



## CARACTERIZACION MORFOLÓGICA Y GENÉTICA DE LA CEPA Bt1-88

Antonio Ventura<sup>1</sup>, Ramón Cruz<sup>1</sup>, Edgar O. López<sup>1</sup>, Jorge E. Ibarra<sup>2</sup>, David Ammons<sup>3</sup>, Joanne Rampersad<sup>3</sup> y Luz Irene Rojas<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología, Instituto Politécnico Nacional, Carpio y Plan de Ayala S/N, Casco de Santo Tomas, México 11340 D. F. <sup>2</sup>CINVESTAV-Irapuato, km 9.5 del libramiento Norte, carretera Irapuato-León. Irapuato, Guanajuato. México. , <sup>3</sup>University of West Indies, EWMSC, Mt Hope. Trinidad, West Indies. Tel. Fax: 55 41 23 43. [luzirenemx@hotmail.com](mailto:luzirenemx@hotmail.com)

*Palabras clave: B. thuringiensis, enzimas, apéndices.*

**Introducción.** *B. thuringiensis* es una bacteria Gram-positiva que forma esporas y cristales proteicos en su fase estacionaria de crecimiento. Los cristales están constituidos por proteínas Cry (Aronson *et. al.* 1986), que pueden tener actividad insecticida, y sus formas varían dependiendo de su composición: bipiramidal (Cry1A), cuboidal (Cry2A), rectangular (Cry3A), esférica (Cry4A y Cry4B) y romboidal (Cry11A) (Schnepf *et. al.* 1998). La toxicidad es específica sobre varios órdenes de insectos: Himenoptera, Diptera y Coleoptera. Empero, no todas las cepas de Bt presentan cristales como los referidos, un caso es Bt1-88, la cual fue aislada por los Dres. Ammons y Rampersad en la Isla de Trinidad, en Sudamérica (Rampersad *et al.* 2003). Observaciones al microscopio de contraste de fases muestran que esta cepa posee una espora con filamentos unidos a un microcristal. Su identificación con el sistema API-50C muestra que Bt1-88 pertenece al grupo *B. cereus* /*B. thuringiensis*. La presencia de apéndices filamentosos unidos a un posible microcristal a su vez unido a la espora, es una característica poco común entre las cepas de *B. thuringiensis*.

**Metodología.** Como parte de la caracterización de la cepa referida, se estudio su perfil exoenzimático, perfil de plásmidos, identificación de genes *cry*, así como la identificación molecular de la cepa. Por otra parte, se hicieron estudios morfológicos mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), de muestras de cultivos crecidos en el medio G durante diferentes tiempos. Las células colectadas fueron fijadas con glutaraldehído al 3% y postfijadas con tetraóxido de osmio al 1%. Después fueron deshidratadas e incluidas en resina Epon 812. Los cortes finos fueron contrastados con acetato de uranilo al 4% y con citrato de plomo de Reynolds. Para microscopía electrónica de barrido (MEB) se siguió el mismo procedimiento de fijación, post-fijación y deshidratación, sólo que en este caso las muestras se montaron en un tambor de aluminio y después fueron cubiertas con oro. La tinción negativa se realizó sobre rejillas de cobre cubiertas con formvar, las esporas adsorbidas se contrastaron con acetato de uranilo al 4%.

**Resultados.** De las 12 actividades enzimáticas ensayadas, Bt1-88 produjo 9: amilasas, lipasas, proteasas, esterases, elastasas, quitinasas, quitosanasas, colagenasas, queratinasas y fosfolipasas. El perfil de plásmidos reveló que Bt1-88 presenta dos plásmidos pequeños (4 y 9 kb) y dos

megaplasmidos (>15 kb). La identificación molecular de la cepa (secuenciamiento del gen 16S rDNA), mostró que la cepa pertenece al grupo *B. cereus*/*B. thuringiensis*. Se identificaron dos genes *cry*, el gen *cryIA* y el gen *cryII*. Los estudios de MET, mostraron que la cepa Bt1-88 presenta de cuatro a cinco apéndices formados por delgadas fibrillas. Dichos apéndices surgen de un diminuto cristal, que a su vez se encuentra unido al exosporium. Estos apéndices están constituidos por haces de 15- 20 “fibrillas” con un espesor de 1 nm y 20 µm de largo. La MEB muestra los 4 apéndices completos, sin que se aprecien las fibrillas, y pone de manifiesto que el cristal parece estar cubierto por el exosporium.

**Conclusiones.** La capacidad de Bt1-88 de secretar gran variedad de enzimas extracelulares, sugiere un interesante potencial biotecnológico para este microorganismo. La MET mostró que Bt1-88 presenta 5 filamentos, compuestos por fibrillas y dichos filamentos se encuentran unidos a un microcristal, que a su vez se encuentra unido al exosporium. La identificación molecular mostró que Bt1-88 pertenece al grupo *B. cereus*/*B. thuringiensis* y tomando como base el haber encontrado genes *cry*, lo cual es una característica que distingue a *B. thuringiensis* de *B. cereus*, podemos deducir que se trata de *B. thuringiensis*. Por otro lado, el perfil de plásmidos reveló que Bt1-88 tiene un patrón diferente al reportado para las cepas de referencia de *B. thuringiensis*, lo cual nos sugiere que puede tratarse de una nueva cepa.

**Agradecimientos.** A la Secretaria de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional, COFFA, EDI y CONACYT por el apoyo brindado para el desarrollo de esta investigación.

### Bibliografía

1. Aronson, A. I., Wu D., & Zhang, C. 1995. Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. *J. Bacteriol.* **177**: 4059–4065
2. Rampersad, J. Khan A. & Ammons, D. 2003. A *Bacillus thuringiensis* isolate possessing a spore-associated filament. *Curr. Microbiol.* **47**: 355-357.
3. Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, & D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:775–806.