Bajo el criterio de MV se concluye que la historia con mayor probabilidad de originar el estado actual de hechos es la hipótesis de elección frente a otra historia con menor probabilidad de

producir ese mismo estado (Swofford et al., 1996). Esta clase de construcciones es computacionalmente demandante, usan eficientemente todos los datos y reducen todo a un grupo de distancias. Se los suele utilizar para hacer inferencias estadísticas.

Para estudiar el significado estadístico de las ramas individuales dentro de un árbol, puede realizarse un análisis de *bootstrapping*. El mismo consiste en "muestreo con reemplazo", donde cada columna del alineamiento puede utilizarse como "muestra" para generar un determinado número de alineamientos artificiales (usualmente 100). A partir de cada uno de estos se produce un árbol y se registra en cuántos de ellos se encuentran los mismos patrones de ramas. Si un determinado patrón se obtiene en un 70% de los árboles se dice que tiene un respaldo del 70%. Las ramas que tienen un valor de *bootstrapping* mayor al 70% tienen una probabilidad del 95% de ser correctas (Lake and Moore, 1998).

En este trabajo de tesis se emplearán principalmente dendrogramas de similitud (fenogramas)

Hipótesis. Las poblaciones de *B. cereus* y *B. megaterium* aisladas de miel son heteróneas.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 OBTENCIÓN DEL MOLDE DE ADN PARA LAS REACCIONES DE PCR.

Se emplearon dos protocolos para la extracción de ADN, el primero por extracción directa de colonia y el segundo empleando una mezcla fenol-cloroformo.

Para obtener el ADN crudo por extracción directa se utilizó una resina de intercambio iónico (Walsh et al., 1991) de acuerdo con el siguiente protocolo:

Los aislamientos se desarrollaron durante 24 h. en agar TS (Anexo I). Se tomaron dos colonias y trasvasaron a un eppendorff con 200 µl de agua bidestilada, se mezclaron vigorosamente con *vortex* durante 20 segundos y centrifugaron a 13000g durante 4 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet se resuspendió, cuidadosamente, en 150 µl de una suspensión acuosa de resina Chelex al 6 % (Chelex 100, BIO-RAD). La mezcla se incubó en un baño seco a 56°C durante 15 minutos al cabo de los cuales se mezcló con *vortex* durante 1 minuto y volvió a incubarse a 99 °C durante 15 minutos. Los *stocks* se conservaron a – 20°C.

Para el segundo método se empleó la técnica descrita por Sambrook and Russell (2001) que se detalla a continuación:

Los cultivos se desarrollaron en caldo TS a 30 °C, durante 24h. Se tomaron entre 1 o 2 ml del cultivo y centrifugaron a 13000g durante 4 minutos. Después de eliminar el sobrenadante, el pellet fue sometido a dos pasos de lavado, primero con 600 µl de ClNa 1 M y luego con 700 µl de TES (Anexo III).

El pellet se resuspendió en TE (Anexo III) por agitación con *vortex* y posterior centrifugación a 13000g durante 3 minutos. Luego del último lavado y eliminación de sobrenadante, el pellet fue resuspendido en 500 µl de TE (pH 7.5) y se le adicionó 0,01 gr. de lizosima (Sigma®) (Anexo III). La mezcla fue homogenizada con *vortex*. Se incubó a 60 °C durante 15 minutos y se dejó en reposo a temperatura ambiente por 20 minutos, al cabo de los cuales se resuspendió en 100 µl de sarcosil pronasa (Anexo III) e incubó 1 hora a 37°C. Para la extracción del ADN se le adicionó a la mezcla 600µl de fenol-Cloroformo-Isoamilico (25:24:1) y centrifugó a 13000g durante 10 minutos, el sobrenadante obtenido fue trasvasado a un eppendorff estéril. Para realizar la separación de las fases del paso anterior, la muestra fue centrifugada a 13000g durante 6-8 minutos y al sobrenadante se le realizó una extracción más. El ADN obtenido se concentró por precipitación en frío (al sobrenadante de la última extracción se le adicionó acetato de amonio a una concentración final 0.3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío), se dejó evaporar el alcohol y la muestra que contiene el ADN se resuspendió en 100 µl de agua bidestilada estéril, manteniéndose en un baño seco a 65 °C durante 1 hora. Los *stocks* de ADN se guardaron a – 20°C.

2.2 OBTENCIÓN DE LOS PERFILES DE *FINGERPRINT* DE ADN, UTILIZANDO LOS *PRIMERS* BOX, ERIC Y REP.

Para el estudio de los perfiles "*fingerprint*" de las 133 cepas de *Bacillus cereus* y 53 de *Bacillus megaterium*. Se utilizó el siguiente protocolo experimental

La mezcla de reacción para PCR se preparó en un volumen final de 25 μl , conteniendo 2.5 μM *primers* según cada reacción, BOX, REP o ERIC (Tabla 2.1), buffer Promega® (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 9.0, and 0,1% triton X-100), desoxirribonucleótidos (dGTP, dTTP, dATP, dCTP), en una concentración de 2mM; 3mM Cl_2Mg ; 1 U Taq polimerasa (Promega®), a la que se le adicionó una alícuota de 10 μl del sobrenadante de la preparación rápida de ADN crudo.

Se emplearon dos condiciones de ciclado diferentes según el ciclador térmico utilizado. Cuando se empleo el ciclador térmico *PerKin Elmer*, fueron las mismas que las descritas por Alippi y Aguilar (1998). En cambio se efectuaron diferentes modificaciones cuando el ciclador utilizado fue *Mastercycler personal* (Eppendorf, Hamburg, Germany), se efectuaron modificaciones que se detallan a continuación:

Primer BOX. un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C 1.0 minuto, 1 minuto de *annealing* a 53°C, y 2,5 minutos de extensión a 72°C y una extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Primer REP, un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C 20 segundos, 20 segundos de *annealing* a 34 °C, y 5 minutos de extensión a 72°C siendo similar las condiciones de temperatura para el *primer ERIC* exceptuando la temperatura de annealing que fue de 44°C.

Los productos de PCR generados se separaron por una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.6% en buffer TBE 0.5X, y dos horas de

corrida a 80V. Al finalizar la corrida el gel se trató con bromuro de etidio y expuso bajo luz UV. La electroforesis fue digitalizada utilizando el programa Kodak Digital Science 1D modelo DC 120.

TABLA 2.1. SECUENCIA DE LOS *PRIMERS* UTILIZADOS PARA EL ESTUDIO DE LOS PERFILES FINGERPRINTS

<i>Primer</i>	Secuencia (5' → 3')
REP	REP 1 IIIICGICGICATCIGGC REP 2 ICGICTTATCIGGCCTAC
BOX	BOXA1R CTACGGCAAGGCGACGCTGACG
ERIC	ERIC 1 ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC ERIC 2 AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG

2.3. OBTENCIÓN DE LOS PATRONES DE RESTRICCIÓN

Se amplificó la región de 1,1kb, del gen 16S ARN, utilizando la reacción de PCR y *primers* universales derivados de secuencias altamente conservadas de la molécula 16S rARN del género *Paenibacillus* como los *primers* U₁ y U₂ (Tabla 2.2) (Ash et al., 1993), los protocolos utilizados se detallan a continuación:

Las mezcla para la reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl, conteniendo 2,5 µm de los *primers* (U₁ y U₂), buffer Promega (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9,0, y 0,1% triton X-100), desoxirribonucleótidos (dGTP, dTTP, dATP, dCTP), en una concentración de 2 mM ; 3 mM Cl₂Mg; 1 U Taq polimerasa (Promega®) y 2 µl de ADN total en una concentración final de 10 ng obtenido por el método de fenol-cloroformo.

Las condiciones de ciclado para los *primers* fueron las mismas que las descritas por Ash et al (1993) y las amplificaciones se realizaron en un ciclador térmico (Mastercycler personal; Eppendorf, Hamburg, Germany).

El amplicón de 1,1 Kb esperado, se visualizó por una electroforesis en geles de agarosa al 1,2% en buffer TBE 0,5X, luego de 1 hora de corrida a 80V, el gel se trató con Bromuro de etidio y bajo luz UV y se digitalizó utilizando el programa Digi Doc It.

Tabla 2.2. Secuencia de los *primers* utilizados para el estudio de los perfiles PCR-RFLP

<i>Primer</i>	Secuencia (5' → 3')
U1	CGTGCCAGCAGCCGCGTAAT
U2	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA

Se procedió a generar patrones de restricción digiriendo el amplicón de 1.1Kb con 7 enzimas de restricción que reconocen 4 sitios de restricción, mediante el siguiente protocolo:

Tabla 2.3 Mezcla de reacción empleadas para la obtención de patrones de restricción

	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Msp</i> I	<i>Cfo</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Taq</i> I
Producto de PCR	3µl	3µl	3µl	3µl	3µl	3µl	3µl
BSA	0.1µl	0.1µl	0.1µl	0.1µl	0.1µl	0.1µl	0.1µl
Buffer 10X	1.3µl	1.3µl	1.3µl	1.3µl	1.3µl	1.3µl	1.3µl
Enzima	0.27µl	0.27µl	0.27µl	0.27µl	0.27µl	0.27µl	0.27µl
H ₂ O b	5.33µl	5.33µl	5.33µl	5.33µl	5.33µl	5.33µl	5.33µl

Las mezclas de digestión (Tabla 2.3) se incubaron durante toda la noche a 37 °C, exceptuando la enzima *Taq* I cuya temperatura fue de 65 °C, de acuerdo con el protocolo detallado en la tabla anterior.

Adicionalmente se utilizó en reemplazo de la incubación a 37°C, un *shock* térmico en microondas durante 30 segundos a potencia máxima dejando

reposar 30 segundos y repitiendo dos veces el mismo protocolo incubación – reposo.

Los patrones de restricción se observaron por una electroforesis en geles de agarosa al 1.6% en buffer TBE 0.5X, luego de 2 horas de corrida a 80V. Los fragmentos se visualizaron luego de un tratamiento del gel en bromuro de etidio, exposición bajo luz U.V y posterior digitalización utilizando el programa Digi Doc It.

Todas las soluciones y *buffers* para la extracción de ADN y buffer de las corridas electroforéticas se detallan en el Anexo III.

2.4. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENOTÍPICA A TRAVÉS DE LOS PERFILES *FINGERPRINT*

Los perfiles *fingerprints* generados por rep-PCR para las cepas de *B. cereus* y *B. megaterium* fueron analizados con el programa GelCompar 4.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium, <http://www.applied-maths.com>) a través de dendrogramas de similitud. Los grupos fueron estudiados por separado.

En total se ingresaron 21 corridas electroforéticas para *B. cereus* (7 por cada *primer*), y 9 para *B. megaterium* (3 por cada *primer*).

Posteriormente se normalizaron las corridas electroforéticas, lo cual consiste en buscar un *standard* común entre las mismas y de esa forma minimizar el error por diferencias entre los tiempos de corrida. Se eligió como *standard* al marcador de peso molecular ladder Promega, por lo tanto, las 29 electroforesis restantes se normalizaron en base al Ladder (presente en todas las corridas y sembradas en todos los casos en la primera calle de cada una).

Para el análisis de las corridas normalizadas se utilizó el algoritmo de comparación de bandas empleando el coeficiente de similitud de DICE, que le da mayor peso a la presencia de bandas. La tolerancia de identidad de banda fue del 3%. El análisis de matrices de similitud fue realizado a partir de matrices UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages*). Los perfiles *fingerprint* de *B. cereus* y *B. megaterium* fueron evaluados independientemente uno del otro, por lo tanto cada uno de ellos generó una matriz de similitud diferente. Los dendogramas de similitud de bandas se obtuvieron combinando los patrones *fingerprints* generado por BOX, REP y ERIC

2.5 ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD FENOTÍPICA

Para estudiar la diversidad fenotípica de las cepas de *Bacillus cereus* y *Bacillus megaterium*, se definieron como OTU, 133 cepas de *B. cereus* y 53 de *B. megaterium*. Se seleccionaron 14 caracteres: Tinción de Gram, presencia y posición de esporas, detección de inclusiones lipídicas, reacción Vogues Proskauer, actividad lecitinasa, utilización de arabinosa, utilización de manitol, actividad beta hemolítica, reacción de catalasa, reducción de nitratos a nitritos, hidrólisis de almidón, actividad tirosinasa y licuefacción de la gelatina. Los resultados de las pruebas fueron clasificados como 0 (-) y 1 (+), a partir de los cuales se construyó una matriz simétrica en el NTEDIT (MBD).

Posteriormente se pasó a la etapa de evaluación en la cual se eligió la función *Similarity* (Estudia la similitud entre las OTU a través de los caracteres cargados). Esta etapa es muy importante ya que en ella se realizan las asociaciones entre las OTU, para lo cual se escogió el coeficiente de

asociación SM, que midió los apareamientos positivos y negativos como proporción del número total de caracteres. Con los valores de similitud calculados anteriormente se utilizó un análisis de agrupamiento UPGMA el cual le dio el mismo peso a cada uno de los caracteres estudiados, y se obtuvo una matriz de similitud que fue graficada en forma de dendrograma.

2.6. ESTUDIO DE LA CONFIABILIDAD DE LOS FENOGRAMAS GENERADOS POR EL PROGRAMA NTSYS-PC2

Con el fin de dar confiabilidad a los resultados obtenidos a partir del dendrograma de similitudes obtenidas se construyó un árbol empleando el programa FreeTREE (www.natur.cuni.cz/flegr/programs/freetree). Para el análisis se utilizó el coeficiente de asociación *Jacard* y los árboles de referencia se calcularon en base a 100 permutaciones con el coeficiente *Jackknifing*. El análisis se observó a través del programa Treewiew.

RESULTADOS

DIVERSIDAD GENOTÍPICA

La técnica de extracción de ADN crudo resultó satisfactoria para la obtención de ADN molde tanto para rep-PCR como para PCR-RFLP para los dos grupos bacterianos estudiados

Al utilizar el *primer* BOX las cepas de *B.cereus* generaron perfiles *fingerprint* que contenían entre 3 y 14 bandas y de un tamaño de 50 y 1500 pb,

en cambio con ERIC los patrones mostraron entre 5 y 17 bandas con un tamaño variable entre 250 pb y a 2000 pb, por último con los *primers* REP se observaron perfiles *fingerprint* consistentes entre 6 y 14 bandas con un tamaño variable entre 50 pb a 2000 pb (Figura 2.4). Se identificaron un total de 76 perfiles *fingerprints* diferenciales entre las cepas de *B cereus* analizadas, entre los cuales se destaca un perfil compartido por 9 aislamientos, 7 de Argentina y 2 de E.E.U.U (Cluster V) y otro perfil compartido entre 5 cepas (4 de Argentina y 1 EEUU). La diversidad genotípica estudiada a través de los perfiles de *fingerprint*, dio como resultado un dendrograma con un nivel de 50% de similitud constituido por 8 *clusters* (Figura 2.4) (Tabla 2.4). Internamente los clusters I, II, III, IV, V, VI, VII, y VIII se separaron al 71%, 68%, 69%, 70%, 61%, 61%, 61%, y 82%, respectivamente. Los *clusters* con mayor número de cepas (n=25) fueron el II, III y V, en este último se encontró la cepa de referencia ATCC 11776, al igual que otra cepa de EEUU (Bc136). Las cepas mexicanas se agruparon en el cluster III, con excepción de Mex E que se agrupó en el cluster VIII con 2 cepas de aislamientos de La Plata (Argentina). En el cluster II se agruparon las cepas italianas, y 4 cepas provenientes de aislamientos de EEUU. El cluster VI agrupó 17 cepas de la provincia de Buenos Aires exclusivamente (Figura 2.4). Las cepas italianas son las únicas que se agruparon en un cluster común.

Con respecto a *B. megaterium* se observó un total de 46 perfiles (Figura 2.5), destacándose un perfil compartido por la cepa de referencia NRRL B-939 y 4 cepas de la provincia de Buenos Aires. La diversidad genotípica dio como resultado un dendrograma de 70 % de similitud constituido por 6 *clusters* (Figura 2.6) (Tabla 2.4) Internamente los cluster I, II, III, IV, V y VI estaban separados al 89%, 91%, 97%, 83%, 88 %, 72 % de similitud, respectivamente.

El cluster I agrupó 7 cepas entre las cuales se ubica la cepa de referencia NRRL-B 939 y una cepa de Brasil (Bm23). Se observaron también 2 agrupamientos exclusivos de cepas argentinas (II y IV) (Figura 2.7).

Figura 2.4 Perfiles *fingerprint* de cepas de *Bacillus cereus*, generados por los *primers* BOX, ERIC y REP. **Primer BOX.** M. Marcador de peso molecular (100 bp ladder biodynamic®) ; Calles de 1-12, *B. cereus* provenientes de Argentina (Bc 15, Bc 112, Bc 18, Bc 25, Bc 26, Bc 28, Bc 31, Bc 42, Bc 5, Bc 44, Bc 47, Bc 77); calle 13 Bc 80 , *B. cereus* de Brasil; calles 14-16, *B. cereus* cepas Argentinas (Bc 41 y Bc32). **ERIC.** M. Marcador de peso molecular (100 bp ladder biodynamic®); calles 1-16 *B. cereus* aislados de Argentina (Bc 1, Bc 2, Bc 3, Bc 10, Bc 13, Bc 94, Bc 16, Bc 17, Bc 8, Bc 24, Bc 30, Bc 27, Bc 39, Bc 47, Bc 48, and Bc 49). **REP.** M. Marcador de peso molecular (100 bp ladder biodynamic®); calles 1-4, *B. cereus* aislados de Argentina (Bc 59, Bc 60, Bc 87, Bc 33); Calle 5 *B. cereus* de USA (Bc 130); Calles 6 - 7, *B. cereus* , asilamientos de Argentina (Bc 127, Bc 16); Calles 8 y 9, *B. cereus* aislados de USA (Bc 132, Bc 131); Calles 10 - 14, *B. cereus* aislados de Argentina (Bc 62, Bc 20, Bc 55, Bc 58, Bc 61).

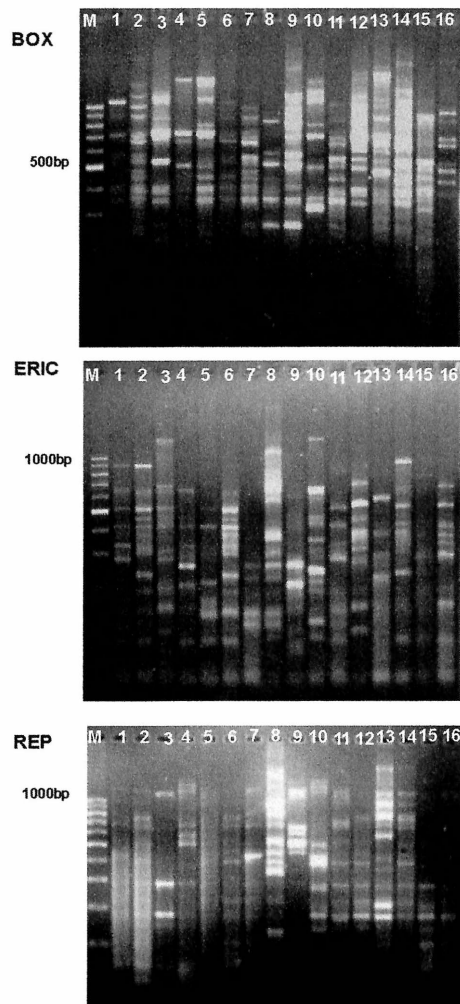


Figura 2.5. Dendrograma de similitud genotípica entre 133 cepas de *Bacillus cereus* basado en los resultados obtenidos por rep-PCR. Se utilizó una matriz UPGMA y el coeficiente de correlación DICE del programa Gelcompar 4.1, con un porcentaje de optimización entre bandas del 3%.

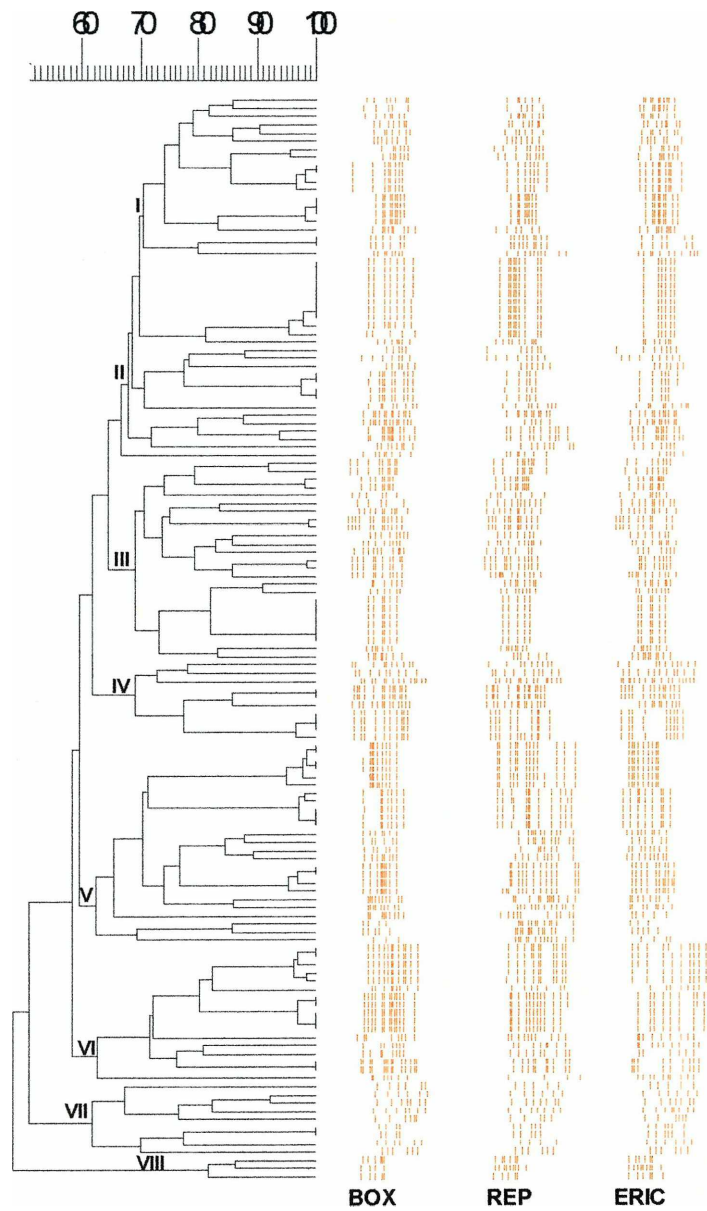


Figura 2.6. Perfiles *fingerprint* de cepas de *Bacillus megaterium*, generados por los *primers* BOX, ERIC y REP. **Primer BOX.** M. Marcador de peso molecular (100 bp ladder biodynamic®); Calles de 1-17, *B. megaterium* de Argentina (Bm 29, Bm 41, Bm 39, Bm 37, Bm 16, Bm 25, Bm 10, Bm 17, Bm 7, Bm 44, Bm 43, Bm 52, Bm 18, Bm 3, Bm 5, Bm 2, Bm 30) **ERIC.** M. Marcador de peso molecular (100 bp ladder biodynamic®); calle 1 *B. megaterium* aislados de Argentina (Bc 13) Calle 2 *B. megaterium* aislado de México (Bm 49); calles 3-15 *B. megaterium* aislados de argentina (Bm 27, Bm 10, Bm 15, Bm 32, Bm 5, Bm 42, Bm 45, Bm 11). **REP.** M. Marcador de peso molecular (100 bp ladder biodynamic®); calles 1-4, *B. megaterium* aislados de Argentina (Bm 46, Bm 33, Bc 35, Bc 38); Calle 5 *B. cereus* de Brasil (Bm 24); Calles 6 - 14, *B. megaterium*, asilamientos de Argentina (Bm 25, Bm 26, Bm 28, Bm 20, Bm 8, Bm 48, Bm 1, Bm 21)

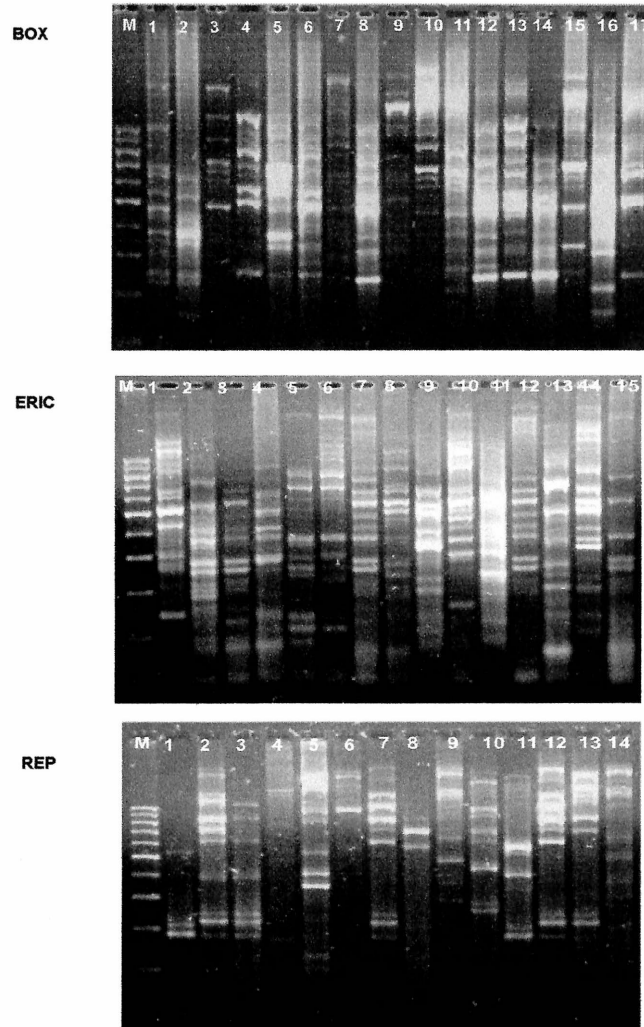
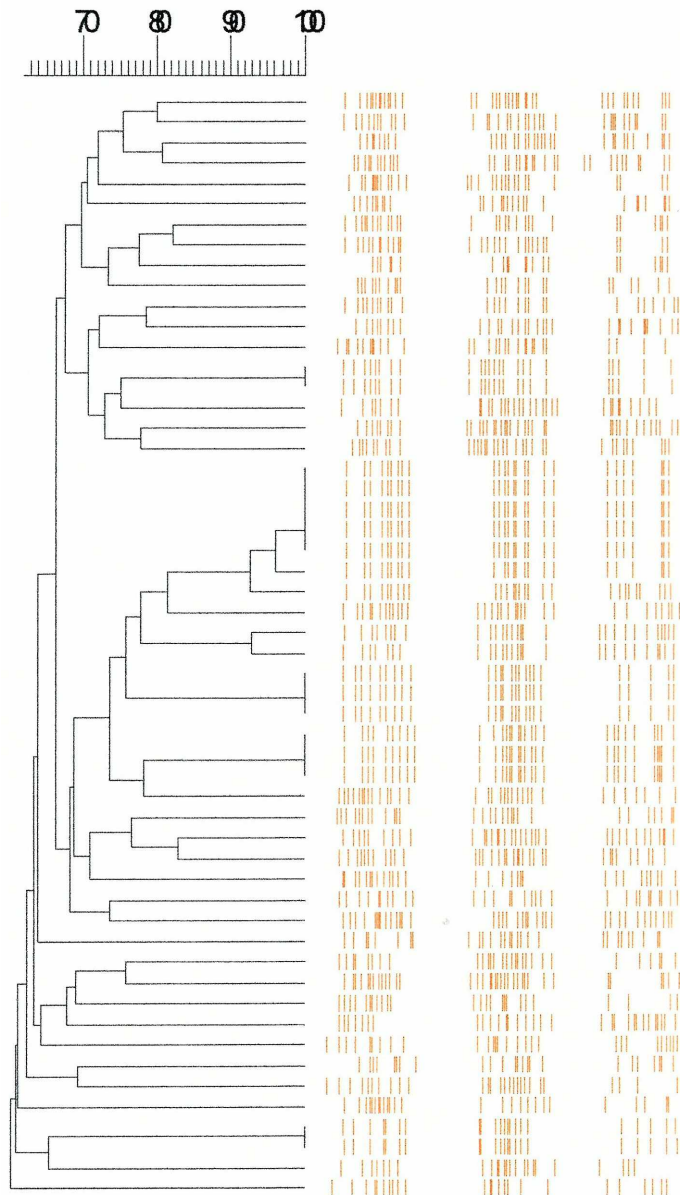


Figura 2.7. Dendrograma de similitud genotípica entre 53 cepas de *Bacillus megaterium* basado en los resultados obtenidos por rep-PCR. Se utilizó una matriz UPGMA y el coeficiente de correlación DICE del programa Gelcompar 4.1, con un porcentaje de optimización entre bandas del 3%.



ANÁLISIS DE LA REGIÓN 16S rRNA

Los patrones de restricción resultantes de la digestión del gen 16S ARNr obtenidos por las dos metodologías empleadas dieron resultados similares, lo cual indica que al *shock* térmico en microondas constituye una alternativa válida para la incubación de las mezclas de restricción disminuyendo considerablemente los tiempos de análisis.

El análisis de los patrones de restricción del gen 16S ARNr de las cepas de *Bacillus cereus* evidenciaron la presencia de sólo dos patrones de restricción con cada una de las enzimas utilizadas, los cuales se denominaron A y B, (Figura 2.8). El 93 % de los aislamientos presentó el patrón A, el mismo que la cepa de referencia ATCC11778. Todas las cepas que presentaron el patrón B son aislamientos provenientes de la provincia de Buenos Aires (Bc 8, Bc 9, Bc 12, Bc 13, Bc 16, Bc 17, Bc 18 y Bc 27), no hallándose ninguna correlación, con excepción del origen geográfico.

Las cepas de *Bacillus megaterium* presentaron también dos patrones de RFLP con cada una de las enzimas, denominados C y D (Figura 2.9), donde el 96 % de las mismos presentó el patrón C al igual que la cepa de referencia NRRL B-939

Figura 2.8. Patrones RFLP, generados al digerir el fragmento de 1100 bp del gen 16S con dos enzimas. A) *Alu I*. B) *Taq I*. Calle M, Marcador de peso molecular (100 bp ladder biodynamic®) Calles 1 - 4, Patrón A de las cepas Bc 2, ATCC 11778, Bc 7 y Bc 10; calles 5 - 7, Patrón B obtenido de la cepas Bc 8, Bc 12 y Bc 13.

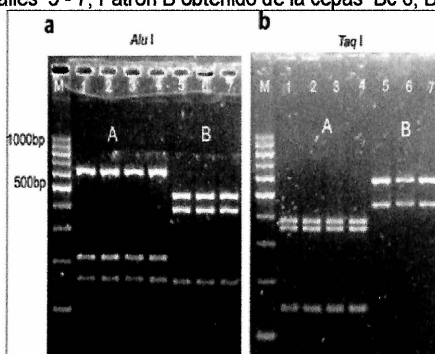


Figura 2.9. Patrones RFLP, generados al digerir el fragmento de 1100 bp del gen 16S con 3 enzimas. A) *Hae* III. B) *Hinf* I. C) *Msp* I. Calle M, Marcador de peso molecular (100 bp ladder biodynamic®) Calles 1, 3 y 5. Patrón C de las cepas Bm 1, NRRL B- 939, Bm 6. ; calles 2, 4 y 6, Patrón D obtenido de las cepas Bm 5, Bm 11 y Bm 34.



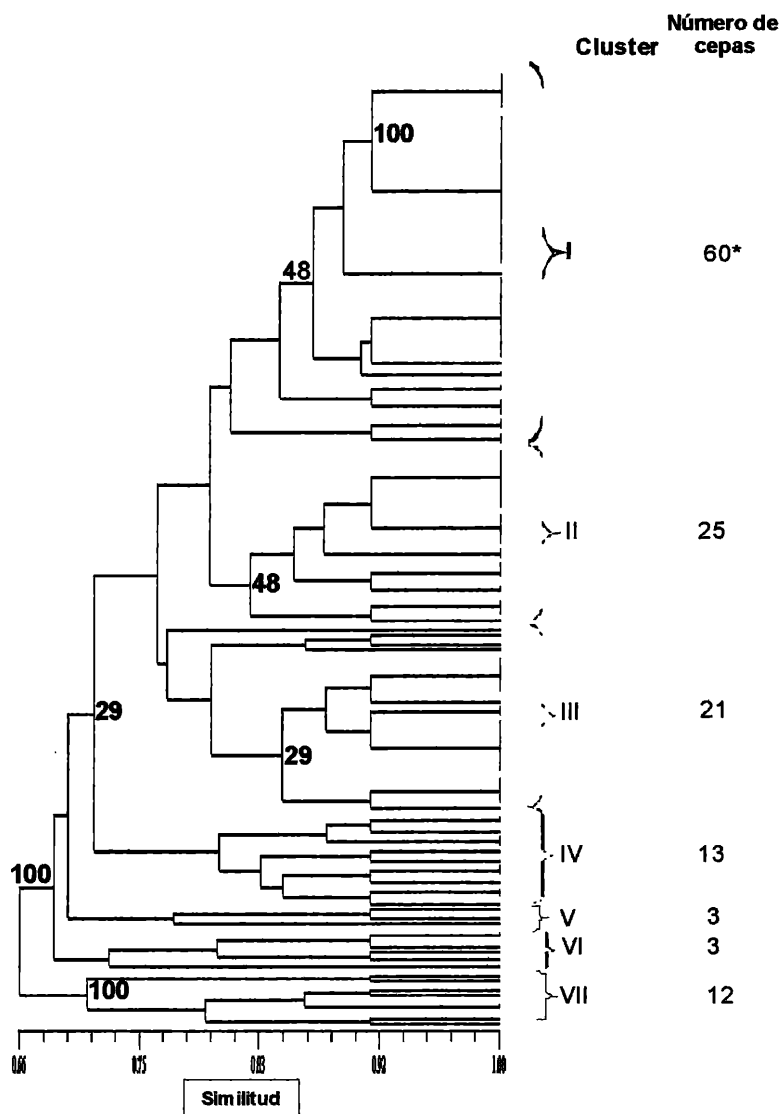
DIVERSIDAD FENOTÍPICA

La diversidad fenotípica de las cepas de *B. cereus* dio como resultado un dendrograma del 66% similitud compuesto por 7 clusters diferentes (Figura 2.10) (Tabla 2.4). El cluster denominado I, fue conformado por el mayor número de cepas ($n=60$), entre las cuales se agrupó la cepa de referencia ATCC11776. Paralelamente se observó que todas las cepas de *B.cereus* atípicas que no producían lecitinasa se agruparon en el cluster VII, pero no se observaron otras características metabólicas atípicas agrupadas en un cluster común, como por ejemplo la utilización de manitol.

Las cepas de *B. megaterium* generaron un dendrograma al 69 % de similitud constituido por 6 clusters (Figura 2.11) (Tabla 2.5) En el cluster III se agruparon la mayoría de las cepas ($n= 41$), junto con la cepa de referencia NRRLB-939 (Figura 2.10). Se observó también que los clusters V y IV agruparon solo cepas de la provincia de Buenos Aires, en cambio el Cluster VI

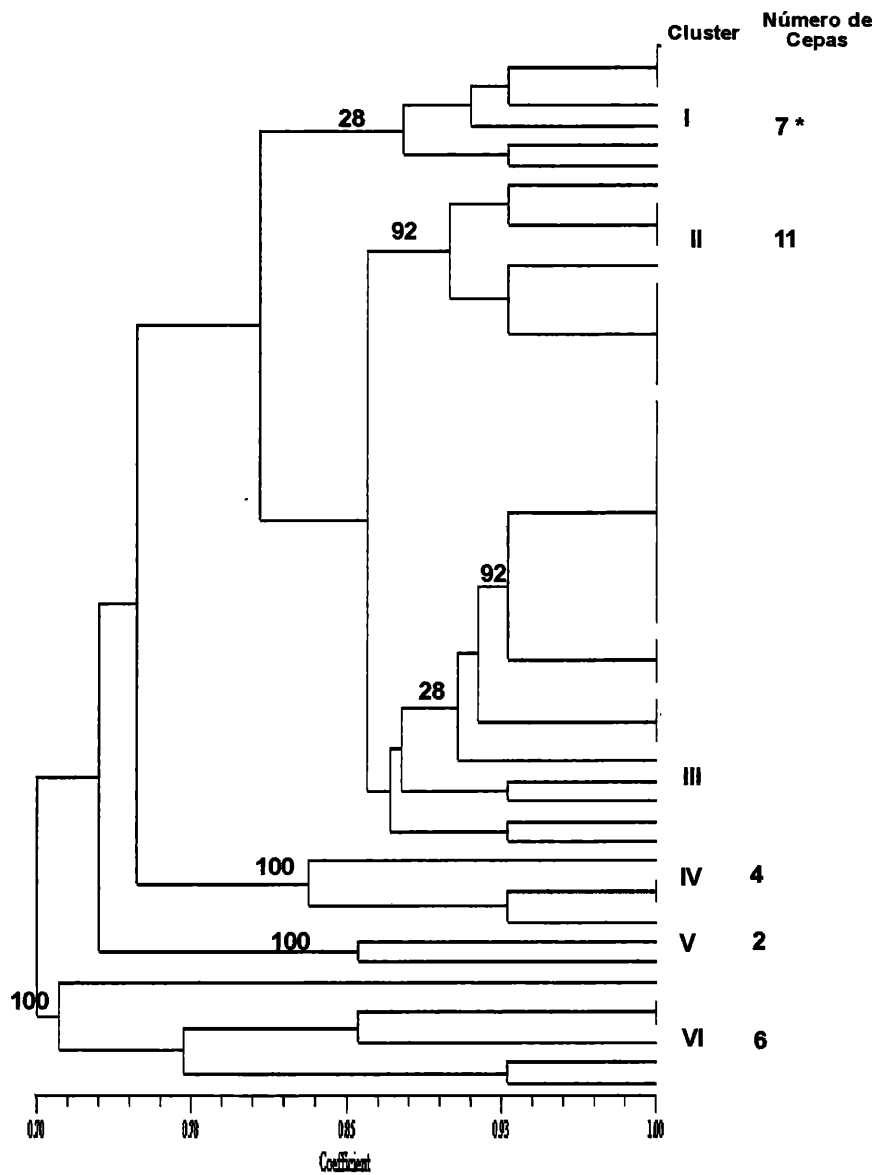
contiene dos cepas provenientes de Brasil. Asimismo se observó que las dos cepas con actividad lecitinasa positiva se agruparon en el *cluster* III.

Figura 2.10 Dendrograma de similitud fenotípica entre 118 cepas de *Bacillus cereus* aisladas de mieles provenientes de Argentina (n=118) y de otros países: USA, Italia, Brasil, México, España (n=18) y la cepa de referencia ATCC 11778, basado en los resultados obtenidos mediante el análisis de características morfológicas y fisiológicas y utilizando el coeficiente de asociación SM. Los valores en negrita corresponden a los obtenidos por las 100 permutaciones de los árboles *Jackknifing*.



* Cepa de referencia ATCC11778

Figura 2.11 Dendrograma de similitud fenotípica entre 53 cepas de *Bacillus megaterium* aisladas de mieles provenientes de Argentina y la cepa de referencia NRRL B939, basado en los resultados obtenidos mediante el análisis de características morfológicas y fisiológicas y utilizando el coeficiente de asociación SM. Los valores en negrita corresponden a los obtenidos por *Jackknifing*.



* Cepa de referencia NRRLB 939

Tabla 2.4. Denominación, origen geográfico y agrupamientos generados por los programas de taxonomía numérica Gelcompar y NTSYS, para las cepas de *B. cereus* estudiadas en esta tesis.

Cepa	Origen Geográfico	Agrupamiento por Gelcompar	Agrupamiento por NTSYS
ATCC11778	USA	V	I
Bc1	P. Indio (Buenos Aires, Argentina)	I	I
Bc2	Ranchos (Buenos Aires, Argentina)	VI	I
Bc3	G. Chavez (Buenos Aires, Argentina)	VI	VII
Bc4	Ranchos (Buenos Aires, Argentina)	VII	I
Bc5	Ranchos (Buenos Aires, Argentina)	VII	II
Bc6	La Plata (Buenos Aires, Argentina)	VI	IV
Bc7	Quilmes (Buenos Aires, Argentina)	III	VII
Bc8	Bragado (Buenos Aires, Argentina)	II	I
Bc9	Pte. Perón (Buenos Aires, Argentina)	II	VII
Bc10	9 de julio (Buenos Aires, Argentina)	VI	I
Bc11	La Plata (Buenos Aires, Argentina)	VII	II
Bc12	P. Luro (Buenos Aires, Argentina)	III	II
Bc13	Ranchos (Buenos Aires, Argentina)	VI	III
Bc14	Laprida (Buenos Aires, Argentina)	VI	I
Bc15	Pte. Perón (Buenos Aires, Argentina)	IV	III
Bc16	Tandil (Buenos Aires, Argentina)	I	I
Bc17	P. Alta (Buenos Aires, Argentina)	II	II
Bc18	Las Flores (Buenos Aires, Argentina)	II	II
Bc19	La Plata (Buenos Aires, Argentina)	IV	II
Bc20	Pte.Luro (Buenos Aires, Argentina)	V	I
Bc21	Pte. Luro (Buenos Aires, Argentina)	III	I
Bc22	Pte. Luro (Buenos Aires, Argentina)	III	I
Bc23	25 de mayo (Buenos Aires, Argentina)	VII	I
Bc24	Tandil (Buenos Aires, Argentina)	VI	I
Bc25	Pte. Perón (Buenos Aires, Argentina)	IV	III
Bc26	S. M. Monte (Buenos Aires, Argentina)	II	I
Bc27	Magdalena (Buenos Aires, Argentina)	VI	II
Bc28	Bragado (Buenos Aires, Argentina)	II	I
Bc29	Pigüé (Buenos Aires, Argentina)	III	I
Bc30	9 de julio (Buenos Aires, Argentina)	IV	II
Bc31	Las Flores (Buenos Aires, Argentina)	III	II
Bc32	Berisso (Buenos Aires, Argentina)	II	I
Bc33	Bolívar (Buenos Aires, Argentina)	V	I
Bc34	Sta Fe (Santa Fe, Argentina)	VI	I
Bc35	Chacabuco (Buenos Aires, Argentina)	II	I
Bc36	Sta Fe (Santa Fe, Argentina)	I	III
Bc37	Resistencia (Chaco, Argentina)	II	III
Bc38	Salta (Salta, Argentina)	III	II
Bc39	Ranchos (Buenos Aires, Argentina)	VI	I
Bc40	Guaminí (Buenos Aires, Argentina)	III	II
Bc41	La Plata (Buenos Aires, Argentina)	III	I
Bc42	Guaminí (Buenos Aires, Argentina)	III	II
Bc43	Tapalqué (Buenos Aires, Argentina)	VI	IV
Bc44	Pte.Luro (Buenos Aires, Argentina)	III	II
Bc45	Villarino (Buenos Aires, Argentina)	V	I
Bc46	Ranchos (Buenos Aires, Argentina)	IV	III

Continuación Tabla 2.4

Cepa	Origen Geográfico	Agrupamiento por Gelcompar	Agrupamiento por NTSYS
Bc47	La Rioja (Argentina)	VI	I
Bc48	Pte. Luro (Buenos Aires, Argentina)	VI	I
Bc49	Ranchos (Buenos Aires, Argentina)	VI	IV
Bc50	Chascomus (Buenos Aires, Argentina)	VI	IV
Bc51	Tandil (Buenos Aires, Argentina)	I	I
Bc52	Pigue (Buenos Aires, Argentina)	II	I
Bc53	Gorina (Buenos Aires, Argentina)	I	I
Bc54	Chivilcoy (Buenos Aires, Argentina)	II	I
Bc55	Pigüé (Buenos Aires, Argentina)	V	I
Bc56	Henderson (Buenos Aires, Argentina)	V	II
Bc57	Henderson (Buenos Aires, Argentina)	V	III
Bc58	Gorina (Buenos Aires, Argentina)	V	I
Bc59	Chascomus (Buenos Aires, Argentina)	V	I
Bc60	Capital Federal (Buenos Aires, Argentina)	V	I
Bc61	Brandsen (Buenos Aires, Argentina)	V	I
Bc62	Sta. Fe (Santa Fe, Argentina)	V	III
Bc63	México	III	III
Bc64	México	III	III
Bc65	México	VIII	IV
Bc66	Chivilcoy (Buenos Aires, Argentina)	III	II
Bc67	Pigue (Buenos Aires, Argentina)	III	VII
Bc68	México	III	I
Bc69	La Plata (Buenos Aires, Argentina)	VII	III
Bc70	Rauch (Buenos Aires, Argentina)	III	III
Bc71	La Plata (Buenos Aires, Argentina)	II	III
Bc72	Pte. Luro (Buenos Aires, Argentina)	I	II
Bc73	Río Negro (Argentina)	III	II
Bc74	Santa Rosa (La Pampa, Argentina)	I	I
Bc75	La Plata (Buenos Aires, Argentina)	V	III
Bc76	G. Lavalle (Buenos Aires, Argentina)	I	II
Bc77	La Plata (Buenos Aires, Argentina)	IV	II
Bc78	Buzios(Rio de Janeiro, Brazil)	I	II
Bc79	Buzios(Rio de Janeiro, Brazil)	VII	I
Bc80	Buzios(Rio de Janeiro, Brazil)	II	I
Bc81	Laprida (Buenos Aires, Argentina)	III	VI
Bc82	Laprida (Buenos Aires, Argentina)	VII	VI
Bc83	La Plata (Buenos Aires, Argentina)	VIII	I
Bc84	La Plata (Buenos Aires, Argentina)	VIII	VI
Bc85	G Pueyrredon (Buenos Aires, Argentina)	IV	I
Bc86	C. Suarez (Buenos Aires, Argentina)	V	I
Bc87	25 de mayo (Buenos Aires, Argentina)	V	I
Bc88	T. Lauquen (La Pampa, Argentina)	VI	I
Bc89	T. Lauquen (La Pampa, Argentina)	III	I
Bc90	G Lavalle (Buenos Aires, Argentina)	V	I

Continuación Tabla 2.4

Cepa	Origen Geográfico	Agrupamiento por Gelcompar	Agrupamiento por NTSYS
Bc91	R. Pérez (Buenos Aires, Argentina)	VI	IV
Bc92	Chascomus (Buenos Aires, Argentina)	I	II
Bc93	Pte Luro (Buenos Aires, Argentina)	VII	II
Bc94	Balcarce (Buenos Aires, Argentina)	I	I
Bc95	Delta (Buenos Aires, Argentina)	V	IV
Bc96	25 de mayo (Buenos Aires, Argentina)	IV	I
Bc97	C. Casares (Buenos Aires, Argentina)	V	II
Bc98	T. Lauquen (La Pampa, Argentina)	III	I
Bc99	Tapalqué (Buenos Aires, Argentina)	I	I
Bc100	Tapalqué (Buenos Aires, Argentina)	V	I
Bc101	Brandsen (Buenos Aires, Argentina)	IV	II
Bc102	Chascomús (Buenos Aires, Argentina)	V	I
Bc103	Berisso (Buenos Aires, Argentina)	II	I
Bc104	Berisso (Buenos Aires, Argentina)	II	I
Bc105	Berisso (Buenos Aires, Argentina)	II	II
Bc106	Boston (USA)	II	VII
Bc107	Boston (USA)	II	VII
Bc108	Boston (USA)	II	I
Bc109	Boston (USA)	II	I
Bc110	9 de julio (Buenos Aires, Argentina)	II	I
Bc111	9 de julio (Buenos Aires, Argentina)	I	VII
Bc112	Suipacha (Buenos Aires, Argentina)	II	I
Bc113	ITALIA	II	VII
Bc114	ITALIA	I	III
Bc115	Pigue (Buenos Aires, Argentina)	I	II
Bc116	Olavarría (Buenos Aires, Argentina)	I	IV
Bc117	Laprida (Buenos Aires, Argentina)	II	I
Bc118	Laprida (Buenos Aires, Argentina)	III	V
Bc119	Laprida (Buenos Aires, Argentina)	I	V
Bc120	Pta.Indio (Buenos Aires, Argentina)	I	V
Bc121	Pdo.Costa (Buenos Aires, Argentina)	V	IV
Bc122	San Vicente (Buenos Aires, Argentina)	III	VII
Bc123	Pehuajo (Buenos Aires, Argentina)	I	III
Bc124	Lincoln (Buenos Aires, Argentina)	III	III
Bc125	Buzios (Río de Janeiro, Brasil)	II	VII
Bc126	Buzios (Río de Janeiro, Brasil)	III	I
Bc127	Magdalena (Buenos Aires, Argentina)	VII	VII
Bc128	Laprida (Buenos Aires, Argentina)	I	VII
Bc129	Guamini (Buenos Aires, Argentina)	V	VII
Bc130	Usa / México	V	IV
Bc131	Usa / México	V	IV
Bc132	Usa / México	V	I

TABLA 2.5. Denominación, origen geográfico y agrupamientos generados por los programas de taxonomía numérica Gelcompar y NTSYS, para las cepas de *B. megaterium* estudiadas en esta tesis.

Cepa	Origen geográfico	Agrupamiento porGelcompar	Agrupamiento por NTSYS
NRRL-B939	USA	III	I
Bm1	Ranchos	III	IV
Bm2	Pte. Luro	IV	II
Bm3	Ranchos	II	III
Bm4	Tandil	III	III
Bm5	Chacabuco	I	I
Bm6	Pte. Luro	III	III
Bm7	Villarino	V	II
Bm8	Pigue	V	VI
Bm9	Ranchos	III	VI
Bm10	Quilmes	I	III
Bm11	Brandsen	I	III
Bm12	E. Rios	VII	II
Bm13	Punta Alta	I	III
Bm14	Crel. Pringles	III	III
Bm15	La Plata	IV	III
Bm16	Ranchos	I	IV
Bm17	P. Luro	II	III
Bm18	Magdalena	II	III
Bm19	C. Suarez	III	IV
Bm20	25 de mayo	III	VI
Bm21	Chivilcoy	IV	I
Bm22	Francia	III	III
Bm23	Brasil	VII	I
Bm24	Brasil	VII	V
Bm25	Tandil	I	III
Bm26	Cañuelas	III	III
Bm27	Laprida	III	III
Bm28	Laprida	III	III
Bm29	San Pedro	III	III
Bm30	Bragado	VI	III
Bm31	Magdalena	VI	II
Bm32	9 de julio	II	I
Bm33	F. Varela	IV	III
Bm34	Gral. Alvarado	III	VI
Bm35	Gral. Alvarado	III	III
Bm36	Gral. Pinto	II	VI
Bm37	Gral. Pinto	II	I
Bm38	Gral. Pinto	IV	II
Bm39	F. Varela	V	I
Bm40	Las Flores	III	II
Bm41	Gral. Lavalle	III	II
Bm42	Chacabuco	I	II
Bm44	Pte. Perón	I	II
Bm44	Salto	II	II
Bm45	Entre Rios	IV	III
Bm46	Luján	VI	V
Bm47	Villarino	V	III
Bm48	T. Lauquen	V	VI
Bm49	25 de Mayo	IV	III
Bm50	C. Casares	II	IV
Bm51	Guamini	V	III
Bm52	Guamini	V	II

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente tesis indican la existencia de un alto grado de diversidad tanto genotípica como fenotípica en las cepas de *B. cereus* y *B. megaterium*, lo cual podría estar asociado a las diversas fuentes de contaminación bacteriana en la miel como el polen, las abejas melíferas, la cera, el equipo apícola y el polvo ambiental.

El análisis de rep-PCR explora distintas partes del genoma de los microorganismos de manera aleatoria para la obtención de los perfiles de *fingerprints*. En el caso de las bacterias no se ha demostrado que cada una tenga un perfil propio de *fingerprint*, pero cabría esperar que aislamientos de un mismo lugar compartan sus perfiles de *fingerprint* con mayor frecuencia que los aislamientos provenientes de sitios diferentes. Los resultados obtenidos en esta tesis indican la presencia de perfiles idénticos en cepas provenientes de orígenes geográficos muy distantes lo cual podría ser consecuencia de los cortes de miel que realizan algunos de nuestros países compradores al utilizar mieles argentinas para mejorar sus caracteres organolépticos.

La técnica de rep-PCR resultó altamente reproducible para el análisis de las poblaciones en estudio, demostrando su utilidad para determinar la variabilidad intra-especie en *B. cereus* y *B. megaterium* aisladas de miel.

La alta diversidad genética del “grupo *cereus*” ya había sido observada a través de diferentes metodologías como MEE, AFLP, PFGE, y RAPD (Helgason et al., 2004; Van Der Zwet et al., 2000, y Ehling-Schulz, 2005), pero no existen datos publicados con respecto a la variabilidad obtenida por rep-PCR para aislamientos de *B. cereus* ni *B. megaterium* constituyendo esta tesis el primer estudio a nivel mundial.

El análisis de la región 16 S rRNA por PCR-RFLP evidenció una alta homología intra-específica en *B. cereus*, encontrándose solo dos patrones de restricción entre los 133 cepas analizadas. El patrón B solo se encontró en cepas argentinas pero no correlacionó con ninguna propiedad bioquímica de los aislamientos. Haque y Russell (2005) también encontraron sólo 2 patrones de restricción cuando analizaron aislamientos de *Bacillus cereus* (n= 7) en muestras de arroz pero estudiando la región intergénica (IGS) comprendida entre los genes 16S y 23S rRNA.

Con respecto a *B. megaterium*, también se hallaron sólo dos patrones de restricción, pero en este caso, se encontró una correlación positiva entre el patrón denominado D y la actividad beta hemolítica de las cepas, no así a la inversa. No existe registro de este tipo de análisis para *Bacillus megaterium*, con excepción de un estudio comparativo entre diversas especies de *Paenibacillus* y *Bacillus* (Alippi., et al, 2002). El perfil de *B. megaterium* encontrado analizando un limitado número de cepas coincide con el patrón C observado en el 96% de los aislamientos de este trabajo de tesis.

Ninguno de los dos grupos de cepas en estudio, generó agrupamientos relacionados con los orígenes geográficos.

Es interesante destacar que los fenogramas obtenidos a través del análisis de la diversidad fenotípica y genotípica no se correlacionaron entre sí en ningún caso.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Alippi, A.M; and Aguilar, O.M. 1998. Characterization of isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* from diverse geographical origin by the polymerase chain reaction and Box primers. *Journal of Invertebrate Pathology* 72, 21–27.
- Alippi, A.M; Lopez, A.C; and Aguilar, O.M. 2002. Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American Foulbrood of honeybees, by using PCR and restriction fragment analysis of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 3655-3660, USA
- Alippi A.M; Reynaldi, F.J; López, A.C; De Giusti, M.R. and Aguilar O.M. 2004 .Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae larvae* and incidence of American Foulbrood in Argentinean honeys from Buenos Aires Province. *Journal of Apicultural Research* 43: 135-143
- Ash, C; Priest, F.G; and Collins, M.D. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek. Journal of Microbiology*. 64: 253–260.
- Bertalanffy, L. Von. 1975. *Perspectivas en la Teoría General de Sistemas*. Alianza Universidad de Madrid. Pag 166
- Bock, W.J.1978. *Principles and Methods of Comparative Analysis in Sociobiology*. The Sociology Debate, A. Caplan (ed.), Harper and Row, New York, 514 pag.
- Bruce Weir. *Genetic Sequence analysis*.
- Crisci Jorge V. 1983. *Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxomía Numérica*. 132 paginas.
- Haque, A; and Russell, N.J. 2005. Phenotypic and genotypic characterization of *Bacillus cereus* isolated from Bangladeshi rice. *Int Journal of Food Micro*. 98, 23–34.
- Helgason, E; Tourasse, N.J; Meisal, R; Caugant, D.A; and Kolsto, A.B. 2004. Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 191–201
- Hennig, W. 1968. *Elementos de una Sistemática Filogenético*, Eudeba, Buenos Aires. 353 paginas
- Lake, J. A., and J. E. Moore. 1998. *Phylogenetic analysis & comparative genomics*. Trends guide to Bioinformatics 22-23.
- Mayr, E. 1969. *Principles of Systematic Zoology*, McGraw-Hill, New York. 428 paginas.
- Moyer, CL; Tiedje, JM; FC Dobbs; and Karl DM. 1996. Computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Appl. Environ. Microbiol*. 62. 2501-2507

- Rademaker, J. L. W; and F. J de Bruijn. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. Capítulo 10. DNA Markers. Wiley-Liss.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sneath P.H.A y Sokal R.R, 1973. Numerical Taxonomy. The Principles and Practice and Practice of Numerical Classification, Freeman, XV, 573 paginas.
- Swofford, D. L.; G. J. Olsen; P. J. Waddell, and D. M. Hillis. 1996. In "Molecular Systematics" D.M.Hillis, C. Moritz and B.K.Mable, ed), pp. 407-514. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Van Der Zwet, W.C; Parlevliet, G.A; Savelkoul, P.H; Stoof, J; Kaiser, A.M; Van Furth, A.M; and Vandenbroucke-Grauls, C.M. 2000. Outbreak of *Bacillus cereus* infections in a neonatal intensive care unit traced to balloons used in manual ventilation. Journal of Clinical Microbiology. 38: 4131–4136.
- Versalovic J; M. Schneider; F. J. de Bruijn; and J. R. Lupski. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction. Methods in Molecular and Cellular Biology. 5:25-40
- Walsh, P.S; Metzger, D.A; and Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. : Biotechniques. 4: 506-51
- William, W T and Dale, M. B. 1965. Fundamental Problems In Numerical Taxonomy, 2

CAPITULO III

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS ENTEROTOXICAS DE CEPAS DE *BACILLUS* *CEREUS* Y *BACILLUS MEGATERIUM*



CAPITULO III

INTRODUCCIÓN**INTOXICACIÓN ALIMENTARIA**

Una intoxicación alimentaria es la manifestación clínica de la exposición a sustancias tóxicas vehiculizadas por los alimentos tanto sólidos como líquidos. La intoxicación ocurre tras la ingestión de alimentos contaminados con sustancias orgánicas o inorgánicas perjudiciales para el organismo, tales como: venenos, toxinas, agentes biológicos patógenos, metales pesados, etc. La mayoría de los casos de intoxicaciones alimentarias son en realidad toxiinfecciones alimentarias, provocadas por bacterias, virus, o parásitos, y/o sus productos metabólicos. La contaminación de los alimentos con los diferentes agentes tóxicos suele deberse a manipulación, preparación o conservación inadecuada de los alimentos. La falta de prácticas higiénicas antes, durante y posteriormente a la preparación de los alimentos aumenta significativamente el riesgo de sufrir una intoxicación. Las personas enfermas o portadoras de alguna enfermedad infectocontagiosa que manipulan alimentos son una de las causas más comunes de intoxicaciones alimentarias por contaminación con agentes patógenos.

Las bacterias suelen causar intoxicaciones alimentarias, los síntomas de infecciones bacterianas aparecen tardíamente luego de la ingesta de la comida contaminada, debido a que las bacterias deben primero multiplicarse.

Los síntomas y signos que se manifiestan en una intoxicación por alimentos contaminados dependen de la cantidad y calidad de los tóxicos ingeridos. Dependiendo del agente involucrado, se pueden presentar síntomas tales como: náuseas, dolor abdominal, vómitos, diarrea, fiebre, dolor de cabeza y fatiga. Las intoxicaciones alimentarias pueden provocar problemas de salud permanentes e incluso la muerte, especialmente en bebés, mujeres embarazadas (y sus fetos), ancianos, enfermos y otras personas con sistemas inmunológicos débiles. La demora entre el consumo de un alimento contaminado y la aparición de los primeros síntomas de enfermedad se denomina periodo de incubación y depende del agente y de la dosis consumida. Si los síntomas aparecen de 1 a 6 horas tras la ingesta, sugiere que la intoxicación es debida a una toxina bacteriana o sustancia química, más que a la presencia de bacterias vivas (Taylor and Gilbert, 1975)

En una toxoinfección alimentaria, durante el periodo de incubación, los microbios pasan del estómago al intestino, se adhieren a las células de las paredes intestinales y empiezan a multiplicarse allí. Algunos tipos de microorganismos permanecen en el intestino, otros producen toxinas que son absorbidas por la corriente sanguínea y otros pueden invadir directamente los tejidos corporales.

La dosis infecciosa se define como la cantidad del agente que debe ser consumida para dar lugar a las manifestaciones clínicas de intoxicación alimentaria, dependiendo esto del agente y de otras variables, como por ejemplo edad, peso y estado de salud de la persona que lo ingiere (European Commission, 1997).

BACILLUS CEREUS Y SU IMPLICANCIA EN INTOXICACIONES ALIMENTARIAS

Bacillus cereus está clasificado como un organismo de riesgo Categoría 2 y se considera que el consumo de alimentos contaminados con más de 1×10^4 esporas o células vegetativas bacterianas por gramo puede conducir a una intoxicación alimentaria. (European Commission, 1997). El primer registro de una gastroenteritis causada por *Bacillus cereus* data del año 1900 (<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap12.html>)

Esta especie produce varias toxinas (Granum, 1994; Pirttijarvi et al., 1998, 1999; in't Veld et al., 2001), siendo las más importantes la **toxina emética (cereulida)** y el **complejo enterotóxico**.

La **cereulida** es una proteína pequeña, formada por doce enlaces peptídicos, que provoca inflamación mitocondrial de las células infectadas (Ehling-Schulz et al., 2005); es un componente termoestable, resistente a tripsina y pepsina, ocasiona síntomas de náuseas y vómitos, y ocasionalmente diarrea y dolor abdominal; el período de incubación es de 1 a 5 h. (Taylor and Gilbert, 1975). Si bien la infección es autolimitada, cuando se sintetiza en fase estacionaria de crecimiento puede ocasionar una falla fulminante del hígado y daño renal (Agata et al., 1994, Agata et al., 1995).

El **complejo enterotóxico** está formado por tres enterotoxinas designadas: **a) Hemolisina BL (HBL)** que está constituida por tres proteínas denominadas B, L₁, y L₂. La combinación de los tres componentes proteicos son necesarios para su actividad biológica, que incluye actividad hemolítica, acumulación de fluidos y necrosis vascular en ensayos con ratones. Además

se ha registrado toxicidad en células ováricas y tejido de retina en hamster (Beecher and MacMillan, 1990, 1991; Beecher and Wong, 1994; Beecher et al., 2000) y constituye el factor de mayor virulencia que puede producir *Bacillus cereus* (Thaenthanee et al., 2005). La HDL es estable a 45 °C y no se inactiva por enzimas proteolítica; **b)** la **enterotoxina-T** es un componente simple no inactivado por enzimas proteolíticas (Agata et al., 1995) y produce vacuolización de tejidos y **c)** el **complejo enterotóxico no-hemolítico (NHE)** no asociado a toxicidad (Granum et al., 1996).

Los síntomas ocasionados por el **complejo enterotóxico** incluyen dolor abdominal, diarrea acuosa, náuseas y vómitos y, ocasionalmente fiebre. El tiempo de incubación es de 6 a 15 h. y persiste durante 24 h.

Las cepas de *B. cereus* también pueden producir 3 diferentes **fosfolipasas C**, las que junto con la **hemolisina BL** han sido citadas como factores de virulencia para la producción de endoftalmitis fulminante con necrosis de la retina (Beecher et al., 2000).

La mayoría de los casos por intoxicación alimentaria por enterotoxinas, a través de alimentos contaminados no son reportados, por lo tanto la incidencia de los mismos está subestimada *Bacillus cereus* ha sido citado como el agente causal del 33 % de las intoxicaciones alimentarias, los casos reportados entre los años 1988-1993 van desde el 0.8 % en Japón al 47 % en Noruega (Granum et al., 1994). Con respecto a los casos denunciados se destacan dos de gravedad extrema: un caso de deceso por ingestión de toxina emética y otros tres por toxina necrótica (Lunden et al., 2000; Mahler et al., 1997)

De acuerdo con lo registrado en diferentes países, al menos la mitad de las cepas de *B. cereus* que se aíslan producen enterotoxinas (Granum, 1994), pero sólo un pequeño número de las mismas está presente en los alimentos en

cantidades suficientes como para causar una enfermedad transmisible por alimentos (ETA).

La organización mundial de la salud (OMS), estima que las enfermedades causadas por ingestión de alimentos contaminados constituyen uno de los problemas sanitarios más difundidos en la actualidad (www.codexalimentarius.net). Desde 1884 se ha relacionado la presencia de *Staphylococcus aureus* con toxoinfecciones. Los estafilococos excretan numerosas proteínas con función enzimática y /o tóxicas. Diferentes enzimas como proteasas, lipasas, lecitinasas, coagulasa libre o *Clumping Factor*, coagulasa fija y termonucleasas (Dnasa) intervienen en la degradación de tejidos y macromoléculas facilitando nutrientes para el crecimiento de las bacterias y provocando, al menos en parte, los síntomas de diferentes cuadros clínicos. La coagulasa que provoca la coagulación de la sangre (el fibrinógeno pasa a fibrina que forma los coágulos) es el carácter asociado a esta especie y vinculado a su patogenicidad más relevante. Los coágulos inducidos por la coagulasa dan lugar a la acumulación de fibrina alrededor de las bacterias protegiéndolas, fundamentalmente frente a la fagocitosis (Mandell., et al, 2000; Dinges., et al, 2000; Madigan., et al; 2003). Asimismo la capacidad de coagular o digerir la caseína y fermentar la lactosa de la leche torasolada están relacionadas con las funciones enzimáticas y /o tóxicas de la especie.

HIPÓTESIS

Las cepas de *B. cereus* y *B. megaterium* que producen *clearing* en medios con yema de huevo tienen la capacidad de coagular plasma.

Existen cepas de *B. megaterium* productoras de enterotoxinas presentes en miel.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DETERMINACIÓN DE COAGULASA LIBRE Y COAGULASA FIJA

Esta determinación comprueba la capacidad de un organismo de coagular el plasma por acción de la enzima coagulasa.

(<http://www.monografias.com/trabajos15/micrococcaceae/micrococcaceae.shtm>

)

Las bacterias productoras de esta enzima, segregan una pro-coagulasa, la cual es activada por un factor plasmático perteneciente a la fracción alfa globulina, semejante pero no idéntica a la protrombina. Esta pro-coagulasa se presenta en dos formas fija y libre.

3.1.A. Determinación de coagulasa fija a las células bacterianas: La determinación de coagulasa fija o *Clumping factor*, la cual se realiza siguiendo el protocolo detallado a continuación:

En un portaobjetos se suspende la cepa a estudiar en una gota de solución fisiológica, y se agrega una gota de plasma de conejo. La evaluación se efectúa a los 20 segundos como tiempo máximo de lectura.

Observación. Reacción positiva: formación de un coágulo visible. Si la reacción es negativa es recomendable realizar la determinación de coagulasa libre.

3.1.B. Determinación de coagulasa libre: Detecta la coagulasa libre y la fija. A continuación se detalla el protocolo utilizado:

Se tomaron dos colonias aisladas de un desarrollo de 24 h en agar TS, y se sembraron en tubos con 2 ml de Caldo Cerebro Corazón. Se incubaron durante 20-24 horas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$, al cabo de los cuales se trasvasaron 100 μl a tubos que contenían 300 μl de plasma de conejo, e incubaron a $35\text{-}37^{\circ}\text{C}$. Se

examinaron a la hora y a intervalos de media hora con el fin de detectar la presencia de coágulos, las observaciones se repitieron hasta cuatro horas.

Observación: La aparición de un coágulo bien diferenciado es indicativa de la actividad coagulasa positiva. Es muy importante en esta etapa la correcta observación ya que las bacterias son capaces de producir una fibrolisina que actúa disolviendo el coágulo y puede dar lugar a falsos negativos. A su vez hay que tener cuidado a la hora de diferenciar entre un coágulo verdadero y una formación similar a un saco, (pseudocoágulo), los cuales se deshacen al agitar el tubo suavemente.

Tipos de Reacciones

Reacción negativa

Coágulos muy pequeños desorganizados

Reacción Positiva.

- a. Aparece un coágulo pequeño organizado
- b. Aparece un gran coágulo organizado
- c. Aparece coagulado todo el contenido del tubo. El coágulo se mantiene aún cuando se invierte el tubo.

3.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE COAGULACIÓN EN LECHE TORNASOLADA

La leche tornasolada es un medio diferencial que se emplea para determinar varias funciones metabólicas de un microorganismo como por ejemplo, fermentación de la lactosa, digestión de la caseína y coagulación de la caseína. El tornasol incorporado a la leche es un indicador de pH y un indicador

de óxido reducción. La leche tornasolada presenta un color azul violáceo (pH 6.8) cuando está sin inocular

(http://www.foodcontrol.com/determinaciones_2.htm, http://edicion-micro.usal.es/Web/educativo/m_especial/35btexto3.htm)

Para realizar la prueba de coagulación se emplearon tubos con tapa a rosca conteniendo 5 ml de leche tornasaloda (Anexo I), los que se autoclavaron durante 10 minutos a 115 °C. Durante el proceso de autoclavado la leche tornasaloda se reduce a su leucobase de color blanco que al enfriarse absorbe oxígeno y vuelve al color violáceo primitivo. Los tubos se inocularon con las cepas a ensayar (1 colonia por tubo) e incubaron a 37°C y la evaluación se efectuó a las 24 h., 4 días, 7, 14, y 28 días. La observación e interpretación de los resultados, se realizó por comparación con un testigo sin inocular.

- Reacción negativa: Color violáceo

Tipos de reacciones positivas.

- Coloración rojo rosado a rojo intenso: Reacción ácida (pH. 4.5), por fermentación de la lactosa
- Coloración Rosado claro: la bacteria fermenta glucosa pero no lactosa, reacción levemente ácida
- Coloración blanca Reducción del tornasol a su leucobase. Reacción reductora.
- Formación de un coágulo o cuajo. Coagulación de la proteína de la leche, (caseína). Coágulo ácido: grumos rosados solubles en alcali – coágulo dulce: coágulo suave que se retrae y forma un fluido grisáceo, insoluble en alcali (el tornasol queda azul).
- Clarificación del medio por digestión de la caseína

- Producción de gas. Se manifiesta por la aparición de burbujas en el medio.
- Fermentación turbulenta. El coágulo ácido es fragmentado por la abundante producción de gas.
- Proteólisis. La leche aparece transparente como resultado de la hidrólisis de caseína, generalmente comienza en la superficie del tubo y da reacción alcalina.

3.3 IDENTIFICACIÓN DE CEPAS ENTEROTOXIGÉNICAS POR PCR EMPLEANDO *PRIMERS* ESPECÍFICOS B, B', L-1, L-2 Y ET.

Para esta etapa del trabajo se seleccionaron los *primers* para cada uno de los componentes del complejo HDL, denominados B, B', L-1 y L-2 y para la enterotoxina -T (Int'Veld et al, 2001) y se detallan en la tabla 3.1. Estos *primers* fueron diseñados en base a secuencias homólogas a los genes *hbIA*, *hbIB*, *hbID*, *hbIC* del complejo HDL, y *bce T* (Granum., et al, 1996; Ryan., et al, 1997; Agata et al., 1995).

Para realizar la identificación de cepas enterotoxigénicas se utilizó el siguiente protocolo experimental: La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 20 μ l, conteniendo 1 μ M de cada uno de los *primers*: B, B', L-1, L-2 Y ET (Tabla 3.1) (Int'Veld et al, 2001), 2 μ l de buffer Promega® (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 9.0, y 0.1% triton X-100), desoxirribonucleótidos (dGTP, dTTP, dATP, dCTP), en una concentración de 1.5mM; 1mM Cl_2Mg ; 1 U Taq polimerasa (Promega®), y 2 μ l del sobrenadante de la preparación rápida de ADN crudo. Las condiciones de ciclado para los *primers* se detallan a continuación en el siguiente esquema:

Desnaturalización inicial	94 °C	3 minutos	} 5 ciclos
Desnaturalización	94 °C	1.0 minuto	
Annealing	(Ver Tabla 3.1)	1.0 minuto	
Extensión	72 °C	3.0 minutos	
Desnaturalización	94 °C	1.0 minuto	} 30 ciclos
Annealing	54 °C	1.0 minuto	
Extensión	72 °C	3.0 minutos	
Extensión final	72 °C	10.0 minutos	

Tabla 3.1. Secuencia de *primers* empleados para la detección de los componentes del complejo HDL y la enterotoxina-T

<i>Primers</i>	Secuencia (5'----- 3')	T °C Annealing	Amplicón (pb)
B	ACGAACAATGGAGATACGGC TTGGTAGACCCAAAATAGCACC	64	622
B'	ATAACTATTAATGGAAATACA CTCCTTGTAATCTGTAATCCCT	62	232
L-1	ATATTCACCTTAATCAAGAGCTGTCACG CCAGTAAATCTGTATAATTTGCGCCC	60	810
L-2	TATCAATACTCTCGCAACACCAATCG GTTTCTCTAAATCATCTAAATATGCTCGC	58	977
ET	TTACATTACCAGGACGTGCTT TGTTTGTGATTGTAATTCAGG	56	428

Para visualizar los productos de PCR generados por los diferentes *primers*, se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1.6% en buffer TBE 0.5X, que se corrió durante dos horas a 80V, en una cuba de electroforesis horizontal Bio-Rad. Al finalizar la corrida el gel se expuso bajo luz UV, previo tratamiento con bromuro de etidio. La electroforesis fue digitalizada utilizando el programa Digi Doc.

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

Se seleccionaron las 133 cepas de *B. cereus* y las 53 de *B. megaterium* como unidades de estudio (OTU), se eligieron los siguientes caracteres: actividad coagulasa en plasma de conejo (*Clumping factor* y coagulasa libre),

coagulación en leche tornasolada, reacción de *clearing*, reacción de PCR para los *primers* B, B', L-1, L-2 y ET y actividad beta discontinua en placas de agar sangre.: Posteriormente se realizó el análisis de similitud con el programa NTSYS-PC, según la metodología detallada en el capítulo 2.

3.5 DESARROLLO DE UNA TÉCNICA PARA DETECTAR CEPAS POTENCIALMENTE ENTEROTÓXICAS DIRECTAMENTE DE MIEL.

Para detectar la presencia de cepas enterotóxicas se realizó la extracción de ADN, directa de miel, para la cual se inocularon artificialmente 10 muestras de miel, de acuerdo con el siguiente protocolo:

De cultivos de 7 días de *Bacillus cereus* en agar TS (100 % de esporas) se seleccionaron colonias aisladas y se prepararon suspensiones bacterianas con agua destilada estéril con las siguientes concentraciones microbianas en UFC /ml: 10^{12} , 10^{10} , 10^9 , 10^8 y 10^6 . La miel se homogeneizó en un Baño María a 40°C – 45°C y diluyó al 50 % v/v en agua destilada estéril, se centrifugó a 3500g durante 40 minutos. El sobrendante fue eliminado dejando 3 ml de la dilución y se mezcló utilizando con *vortex*. Se realizaron diluciones (1/20, 1/50, 1/100 y 1/1000), con agua destilada estéril. Posteriormente se tomaron 50 μl de cada una de las diluciones a las cuales se agregó 150 μl de resina Chelex al 6 %p/v. Las muestras se incubaron según protocolo de extracción de ADN crudo detallado en la sección 2.1 (Capítulo 2). Las condiciones de amplificación fueron las detalladas en el capítulo 3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La capacidad de las cepas de *Bacillus cereus* de coagular el plasma por acción de la enzima coagulasa, fue observada como reacción directa de coagulación (*Cumplig Factor*) en el 43% de las cepas, mientras que el 79% presentaron reacción tardía indicadora de la presencia de Coagulasa Libre (Figura 3.1) (Tabla 3.2). El 16 % de las cepas de *Bacillus megaterium* presentaron reacción instantánea de coagulación en plasma de conejo, en cambio el 74 % presentó la actividad en forma tardía como coágulos bien formados entre la hora y las 4 hs del ensayo. (Figura 3.1) (Tabla 3.2)

Con respecto a la actividad de coagulación en leche tornasolada, el 100 % de las cepas de *B. cereus* dieron actividad positiva. El 10 % de las cepas presentó una coloración rosa claro, por fermentación de la glucosa, mientras que el 12% formaron un coágulo insoluble y el 4 % redujo el tornasol a leucobase (Blanco). A su vez se observó que el 11% de las cepas clarificó el medio por digestión de la caseína (Figura 3.2). Todas las cepas de *B. megaterium* presentaron actividad coagulasa en leche tornasolada, donde el 9 % de las mismas produjo fermentación de glucosa, mientras que el 26 % formaron un coágulo insoluble y sólo el 4 % presentó una reacción reductora del tornasol. La digestión de caseína fue observada en el 23 % de las cepas.

No se observó ningún tipo correlación entre la actividad coagulasa en plasma o en leche y las otras características fenotípicas (Capítulo I) y/o genotípicas (Capítulo II) anteriormente analizadas.

Las reacciones de coagulación tanto en plasma como en leche tornasolada han sido ampliamente estudiadas en *Staphylococcus aureus*, donde aquellos con actividad coagulasa positivos, en su mayoría, han sido implicados en intoxicaciones alimentarias (Luczak et al., 2006, Reeves et al., 1981), pero no existen antecedentes en *B. cereus* ni en *B. megaterium*, con excepción de los resultados presentados en esta tesis.

La identificación de cepas enterotoxigénicas por PCR empleando *primers* específicos B, B', L-1, L-2 y ET para las cepas de *B. cereus* dio resultados variables. En el 20 % de las cepas se observó el amplicón de 622 pb y en el 34 % el amplicón de 232 pb, ambos correspondientes al componente B del complejo enterotóxico HDL. En el 60 % se observó el amplicón de 810 pb, correspondiente al componente L-1, y en el 33 % de las cepas se registró el amplicón de 977 bp correspondiente al componente L-2. Solo el 15 % presentó los tres componentes de la proteína tripartita que forma el **complejo enterotóxico** (Figura 4.3) (Tabla 4.1). Con respecto a la **enterotoxina T**, el 38 % presentó el amplicón de 428 pb, correspondiente al componente único de la proteína. (Figura 4.3)(Tabla 4.2). Es interesante destacar que las cepas: Bc 20, Bc 21, Bc 46; Bc 48, Bc 54, Bc 73, Bc 75, Bc 85, Bc 92, Bc 97 y Bc 112, tienen todos los componentes del **complejo HDL** y un 95 % de ellas presentaron actividad coagulasa tardía. Las cepas de *B. megaterium* también presentaron resultados variables con respecto a la caracterización de cepas tóxicas por PCR. El 26 % presentó el amplicón B, y el 6 % presentó el amplicón B'. El componente L-1 fue observado en el 23 % de las cepas, y el L-2 en el 8 %. Ninguna de las cepas presentó en forma conjunta los tres componentes del complejo HDL. El componente ET fue observado en el 17 % de las cepas. (Figura 3.3) (Tabla 3.3).

Según algunos autores (in't Veld *et al.*, 2001) para que una cepa de *Bacillus cereus* posea actividad tóxica, debe tener presentes los tres componentes del complejo HDL, en cambio para otros (Beecher and Wong, 1996), la mayor actividad toxicogénica, se produce al tener presentes los tres componentes, debido a que cada uno de ellos está implicado en una actividad diferente.

La búsqueda de una correlación entre la presencia de los genes que codifican para el complejo enterotóxico y la reacción de clarificación del medio en lecitina (*clearing*) (capítulo 1) resultó negativa, en cambio si se observó correlación positiva entre las cepas de *Bacillus cereus* que producían un patrón discontinuo de β hemólisis con la presencia de todos los componentes del complejo HDL, y la enterotoxina T. Con respecto a las cepas de *Bacillus megaterium*, no se encontró ninguna correlación entre la presencia de los genes que codifican para el complejo HDL y actividad coagulasa o alguna otra característica típica de cepas productoras de enterotoxinas.

La extracción de ADN directa de miel resultó efectiva en el 70 % de las muestras, no dando resultados positivos en aquellas con una concentración bacteriana del orden de 10^{10} y 10^{12} UFC /ml. Esto podría deberse a un exceso de ADN bacteriano presente en la muestra que inhibe la reacción de PCR o también a la liberación de mayores cantidades de DNAsas en el proceso de extracción del molde que lisarían el ADN *target*.

Se han probado otras metodologías de extracción directa de ADN a partir de miel para detectar especies bacterianas patógenas de abejas, como por ejemplo *Paenibacillus larvae* agente causal de loque americana y *Melissococcus plutonius*, agente causal de loque euporea pero con resultados

muy variables y poco reproducibles (Alippi et al., 2004; Bakonyi et al., 2003; Forsgren et al., 2005).

Por los resultados expuestos en este capítulo se concluye que *B. megaterium* presentó algunas de las características propias de cepas tóxicas, como presencia de genes que codifican para el complejo HDL y capacidad para coagular el plasma, lo que representaría el primer registro de cepas potencialmente enterotóxicas de esta especie a nivel mundial. Asimismo, este trabajo de tesis es la primera caracterización de cepas de *B. cereus* y *B. megaterium* potencialmente tóxicas aisladas miel.

Figura 3.1. Actividad coagulasa en plasma de conejo. A. Bc 10 (+), B. ATCC

11776 (-)

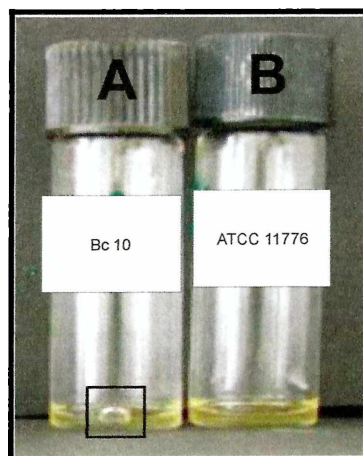
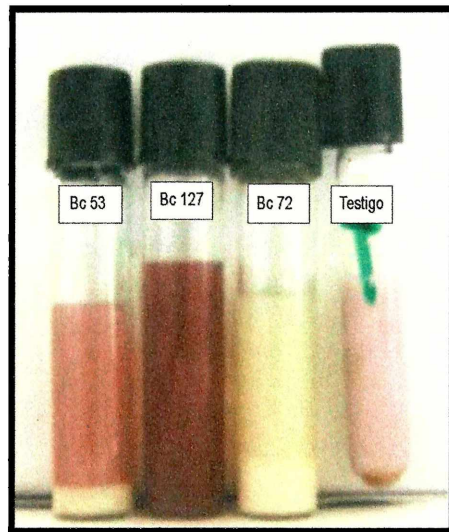


Figura 3.2. Actividad coagulasa en leche tornasolada



- **Bc53.**Coloración Rosado claro: fermentación de la glucosa pero no lactosa
- **Bc 127.** Coloración rojo rosado a rojo intenso: fermentación de la lactosa
- **Bc 72.** Formación de un coagulo o cuajo. Clarificación del medio por digestión de la caseína.
- **Testigo.** Control de reacción negativa, color violáceo.

Figura 3.3. Patrones obtenidos con los diferentes set de *primers* del complejo HDL y de la enterotoxina T. Líneas (izquierda a derecha). M, Marcador de peso molecular (λ *EcoHind* III), 1-3 = Bc 20, Bc 21 y Bc37 (*primer* B 622bp); 4-6= Bc 20, Bc 21 y Bc37 (*primer* B' 232pb) ; 7-9= Bc 20, Bc 21 y Bc37 (*primer* L-1 810 pb); 10-12 = Bc 20, Bc 21 y Bc37 (*primer* L-2 977bp); 13-15= Bc 20, Bc 21 y Bc37 (*primer* ET 428bp); M, Marcador de peso molecular λ *EcoHind* III.



Tabla 3.2. Resultados de las reacciones de coagulación en plasma de conejo, y de la reacción de PCR para la detección de cepas tóxicas de *Bacillus cereus*

Cepa	C Fija	C libre	B	B'	L-1	L-2	ET
ATCC11776	-	-	-	-	-	-	+
Bc1	-	+	+	+	+	-	+
Bc2	-	+	-	+	+	-	+
Bc3	+	+	-	+	+	-	-
Bc4	+	+	-	+	+	-	-
Bc5	+	+	-	-	+	-	-
Bc6	-	-	+	+	+	-	+
Bc7	-	+	-	+	+	+	+
Bc8	+	+	+	-	-	-	+
Bc9	+	+	+	-	-	-	+
Bc10	+	+	+	+	+	+	-
Bc11	-	+	+	-	+	-	-
Bc12	+	+	-	-	-	-	-
Bc13	+	+	-	-	-	-	-
Bc14	+	+	-	+	+	+	-
Bc15	-	-	-	+	+	-	-
Bc16	-	-	-	-	-	-	+
Bc17	-	+	-	-	-	-	-
Bc18	+	+	-	-	-	-	+
Bc19	+	+	-	-	+	+	+
Bc20	+	+	+	+	+	+	+
Bc21	-	-	+	+	+	+	+
Bc22	-	+	-	+	+	+	+
Bc23	+	+	-	+	+	+	+
Bc24	+	+	-	+	+	+	-
Bc25	-	-	-	-	-	-	-
Bc26	+	+	-	-	+	+	-
Bc27	+	+	-	-	-	-	+
Bc28	+	+	-	+	+	+	-
Bc29	-	-	-	+	-	-	+
Bc30	+	+	-	+	+	+	+
Bc31	+	+	-	+	+	+	-
Bc32	+	+	-	+	+	+	+
Bc33	+	+	-	+	-	-	+
Bc34	+	+	-	+	+	+	-
Bc35	-	-	-	-	+	+	+
Bc36	+	+	-	-	+	-	+
Bc37	-	+	+	+	+	+	+
Bc38	-	+	-	+	+	+	+
Bc39	-	+	+	+	+	+	-
Bc40	-	-	-	-	-	-	-
Bc41	-	-	-	-	+	+	-
Bc42	+	+	-	-	+	+	+
Bc43	-	+	-	-	-	-	-
Bc44	+	+	-	-	-	-	-
Bc45	-	+	-	+	-	-	-
Bc46	+	+	+	+	+	+	+
Bc47	-	+	+	+	+	+	+
Bc48	-	+	+	+	+	+	+
Bc49	-	-	-	-	-	-	-

Continuación Tabla 3.2

cepa	CFija	Clibre	B	B'	L-1	L-2	ET
Bc50	+	+	-	-	+	+	-
Bc51	+	+	-	-	-	-	+
Bc52	-	-	-	-	+	+	+
Bc53	-	-	-	-	-	-	-
Bc54	-	+	+	+	+	+	+
Bc55	-	-	-	-	-	-	+
Bc56	+	+	-	-	-	-	+
Bc57	-	-	-	-	-	-	+
Bc58	-	-	-	-	+	+	-
Bc59	-	+	-	-	-	-	+
Bc60	+	+	-	-	+	+	+
Bc61	-	-	-	-	+	+	-
Bc62	-	-	-	-	-	-	-
Bc63	-	+	-	-	+	+	+
Bc64	+	+	+	-	+	+	+
Bc65	+	+	-	-	+	+	+
Bc66	-	+	-	-	-	-	-
Bc67	-	+	-	-	+	+	+
Bc68	+	+	-	-	+	+	+
Bc69	-	+	+	-	+	+	+
Bc70	-	-	-	-	-	-	-
Bc71	-	+	+	-	+	+	+
Bc72	-	-	-	-	-	-	-
Bc73	+	+	+	+	+	+	+
Bc74	-	-	+	-	+	+	-
BC75	-	-	+	+	+	+	+
Bc76	-	-	-	-	-	-	-
BC77	-	-	-	-	+	+	-
Bc78	-	+	-	-	+	+	-
Bc79	+	+	-	-	-	-	-
Bc80	+	+	-	-	-	-	-
Bc81	-	-	-	-	-	-	-
Bc82	-	+	+	+	+	+	+
Bc83	+	+	-	-	-	-	-
Bc84	-	+	-	-	-	-	-
Bc85	+	+	+	+	+	+	+
Bc86	+	+	-	-	-	-	-
Bc87	+	+	-	-	-	-	-
Bc88	+	+	-	-	-	-	-
Bc89	+	+	+	+	+	+	+
Bc90	-	-	-	-	-	-	-
Bc91	-	+	+	-	-	-	-
Bc92	+	+	+	+	+	+	+
Bc93	-	-	-	-	-	-	-
Bc94	-	+	-	-	-	-	-

Continuación Tabla 3.2.

cepa	CFija	CLibre	B	B'	L-1	L-2	ET
Bc95	-	+	-	-	-	-	-
Bc96	-	+	-	-	-	-	-
Bc97	+	+	+	+	+	+	+
Bc98	-	-	-	-	-	-	-
Bc99	-	-	-	-	-	-	-
Bc100	+	+	-	-	-	-	-
Bc101	+	+	-	-	-	-	-
Bc102	-	-	-	-	-	-	-
Bc103	+	+	-	-	+	+	-
Bc104	+	+	-	-	+	+	-
Bc105	-	+	-	+	+	+	-
Bc106	+	+	-	-	+	+	-
Bc107	+	+	+	+	+	+	+
Bc108	+	+	-	-	+	+	-
Bc109	-	+	-	+	+	+	-
Bc110							
Bc111	+	+	-	-	+	+	-
Bc112	+	+	+	+	+	+	+
Bc113	-	-	+	+	+	+	+
Bc114	-	-	-	-	-	-	-
Bc115	-	+	-	-	+	+	-
Bc116	-	+	-	-	+	+	-
Bc117	-	-	-	+	-	-	-
Bc118	-	-	-	-	+	+	-
Bc119	+	+	-	-	+	+	-
Bc120	-	-	-	-	+	+	-
Bc121	-	-	-	-	-	-	-
Bc122	-	-	+	+	+	+	-
Bc123	-	-	-	-	+	+	-
Bc124	+	+	-	-	+	+	-
Bc125	-	+	-	-	+	+	-
Bc126	+	+	-	-	-	-	-
Bc127	+	+	-	-	+	+	-
Bc128	-	-	-	-	+	+	-
Bc129	-	-	-	-	+	+	-
Bc130	-	+	-	-	+	+	-
Bc131	-	+	-	-	+	+	-
Bc132	-	+	-	-	+	+	-

Tabla 3.3. Resultados de las reacciones de coagulación en plasma de conejo, y PCR para la detección de cepas tóxicas *Bacillus megaterium*

Cepa	CFija	CLibre	B	B'	L-1	L-2	ET
NRRLB-939	-	-	-	-	-	+	-
Bm1	+	+	-	-	-	-	-
Bm2	+	+	-	+	-	-	-
Bm3	-	-	+	-	+	-	-
Bm4	+	+	-	-	-	+	+
Bm5	+	+	+	-	-	-	+
Bm6	-	-	-	-	-	-	-

Continuación Tabla 3.3.

Cepa	CFija	CLibre	B	B'	L-1	L-2	ET
Bm7	+	+	+	-	-	-	-
Bm8	+	+	+	-	+	+	+
Bm9	+	+	+	-	+	-	+
Bm10	-	+	-	-	-	-	-
Bm11	+	+	-	-	-	-	+
Bm12	-	+	-	-	-	-	-
Bm13	+	+	-	-	-	-	-
Bm14	-	+	-	-	+	-	-
Bm15	+	+	+	-	-	+	+
Bm16	+	+	-	-	+	-	-
Bm17	-	+	+	-	-	-	-
Bm18	-	-	-	-	-	-	-
Bm19	-	+	-	-	-	-	-
Bm20	+	+	-	-	-	-	-
Bm21	+	+	-	-	+	-	+
Bm22	-	+	-	-	+	-	-
Bm23	+	+	-	-	-	-	-
Bm24	-	+	-	-	-	-	-
Bm25	-	+	-	-	-	-	-
Bm26	-	-	-	-	-	-	-
Bm27	-	-	-	-	-	-	-
Bm28	-	+	-	-	-	-	-
Bm29	+	+	+	+	-	-	-
Bm30	-	+	-	-	-	-	-
Bm31	-	-	-	-	+	-	-
Bm32	-	-	-	-	-	-	-
Bm33	-	-	-	-	-	-	-
Bm34	-	+	-	-	-	-	-
Bm35	-	+	+	-	+	-	-
Bm36	-	+	+	-	+	-	+
Bm37	-	-	+	+	-	-	-
Bm38	-	-	+	-	-	-	-
Bm39	-	-	-	-	-	-	+
Bm40	-	+	+	-	-	-	-
Bm41	-	+	-	-	-	-	-
Bm42	+	+	-	-	-	-	-
Bm44	-	+	+	-	-	-	-
Bm44	-	+	-	-	-	-	-
Bm45	-	+	-	-	+	-	-
Bm46	+	+	-	-	-	-	-
Bm47	-	-	-	-	-	-	-
Bm48	+	+	-	-	+	-	-
Bm49	+	+	-	-	-	+	-
Bm50	+	+	-	-	-	-	-
Bm51	+	+	-	-	-	-	-
Bm52	-	-	-	-	-	-	-

Abreviaturas.

C Fija. Actividad coagulasa fija

L-2. Componente del complejo H

C libre. Actividad coagulasa libre

ET. Enterotoxina ET

B Componente del complejo HDL

L-1. Componente del complejo HDL

B'. Componente del complejo HDL

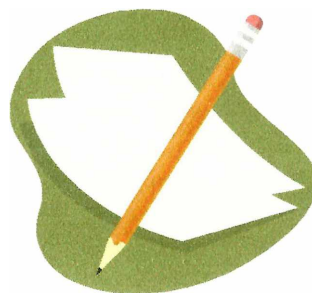
BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Agata , N; Mori , M; Ohta, M; Suwan ,S; Ohtani , I; and Isobe, M. 1994. A novel dodecadeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol Lett.* 121:31-34.
- Agata, N; Ohta , M; Mori, M; and Isobe, M. 1995. A novel dodecadeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett.* 129:17-20.
- Agata, N; Ohta, M; Arakawa ,Y, and Mori, M. 1995. The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein. *Microbiology.* 141:983-8.
- Alippi A.M; Reynaldi, F.J; López, A.C; De Giusti, M.R. and Aguilar O.M. 2004 .Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae larvae* and incidence of American Foulbrood in Argentinean honeys from Buenos Aires Province. *Journal of Apicultural Research* 43: 135-143.
- Bakonyi, T; Derakhshifar, I; Grabensteiner, E. and Nowotny, N. 2003 Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: comparison with isolation and biochemical characterization. *Applied and Environmental Microbiology.* 69: 1504–1510.
- Beecher, D.J; and Wong A.C.L. 1994. Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin immunoassay kits. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4614-4616.
- Beecher, DJ; and MacMillan, JD.1990 A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus* *Infect Immun.* 58:2220-2227.
- Beecher, D.J; Olsen, T.W; Somers, E.B; and Wong A.C.L. 2000. Evidence for contribution of tripartite hemolysis BL, phosphatidylcholine-preferring phospholipase C., and collagenase to virulence of *Bacillus cereus* endophthalmitis. *Infection and Immunity* 68: 5269-5276.
- Dinges,M.M; Orwin ,P.M and Schlievert,M. 2003. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol.Rev.*13: 16-34
- European Commission, 1997. Harmonization of safety criteria for minimally processed foods. Inventory report FAIR concerted action FAIR CT96-1020.
- Ehling-Schulz , M; Vukov , N; Schulz, A; Shaheen, R; Andersson, M; Martlbauer, , E; and Scherer, S. 2005 Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol.* 71:105-13.
- Forsgren E, Lundhagen AC, Imdorf A, Fries I. 2005. Distribution of *Melissococcus plutonius* in honeybee colonies with and without symptoms of European foulbrood. *Microb Ecol.* 50:369-374

- Granum, P.E. 1994. *Bacillus cereus* and its toxins. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement 76: 61S-66S
- Granum PE; Andersson A; Gayther C; te Giffel M; Larsen H; Lund T and O'Sullivan K. 1996. Evidence for a further enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol Lett. 1996 141:145-9.
- in't Veld, P.H; Ritmeester, W. S; Delfgou-van Asch E.H.M; Dufrenne, J.B; Wernars, K; Smit, E., and van Leusden F.M. 2001. Detection of genes encoding for enterotoxins and determination of the production of enterotoxins by HBL blood plates and immunoassays of psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* isolated from pasteurised milk. *International Journal of Food Microbiology* 64: 63-70.
- Luczak , A. K; Jolanta K; and Waleria, H. 2006. Characteristics of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated in Poland in 1996 to 2004 That Were Deficient in Species-Specific Proteins. J Clin Microbiol.(11): 4018–4024
- Lundén, JM; Miettinen, MK; Autio TJ; and Korkeala, HJ.2000. Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. J Food Prot 63:1204-1207
- Madigan,M.T; Martinko, J.M and Parker, J.2000. Brock. Biología de los microorganismos. Pearson. 10ª edición.
- Mahler,H; Pasi A; Kramer JM; Schulte P, Scoging AC; Bär W; and Krähenbühl S.1997. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. N Engl J Med. 336:1142-1148
- Mandell,G.L; Bennet,J.E and Dolin, R. 2000. Bennet's. Principles and Practique of infectious diseases. 5ª ed. Churchil Livingstone.
- Pirttijarvi, T.S.M.; Ahonen, L.M., Maunuksela, L.M., and Salkinoja-Salonen, M.J. 1998. *Bacillus cereus* in a whey process. *International Journal of Food Microbiology* 44: 31-41.
- Pirttijarvi, T.S.M.; Andersson, M.A., Scoging, A.C. and Salkinoja-Salonen, M.J. 1999. Evaluation of methods for recognizing strains of the *Bacillus cereus* group with food poisoning potential among industrial and environmental contaminants. System. Appl. Microbiol. 22: 133-144.
- Reeves Michael; Drumond Margaret and Tager Morris. 1983. Partial Purification and Characterization of the Multiple Molecular Forms of Staphylococcal Clotting Activity (Coagulase).Journal of Bacteriology. p. 861-868
- Ryan, P.A; Macmillan, J.D and Zilinskas BA.1997. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. J Bacteriol179: 2551-6.
- Taylor AJ; and Gilbert RJ. 1975. *Bacillus cereus* food poisoning: a provisional serotyping scheme. J Med Microbiol. 8:543-50.

-
- **Thaenthanee, S; Wong, AC; and Panbangred, W. 2005 Phenotypic and genotypic comparisons reveal a broad distribution and heterogeneity of hemolysin BL genes among Bacillus cereus isolates. Int J Food Microbiol. 105:203-21.**

CONSIDERACIONES FINALES



CONSIDERACIONES FINALES

- Se conformó un cepario constituido por 132 aislamientos de *Bacillus cereus*, 52 de *Bacillus megaterium*, 7 de *Bacillus mycoides* y 4 de *Bacillus thuringiensis*, todos provenientes de mieles de distintos orígenes geográficos (Capítulo 1).
- La caracterización fenotípica de las cepas de *B. cereus* dió como resultado un 23 % de cepas atípicas (Capítulo 1)
- Se encontró un 75 % de cepas de *B. megaterium* con actividad hemolítica, característica inédita para esta especie (Capítulo 1).
- Un 19 % de las cepas de *B. cereus* y un 72 % de las cepas de *B. megaterium* presentaron una reacción de clarificación en medios con yema de huevo, que no había sido reportada en el género *Bacillus*.
- Se encontró una alta variabilidad genética entre las cepas de *B. cereus* y *B. megaterium* cuando se analizaron sus perfiles *fingerprint* por rep-PCR. (Capítulo 2).
- La técnica rep-PCR resultó de utilidad para el estudio de la diversidad genotípica de cepas de *Bacillus cereus* y *Bacillus megaterium* aisladas de miel (Capítulo 2).
- Se encontraron 2 patrones de restricción por PCR-RFLP entre las cepas de *B. cereus*, demostrando una alta homología intraespecífica (Capítulo 2).
- Se encontraron 2 patrones de restricción por PCR-RFLP entre las cepas de *B. megaterium*, demostrando una alta homología intraespecífica (Capítulo 2)

- **No se encontró ningún tipo de correlación entre los resultados obtenidos por rep-PCR y la caracterización fenotípica de las cepas (Capítulo 2)**
- **El 7 % del total de cepas aisladas de miel resultó ser potencialmente enterotóxico (Capítulo 3).**
- **Esta tesis constituye el primer registro a nivel mundial de cepas de *B. megaterium* potencialmente enterotóxicas. (Capítulo 3)**
- **Esta tesis constituye el primer estudio de diversidad de *B. cereus* aisladas de miel.**
- **Esta tesis constituye el primer estudio de diversidad de *B. megaterium*.**

ANEXOS

MEDIOS DE CULTIVO Y MEDIOS ESPECIALES PARA REACCIONES BIOQUÍMICAS

AGAR PEMBA (en gramos por litro)

Reactivos

Peptona de carne	1.00
Manitol	10.0
Cloruro de sodio	2.00
Sulfato de magnesio	0.10
Fosfato di sódico	2.50
Fosfato monopotásico	0.25
Azul de Bromotimol	0.12
Piruvato de sodio	10.0
Agar	14.0

pH final 7.2 ±0.2 a 25°C

Solución de Polimixina B

Polimixina B 100.000 UI (Britania®)

Solución de Yema de huevo

Emulsión estabilizada y estéril de yema de huevo sin telurito (Britania®)

Preparación

Preparar el medio de cultivo. Esterilizar por autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 50 °C y asépticamente agregar 10.000 unidades de polimixina B Britania® (Resuspendida en 2 ml de agua destilada estéril) y 50 ml de emulsión estabilizada y estéril de yema de huevo Britania®

AGAR TRIPTONA SOYA (en gramos por litro)

Reactivos

Triptena	17.00
Peptona de soya	3.00
Cloruro de sodio	5.00
Fosfato di potásico	2.50
Glucosa	2.50
Agar	15.00

pH final : 7.3 ± 0.2 a 25°C

Caldo Triptona Soya. Ídem sin el agregado de agar.

Preparación.

Calentar hasta disolución total .Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C

MEDIO BASAL PARA CARBOHIDRATOS (en gramos por litro)

Reactivos.

(NH ₄) ₂ HPO ₄	1.00
KCl	0.20
SO ₄ Mg.7H ₂ O	0.20
Extracto de levaduras	0.20
Agar	15.0

Preparación.

Calentar hasta disolución total .Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

AGAR NUTRITIVO (en gramos por litro)

Reactivos

Pluripetona	5.00
Extracto de carne	3.00
Cloruro de sodio	8.00
Agar	15.00

pH 7.3± 0.2 a 25 °C

Caldo Nutritivo. Ídem sin el agregado de agar.

Preparación.

Calentar hasta disolución total .Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

CALDO NITRATO (en gramos por litro)

Reactivos

Peptona	5.0
Extracto de levadura	3.0
KNO ₃	1.0
Agua destilada c.s.p	1000 ml

Ajustar pH 7.00 ± 0.2 a 25°C

Preparación

Calentar hasta disolución total .Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

BUFFER FOSFATO DE SODIO pH 6.

Reactivos

NaH₂PO₄
Na₂HPO₄

Concentración

0.25 M
0.25 M

PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LECITINASA

Reactivos

Agar nutritivo

Yema de huevo al 5 % (Britania®) (Tomar 5 ml de yema de huevo y agregarle 95 ml de agua destilada estéril)

Preparación.

Preparar el agar nutritivo y enfriarlo a 45°C. Agregar la yema de huevo estéril, plaquear en cajas de Petri.

HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN

Reactivos

Agar nutritivo

Almidón soluble

Solución de Lugol. (Yodo 5 gr + Yoduro de potasio 10 gr + agua destilada c.s.p 100 ml)

Preparación.

Preparar agar nutritivo con el agregado de almidón soluble en una concentración final de 0.2 % p/v.

VOGUES-PROSKAUER (V-P)

Reactivos

Caldo T.S

Glucosa (Britania®)

Reactivo A: solución de α -naftol al 5 % en alcohol 96°.

Reactivo B: solución acuosa al 40 % p/v de KOH.

Preparación.

Prepara el caldo TS y agregarle glucosa en una concentración de 0.5 % P/V. Esterilizar la glucosa por milipore de 0.45 μ m de diámetro de poro

REDUCCIÓN DE NITRATOS

Reactivos

Caldo nitrato

Reactivo de Griess Soluciones A y B (Britania®)

Preparación.

Sembrar los aislamientos en Caldo nitrato. Luego de 3 y 7 días tomar 1 ml, trasvasarlo a un tubo, y agregar tres gotas de la solución A + 3 gotas de la solución B del Reactivo de Griess.

UTILIZACIÓN DE ARABINOSA

Reactivos

Medio basal

D(-)Arabinosa

Preparación

Al medio basal adicionarle arabinosa en una concentración final 0.5% p/v. Esterilizar la arabinosa por milipore de 0.45 μ m de diámetro de poro

UTILIZACIÓN DE MANITOL

Reactivos

Medio basal

Manitol

Preparación

Al medio basal adicionarle manitol en una concentración final 0.5% p/v. Esterilizar el Manitol por milipore de 0.45 μ m de diámetro de poro

ACTIVIDAD TIROSINASA

Reactivos

Agar nutritivo (Britania®)

L- Tirosina (Merk®)

Preparación

Preparar el agar nutritivo y adicionarle L-Tirosina en una concentración de 0.5 %p/v. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 1 atmosfera.

LIQUEFACCIÓN DE LA GELATINA

Reactivos.

Agar nutritivo

Gelatina bacteriológica (Britania®)

Preparación.

Preparar agar nutritivo adicionarle 0.4 % p/v de gelatina. Distribuir en tubos tapa a rosca.

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 1 atmosfera.

ACTIVIDAD β -HEMOLÍTICA Y PATRÓN HEMOLÍTICO DISCONTINUO

Reactivos.

Agar nutritivo (Britania®)

CINa (Britania®)

Sangre ovina (Britania®)

Preparación.

Preparar el agar nutritivo suplementado con CINa en una concentración final de 0.15M esterilizar a 1 atmosfera 15 minutos, y una vez frio a 45C agregar sangre ovina en una concentración final de a 5 % p/v.

LECHE TORNASOLADA

Reactivos

Leche descremada en polvo	100 gr.
Polvo de tornasol	0.75 gr.
Agua destilada	1000 ml.
	pH 6.8± 0.2 a 25°C

Preparación.

Distribuir en tubos tapa a rosca 5ml. Autoclavar a 115°C 10 minutos. Durante el proceso de autoclave la leche tornasolada se reduce a su leucobase de color blanco que al enfriarse absorbe oxígeno y vuelve al color violáceo primitivo.

COLORANTES Y SOLUCIONES

TINCIÓN DE GRAM

Reactivos.

Cristal Violeta: Solución A: Cristal violeta 2 gr + etanol 96° 20 ml.

Solución B: oxalato de amonio 0.8 gr + agua destilada 100 ml.

Preparación

Mezclar A + B. Dejar 24 hs. Filtrar con papel de filtro.

Lugol: I₂ 1 gr + IK 2 gr + agua destilada c.s.p. 300 ml

Decolorante: Alcohol etílico 96 °

Safranina: Sol. stock : 10 ml + safranina O 2.5 gr + alcohol etílico 96° 100 ml. Sol. de trabajo: Sol. Stock + agua destilada 90 ml.

SCHAEFFER-FULTON: (para coloración específica de esporas)

Reactivos

Solución acuosa de verde de malaquita al 5% p/v

Sol. acuosa de safranina O al 0.5% p/v

INCLUSIONES LIPÍDICAS

Reactivos

Sudán Black (0.3 gr. En 100 ml. de etanol al 70%).

Xilol

Safranina O: solución acuosa al 0.5% p/v

COLORACIÓN TRIPLE

Reactivos

Solución acuosa de verde malaquita al 5% p/v

Solución acuosa de safranina O al 0.5% en agua destilada

Sudán Black (0.3 gr. en 100 ml de etanol al 70%)

xilol.

COLORACIÓN DE INCLUSIONES CRISTALINAS

Reactivos

Agar nutritivo (Oxoid®)

Metanol (Anedra®)

Fucsina fenicada de Ziehl.

SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN DE ADN Y BUFFER PARA ELECTROFORESIS**ClNa (1M)**

Reactivos	
ClNa	5,8 gr
H ₂ O _(d) c.s.p	100 ml

Tris 1M

Reactivos	
Tris	121 gr
H ₂ O _(d) c.s.p	100 ml

Preparación

pH 8.0: Adicionar a la preparación 42 ml de HCl_c

pH 7.5: Adicionar a la preparación 70 ml de HCl_c

TES

Reactivos	Concentración
Tris-Cl	10 mM
EDTA	10 mM
NaCl	0.15 M

TE

Reactivos	Concentración
Tris-Cl	10 mM
EDTA	10 mM

ACETATO DE AMONIO (1M)

Reactivos	
Acetato de amonio	7.7 gr
H ₂ O _(d) c.s.p	100 ml

TBE 5X (buffer de corrida)

Reactivos	Concentración
Tris-Cl	89 mM
EDTA	2.5 mM
Acido Bórico	89 mM

Preparación

Buffer TBE 0.5X. Tomar 300 ml de Buffer TBE 5X y agregarle 2700 ml de agua destilada

BUFFER DE SIEMBRA (2X)

Reactivos	Concentración final (%v/v)
Azul de bromofenol	0.05
Xylene Cyanol	0.05
Glicerol	70.0
H ₂ O _(d) c.s.p	100 ml

SARCOSIL PRONASA**Reactivos.**

Sarcosil
Pronasa

Preparación.

Sobre 10 ml de TE agregar 100 mg de pronasa, incubar a 37 °C 1 h para activarla. Agregarle 7 ml de sarcosil 30 % p/v en agua bidestilada estéril y 3 ml de TE.

APÉNDICES

Tabla 1. Denominación, origen geográfico y año de aislamiento de las cepas de *Bacillus cereus* empleadas en este trabajo de tesis.

Aislamiento	Origen geográfico	Año de aislamiento
ATCC 11778	USA	-
Bc1	P. Indio (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bc2	Ranchos (Buenos Aires, Argentina)	1990
Bc3	G. Chavez (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bc4	Ranchos (Buenos Aires, Argentina)	1991
Bc5	Ranchos (Buenos Aires, Argentina)	1991
Bc6	La Plata (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bc7	Quilmes (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bc8	Bragado (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bc9	Pte. Perón (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bc10	9 de julio (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bc11	La Plata (Buenos Aires, Argentina)	2000
Bc12	P. Luro (Buenos Aires, Argentina)	1992
Bc13	Ranchos (Buenos Aires, Argentina)	1991
Bc14	Laprida (Buenos Aires, Argentina)	1990
Bc15	Pte. Perón (Buenos Aires, Argentina)	1993
Bc16	Tandil (Buenos Aires, Argentina)	1991
Bc17	P. Alta (Buenos Aires, Argentina)	1992
Bc18	Las Flores (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bc19	La Plata (Buenos Aires, Argentina)	1992
Bc20	Pte.Luro (Buenos Aires, Argentina)	1992
Bc21	Pte. Luro (Buenos Aires, Argentina)	1992
Bc22	Pte. Luro (Buenos Aires, Argentina)	1992
Bc23	25 de mayo (Buenos Aires, Argentina)	1993
Bc24	Tandil (Buenos Aires, Argentina)	1993
Bc25	Pte. Perón (Buenos Aires, Argentina)	1993
Bc26	S. M. Monte (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc27	Magdalena (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc28	Bragado (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc29	Pigüé (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc30	9 de julio (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc31	Las Flores (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc32	Berisso (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc33	Bolívar (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc34	Sta Fe (Santa Fe, Argentina)	2002
Bc35	Chacabuco (Buenos Aires, Argentina)	1993
Bc36	Sta Fe (Santa Fe, Argentina)	2002
Bc37	Resistencia (Chaco, Argentina)	2002
Bc38	Salta (Salta, Argentina)	2002
Bc39	Ranchos (Buenos Aires, Argentina)	1996
Bc40	Guaminí (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bc41	La Plata (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bc42	Guaminí (Buenos Aires, Argentina)	1990
Bc43	Tapalqué (Buenos Aires, Argentina)	1991
Bc44	Pte.Luro (Buenos Aires, Argentina)	1992
Bc45	Villarino (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bc46	Ranchos (Buenos Aires, Argentina)	1992

Continuación de tabla 1.

Aislamiento	Origen geográfico	Año de aislamiento
Bc47	La Rioja (Argentina)	1992
Bc48	Pte. Luro (Buenos Aires, Argentina)	1992
Bc49	Ranchos (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc50	Chascomus (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc51	Tandil (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc52	Pigue (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc53	Gorina (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc54	Chivilcoy (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc55	Pigüé (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc56	Henderson (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc57	Henderson (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc58	Gorina (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc59	Chascomus (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc60	Capital Federal (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc61	Brandsen (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc62	Sta. Fe (Santa Fe, Argentina)	2002
Bc63	México	2001
Bc64	México	2001
Bc65	México	2001
Bc66	Chivilcoy (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bc67	Pigue (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc68	México	2001
Bc69	La Plata (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bc70	Rauch (Buenos Aires, Argentina)	1990
Bc71	La Plata (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bc72	Pte. Luro (Buenos Aires, Argentina)	1996
Bc73	Río Negro (Argentina)	1996
Bc74	Santa Rosa (La Pampa, Argentina)	1996
Bc75	La Plata (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc76	G. Lavalle (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bc77	La Plata (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc78	Buzios(Río de Janeiro, Brazil)	2002
Bc79	Buzios(Río de Janeiro, Brazil)	2002
Bc80	Buzios(Río de Janeiro, Brazil)	2002
Bc81	Laprida (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bc82	Laprida (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bc83	La Plata (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc84	La Plata (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc85	G Pueyrredon (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc86	C. Suarez (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bc87	25 de mayo (Buenos Aires, Argentina)	2000
Bc88	T. Lauquen (La Pampa, Argentina)	2000
Bc89	T. Lauquen (La Pampa, Argentina)	2000
Bc90	G Lavalle (Buenos Aires, Argentina)	2002

Continuación de tabla 1.

Aislamiento	Origen geográfico	Año de aislamiento
Bc91	R. Pérez(Buenos Aires, Argentina)	2001
Bc92	Chascomus (Buenos Aires, Argentina)	2000
Bc93	Pte Luro (Buenos Aires, Argentina)	1996
Bc94	Balcarce (Buenos Aires, Argentina)	2000
Bc95	Delta (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bc96	25 de mayo (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bc97	C. Casares(Buenos Aires, Argentina)	2000
Bc98	T. Lauquen (La Pampa, Argentina)	2000
Bc99	Tapalqué (Buenos Aires, Argentina)	2000
Bc100	Tapalqué (Buenos Aires, Argentina)	2000
Bc101	Brandsen (Buenos Aires, Argentina)	2000
Bc102	Chascomús (Buenos Aires, Argentina)	2000
Bc103	Berisso (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc104	Berisso (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc105	Berisso (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc106	Boston (USA)	2003
Bc107	Boston (USA)	2003
Bc108	Boston (USA)	2003
Bc109	Boston (USA)	2003
Bc110	9 de julio (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bc111	9 de julio (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bc112	Suipacha (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bc113	ITALIA	1999
Bc114	ITALIA	1999
Bc115	Pigue (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bc116	Olavarría (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bc117	Laprida (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bc118	Laprida (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bc119	Laprida (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bc120	Pta.Indio (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bc121	Pdo.Costa (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bc122	San Vicente (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bc123	Pehuajo (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bc124	Lincoln (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bc125	Buzios (Río de Janeiro, Brasil)	2002
Bc126	Buzios (Río de Janeiro, Brasil)	2002
Bc127	Magdalena (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bc128	Laprida (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bc129	Guamini (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bc130	Usa / México	2003
Bc131	Usa / México	2003
Bc132	Usa / México	2003

Tabla 2. Denominación, origen geográfico y año de aislamiento de *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides* y *Bacillus thuringensis* empleados en este trabajo de tesis.

Aislamientos	Origen geográfico	Año de aislamiento
NRRLB-939	USA	
Bm1	Ranchos (Buenos Aires, Argentina)	1992
Bm2	Pte. Luro (Buenos Aires, Argentina)	1996
Bm3	Ranchos (Buenos Aires, Argentina)	1992
Bm4	Tandil(Buenos Aires, Argentina)	2002
Bm5	Chacabuco(Buenos Aires, Argentina)	2001
Bm6	Pte. Luro (Buenos Aires, Argentina)	1996
Bm7	Villarino (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bm8	Pigue (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bm9	Ranchos (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bm10	Quilmes (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bm11	Brandsen (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bm12	E. Rios (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bm13	Punta Alta (Buenos Aires, Argentina)	1996
Bm14	Crel. Pringles (Buenos Aires, Argentina)	1996
Bm15	La Plata (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bm16	Ranchos (Buenos Aires, Argentina)	1992
Bm17	P. Luro (Buenos Aires, Argentina)	1996
Bm18	Magdalena (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bm19	C. Suarez (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bm20	25 de mayo (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bm21	Chivilcoy (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bm22	Francia	1999
Bm23	Buzios (Rio de Janeiro, Brasil)	1996
Bm24	Buzios (Rio de Janeiro, Brasil)	2003
Bm25	Tandil (Buenos Aires, Argentina)	2003
Bm26	Cañuelas (Buenos Aires, Argentina)	1991
Bm27	Laprida (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bm28	Laprida (Buenos Aires, Argentina)	1990
Bm29	San Pedro (Buenos Aires, Argentina)	1990
Bm30	Bragado (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bm31	Magdalena (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bm32	9 de julio (Buenos Aires, Argentina)	1991
Bm33	F. Varela (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bm34	Gral. Alvarado (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bm35	Gral. Alvarado (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bm36	Gral. Pinto (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bm37	Gral. Pinto (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bm38	Gral. Pinto (Buenos Aires, Argentina)	2000
Bm39	F. Varela (Buenos Aires, Argentina)	2000
Bm40	Las Flores (Buenos Aires, Argentina)	2000
Bm41	Gral. Lavalle (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bm42	Chacabuco (Buenos Aires, Argentina)	1999

Continuación Tabla 2.

Aislamientos	Origen geográfico	Año de aislamiento
Bm43	Pte. Perón (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bm44	Salto (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bm45	Entre Ríos (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bm46	Luján (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bm47	C. Casares (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bm48	T. Lauquen (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bm49	México	2000
Bm50	25 de Mayo (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bm51	C. Casares (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bm52	S. Miguel Monte (Buenos Aires, Argentina)	2000
CCT	USA	
Bth1	Gorina (Buenos Aires, Argentina)	2000
Bth2	Santa Fe (Santa Fe, Argentina)	2001
Bth3	9 de julio (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bth4	Las Flores (Buenos Aires, Argentina)	1999
ATCC10206	USA	
Bmy 1	La Plata (Buenos Aires, Argentina)	1999
Bmy 2	Tres Arroyos (Buenos Aires, Argentina)	2002
Bmy 3	9 de julio (Buenos Aires, Argentina)	2000
Bmy 4	Tres Arroyos (Buenos Aires, Argentina)	2000
Bmy 5	Cañuelas (Buenos Aires, Argentina)	2001
Bmy 6	S. M. del Monte (Buenos Aires, Argentina)	2000
Bmy 7	Paraná (Entre Ríos, Argentina)	2000