



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD HEMOLÍTICA
DEL SOBRENADANTE DE LAS CEPAS DE
Bacillus cereus SOBRE ERITROCITOS DE *Iguana iguana*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA.

PRESENTA:

ADRIANA BEATRIZ ÁLVAREZ PÉREZ

ASESOR: DR. GUILLERMO VALDIVIA ANDA
COASESOR: M. EN C. CÉSAR CUENCA VERDE

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO CON EL APOYO DE LOS PROYECTOS:

Programas de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)

IT224311-3

**Programas de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)
IN216005.**

Cátedra de Investigación FESC: IN. 2.14. Y CONS 210

**Programa de Apoyo a Proyectos para el Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME)
PE 200707**

Programa Nacional de Becas (PRONABES) 2006-1 a 2008-1

El trabajo fue realizado con el equipo e instalación de:

**Laboratorio de Patogenicidad Microbiana de la Unidad de Investigación
Multidisciplinaria en Salud Animal de la FESC, Campo 4**

Laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario (DIVET®).

AGRADECIMIENTOS

Dios por haberme permitido iniciar y terminar este proyecto, por llevarme por el mejor camino.

Madre Rosa Camerina Pérez Baena una persona muy importante en mi vida que siempre estuvo a mi lado, me apoyo, me brindó su amor, paciencia, tiempo, consejos y amistad.

Padre Fernando Camacho De Lucío una persona muy importante en mi vida que pese a los obstáculos siempre estuvo conmigo y me brindó su cariño.

Hermano Daniel Camacho Pérez me brindó su cariño, paciencia y apoyo incondicional.

Dr. Guillermo Valdivia Anda por brindarme su infinita paciencia, tiempo y conocimientos para poder realizar este proyecto.

M. C. César Cuenca Verde me brindó tiempo, conocimientos paciencia y más que Coasesor se volvió mi amigo.

Jhonny por haberme brindado un pedacito de él.

Mis amigos y compañeros del laboratorio 3 en especial a Lizet Cazares, Enrique Mongue Zuñiga, Teresa Vences por haberme brindado su amistad incondicional.

MVZ Héctor Jorge Flores Rodríguez por despertar mi interés en las Iguanas.

Jurado por haberme brindado tiempo.

Juan José Gómez Quiñones que me brindó tiempo, cariño y paciencia.

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1 Hematología de reptiles	3
2.2 <i>Bacillus cereus</i>	4
3 Antecedentes	5
4. Objetivos	8
4.1 Objetivo general	8
4.2 Objetivos específicos	8
5. Hipótesis	8
6. Justificación	9
7. Material y métodos	10
8. Resultados	14
9. Discusión	25
10. Conclusiones	28
11. Literatura citada	29

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Algunas características de crecimiento sobre CST de <i>Bacillus cereus</i> de las cepas RCC7, RCC8 y RCC9	18
Cuadro 2. Hemólisis sobre sangre de <i>Iguana iguana</i> y <i>Gallus gallus</i> a las 2 horas de incubación	19
Cuadro 3. Actividad específica del sobrenadante de <i>Bacillus cereus</i> crecido en medio de Todd Hewitt sobre diferentes sustratos	21
Cuadro 4. Efectos de los sobrenadantes sobre glóbulos rojos de <i>Iguana iguana</i>	22
Cuadro 5. Efectos de los sobrenadantes sobre glóbulos blancos de <i>Iguana iguana</i>	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Eritrocitos de <i>Iguana iguana</i> teñidos con coloración Wright	3
Figura 2. Leucocitos de <i>Iguana iguana</i> teñidos con coloración de Wright	3
Figura 3. Leucocitos de <i>Iguana iguana</i> teñidos con coloración de Wright	4
Figura 4. Curva de crecimiento de las cepas RCC7, RCC8, RCC9 de <i>Bacillus cereus</i> en CST	16
Figura 5. Curva de crecimiento de la cepa RCC7, RCC8, RCC9 de <i>Bacillus cereus</i> sobre CST	17
Figura 6. Cinética de crecimiento de las cepas RCC7 de <i>Bacillus cereus</i> en diferentes medios líquidos	18
Figura 7. Fotografía de la microplaca de los sobrenadantes de la cepa RCC7 de <i>Bacillus cereus</i> crecida en Caldo Todd Hewitt en sangre completa de <i>Iguana iguana</i>	20
Figura 8. Curva de crecimiento y producción de hemolisina de <i>Bacillus cereus</i> de la cepa RCC7 sobre sangre de <i>Gallus gallus</i> al 2 %	21
Figura 9. Curva de crecimiento y producción de hemolisina de <i>Bacillus cereus</i> de la cepa RCC7 sobre sangre de <i>Iguana iguana</i> al 2 %	22
Figura 10. Morfología de las células observadas en los frotis sanguíneos de la dilución 1:4 sobre sangre de <i>Iguana iguana</i> al 2% a las 2 horas de incubación	23
Figura 11. Morfología de las células observadas en los frotis sanguíneos de la dilución 1:2 sobre sangre de <i>Iguana iguana</i> al 2% a las 2 horas de incubación	24

1. RESUMEN

Actualmente el conteo de células sanguíneas en reptiles se realiza de forma manual, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto hemolítico del sobrenadante de *Bacillus cereus* sobre las células sanguíneas de *Iguana iguana*, para poder llevar a cabo un conteo automatizado de las células sanguíneas de *Iguana iguana*, se obtuvieron cepas de *Bacillus cereus* RCC7, RCC8, RCC9 del cepario de la UIMSA, estas fueron sembradas en agar sangre de *Iguana iguana*, sobre Caldo Soya Trypticaseína (CST) se les determinó el número de divisiones, tasa de crecimiento y tiempo de generación, posteriormente se seleccionó la cepa con mejor crecimiento, ésta cepa fue colocada en diferentes medios líquidos: CST, Caldo Nutritivo (CN), Caldo Brucella (CB), Caldo Todd Hewitt (CTH); los sobrenadantes se centrifugaron, se determinó la hemólisis en sangre de *Gallus gallus* para determinar el mejor sobrenadante. Se midió la cantidad de proteína y en una microplaca se determinó la hemólisis sobre sangre de *Iguana iguana*. A los mismos tiempos se tomó el sedimento se realizaron frotis que se tiñeron con Wright, se observaron al microscopio y se evaluó la proporción de glóbulos rojos, glóbulos blancos, el efecto sobre las células y la proporción de cada leucocito. Finalmente se realizó estadística descriptiva. Se concluyó que las 3 cepas de *Bacillus cereus* son variedades diferentes. La cepa RCC7 produjo 0.6 UH por 100 µg en CTH para los glóbulos rojos de *Gallus gallus* y 0.08 UH por 100 µg en CTH para los glóbulos rojos de *Iguana iguana*. El sobrenadante hemolítico de la cepa RCC7 tuvo efecto citolítico sobre leucocitos de *Iguana iguana*. Los resultados indican que los eritrocitos de las dos especies trabajados fueron lisados por hemolisinas diferentes, producidas en fases de crecimiento diferentes. El sobrenadante de la cepa RCC7 de *Bacillus cereus* produjo alteraciones en la membrana citoplasmática de eritrocitos.

2. INTRODUCCIÓN

La biometría hemática es el estudio de las células sanguíneas de los animales vivos. En este estudio se considera a la cuenta de eritrocitos, leucocitos y plaquetas; no obstante, en el caso de los leucocitos se debe realizar la cuenta diferencial de los mismos (Branson *et al.*, 1994).

En la actualidad las determinaciones pueden ser realizadas por métodos manuales o mediante aparatos electrónicos. En ambos métodos se requiere que los eritrocitos sean lisados para permitir el conteo de los leucocitos por lo que en el caso de los mamíferos que tienen eritrocitos sin núcleo este proceso es relativamente sencillo, sin embargo en el resto de las especies animales la lisis de eritrocitos no se puede llevar a cabo, por lo que se requieren acciones indirectas para poder calcular el número de leucocitos (Campbell y Ellis, 2007).

Así por ejemplo, en los reptiles los métodos de conteo manual son los mismos que se utilizan en la hematología de las aves (Campbell y Ellis, 2007); el directo Natt y Herrick's y el método indirecto que es mediante la tinción con floxina B (Branson *et al.*, 1994) El primer caso se usa preferentemente en especies de reptiles que normalmente tienen mayores números de linfocitos que de heterófilos circulantes, mientras que la floxina B se usa cuando de manera normal es mayor el número de heterófilos y eosinófilos (Campbell y Ellis, 2007).

La principal desventaja del método directo es la difícil diferenciación entre linfocitos, trombocitos y eritrocitos inmaduros, mientras que en el método indirecto es que el método eosinófilo Unopette puede no ser apropiado para todas las especies de reptiles, especialmente en aquellas que normalmente tienen poca circulación de heterófilos y eosinófilos (Campbell y Ellis, 2007).

Adicionalmente, los gránulos de heterofilos tienden a unirse con más rapidez lo que dificulta su evaluación (Campbell y Ellis, 2007).

De esta forma tinciones como Wright's y May-Grunwald-Giemsa son más útiles y proveen mejor diferenciación de leucocitos, trombocitos y eritrocitos inmaduros (Campbell y Ellis, 2007).

Estos métodos manuales para la diferenciación de leucocitos, tienen un alto grado de variabilidad (Campbell y Ellis, 2007).

2.1 Hematología de reptiles

Los eritrocitos en los vertebrados no mamíferos son más grandes (particularmente de los anfibios), además de que son biconvexos y nucleados. En su citoplasma hay algunos otros organelos como mitocondrias y un esqueleto de microtúbulos, dispuestos en espiral, que mantiene la forma celular (banda marginal) (Paniagua *et al.*, 2000).

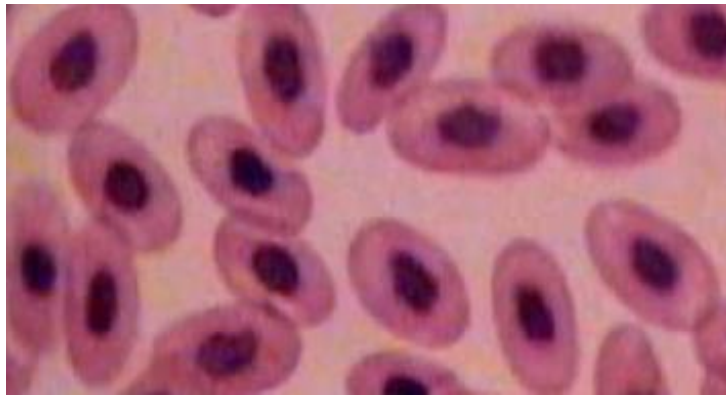


Figura 1. Eritrocitos de *Iguana iguana* teñidos con coloración Wright. (Novoa *et al* 2008)

En general los leucocitos de los reptiles pueden ser divididos en dos grupos: los granulocitos y los leucocitos mononucleares. Los granulocitos de los reptiles pueden ser clasificados en dos grupos acidófilos y basófilos, donde los primeros se pueden dividir en heterófilos y eosinófilos. (Campbell y Ellis, 2007)

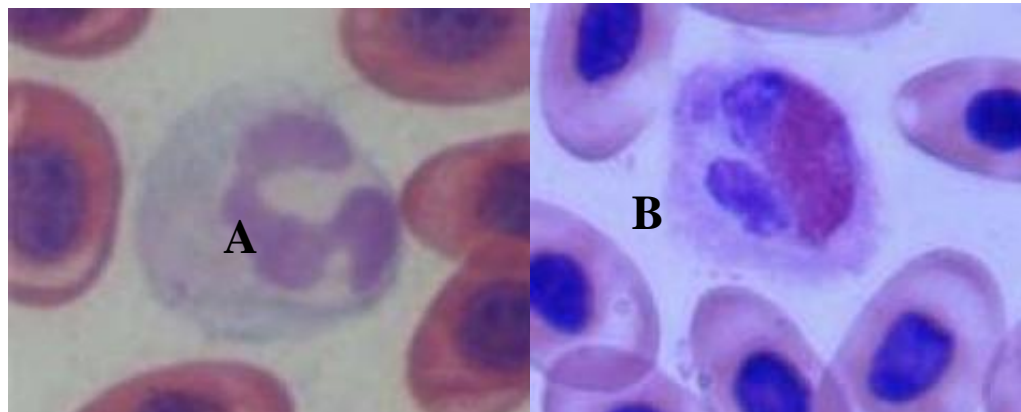


Figura 2. Leucocitos de *Iguana iguana* teñidos con coloración de Wright. A) Heterófilo, B) Eosinófilo. (Novoa *et al* 2008)

Los basófilos en linfocitos y monocitos, estos son parecidos en estructura a los de mamíferos y aves. Sin embargo, existe un sexto tipo de célula denominado azurófilo que es frecuentemente descrito en la literatura y es considerado como un monocito con gránulos azurófilos (Campbell y Ellis, 2007).

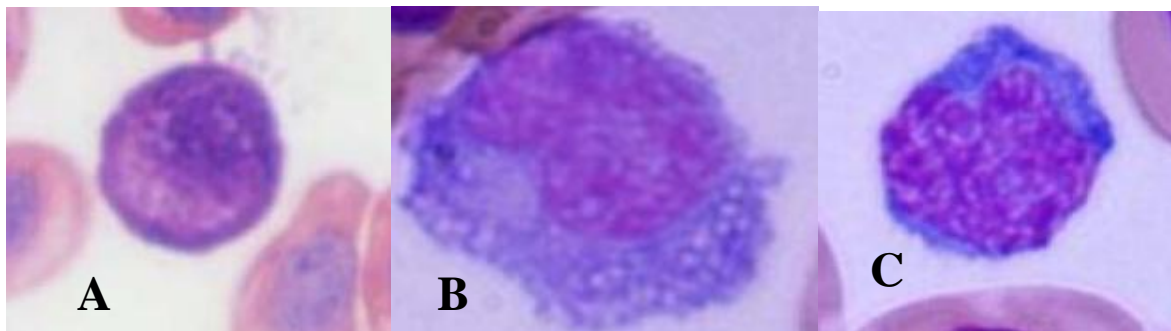


Figura 3. Leucocitos de *Iguana iguana* teñidos con coloración de Wright. A) Basófilo, B) Monocito, C) Linfocito. (Novoa *et al* 2008)

2.2 *Bacillus cereus*

Es una bacteria grampositiva que tiene la capacidad de esporular, también se considera un anaerobio facultativo, β hemolítico en agar sangre de carnero y cuya destrucción tisular esta mediada por enzimas citotóxicas como la Cereolisina y la fosfolipasa C (Murray *et al.*, 2006)

Al respecto, las hemolisinas son proteínas que pueden alterar las membranas de las células del hospedero debido a un efecto enzimático o detergente causando la muerte celular mediante lisis. Esta actividad hemolítica se demuestra en el laboratorio por la hemólisis que tiene lugar alrededor de las colonias de bacterias cuando crecen en agar sangre. No obstante para los microorganismos es importante la capacidad de producir leucotoxinas para alterar la membrana citoplasmática de los fagocitos, comprometiendo así la acción de estas células (Struthers y Westran, 2003).

Ésta bacteria es de fácil crecimiento, su temperatura óptima de crecimiento, su temperatura óptima es de 10 – 48 ° C y su tiempo de generación en laboratorio a una temperatura de 30 °C es de 18 a 27 minutos (Gilbert y Kramer, 1986).

3. Antecedentes

En trabajos realizados anteriormente se han evaluado diferentes métodos de lisis selectiva en células sanguíneas de ave, para permitir la destrucción de eritrocitos sin afectar a los leucocitos ni trombocitos, en estos trabajos se uso ácido acético y cloruro de sodio, se aislaron y caracterizaron cepas bacterianas productoras de hemolisinas a partir de heces y cavidad oral de aves y se determinó la actividad específica de dichas toxinas. De las 9 cepas hemolíticas encontradas se obtuvieron 4 diferentes géneros *Bacillus cereus*, *Actinobacillus sp*, *Acitenobacter sp*, *Micrococcus spp*, *Bacillus cereus* causó el efecto de hemólisis deseado, sin afectar a los leucocitos, logrando obtener un método distinto, para la cuantificación de leucocitos de aves, a partir de sus hemolisinas obtenidas (Cofas, 2011).

Bacillus cereus produce varios factores de virulencia, entre los cuales se incluyen: La enterotoxina Nhe es sintetizada y liberada durante la fase de crecimiento logarítmico a una temperatura de 32° a 37°. (Spira y Goepfert, 1972), está compuesta de tres genes NheA, NheB y NheC, un incremento de la NheC reduce la actividad toxica (Lindback *et al.*, 2004), la actividad citotóxica de Nhe en células epiteliales a sido demostrada debido a una lisis osmótica coloidal seguida la formación de poros en la membrana plasmática (Fagerlund *et al.*, 2008).

La hemolisina BL es un sistema lítico de membrana, compuesto de 3 proteínas antigénicamente distintas llamadas B, L₁, L₂ (35, 36, y 45 KDa, respectivamente) (Beecher y MacMillan 1991), estas tres proteínas son secretadas independientemente y las tres son necesarias para la máxima actividad biológica, se ligan a los eritrocitos independientemente y la asociación en la membrana de los componentes BL forman un complejo de ataque, que causa lisis por un mecanismo de coloide osmótico (Beecher y Wong; 1997), en donde el componente B se liga a la célula blanco permitiendo al componente L ligarse y aumentar la permeabilidad resultando en hemólisis (Beecher y Mac Millan; 1991).

La Cereolisina O (Hemolisina I) es una toxina formadora de poros largos, tiene la propiedad de adherirse selectivamente al colesterol en la membrana de las células eucariotas, consiste en formar una interacción como monómero, con las células blanco por su receptor de colesterol, siguiendo una subsecuente oligomerización y la inserción en la membrana celular. Este proceso resulta en serios daños a la membrana, con la formación de poros largos excediendo 150 Å que hace a la membrana celular permeable a pequeños solutos y largas

macromoléculas, así conduce a la célula a una muerte rápida (Cossart *et al.*, 2005), ésta emplea un amplia acción citolítica *in vitro* en células de mamífero, *in vivo* es hemolítica y con frecuencia tiene efectos sublíticos importantes en leucocitos y en la función de los macrófagos (Drobniewski, 1993).

Hemolisina II (Toxina β -barril) es formadora de poros de la familia α -hemolisina de estafilococo, por lo general su actividad no es afectada por el colesterol (Coolbaugh y Williams, 1978), interactúa con macromoléculas de liposomas para formar heptámeros ordenados uniéndose con un poro con un diámetro interior de 1.5 a 2 nm y un diámetro exterior de 6 a 8 nm. Esta hemolisina es dependiente de la temperatura y las estructuras que forman poros varían entre la temperatura de 4°C y 37°C. Los canales formados por Hemolisina II son selectivos de aniones en bicapas de lípidos y muestran una creciente conductancia conforme la concentración de sal se incrementa. La primera interacción de la hemolisina II con la membrana no depende de la temperatura, en el primer tiempo si hay una alta concentración de sal los poros de la hemolisina II inducen un bajo voltaje y se observa un bajo potencial negativo (Andreeva *et al.*, 2007).

Hemolisina III dependiente de la temperatura, se une y forma poros aunque también lisa eritrocitos (Baida y Kuzmin, 1996).

Citotóxina K es una proteína citotóxica de 34 kDa necrótica y hemolítica similar a la α -hemolisina de *Staphylococcus aureus* (Lund *et al.*, 2000). Esta citotoxina puede estar en 2 formas la CytK 1 y CytK 2 (Fagerlund *et al.* 2004); Esfingomielinasa induce hemólisis en eritrocitos de oveja los cuales contienen grandes cantidades de esfingomielina (Odaa *et al.*, 2010).

Cereolisina AB es un complejo citolítico de fosfatidilcolina hidrolasa y esfingomielinasa que actúan juntos en la hemólisis (Gilmore *et al.*, 1989), fosfatidilcolina y esfingomielinasa, rompen las porciones lipídicas que sirven para fijar las proteínas de la superficie celular, comprometiendo la integridad de la membrana celular y alteran las capacidades regenerativas de las células lesionadas (Allen *et al.*, 2008); la acción cooperativa de la fosfatidilcolina y la esfingomielinasa son necesarias para la lisis de eritrocitos de cerdos y humanos (22-31% fosfatidilcolina y 28-25% esfingomielinasa). La Fosfatidilcolina aumenta el efecto hemolítico de BL solo en células que contienen una cantidad significativa de fosfatidilcolina (cerdos 22%; humanos 31%) (Douglas y Wong, 2000), la fosfatidilcolina

inhibe el efecto hemolítico de BL en eritrocitos de oveja (<2% fosfatidilcolina) y aumenta el modelo de hemólisis discontinuo que es característico de BL en agar sangre de carnero (Douglas *et al.*, 2000); la Fosfolipasa es similar a la α -toxina de *Clostridium perfringes*. (El-sayed y Roberts, 1983); Enterotoxina T tiene una actividad biológica similar a BL y a la NHE (Choma y Granum, 2002); Toxina emética su producción ocurre en la fase estacionaria. (Shaheen *et al.*, 2006). Esta toxina actúa como un ionoporo catión, se va a la valinomicina, y después inhibe la actividad mitocondrial por inhibición de la oxidación acida de la grasa (Dierick *et al.*, 2005).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Evaluar el efecto hemolítico del sobrenadante de *Bacillus cereus* sobre las células sanguíneas de *Iguana iguana*.

4.2 Objetivos específicos:

❖ Determinar el efecto hemolítico de las cepas de *Bacillus cereus* previamente aisladas, sobre agar sangre de iguana (2.5%) seleccionando las cepas con mayor efecto.

❖ Evaluar sobre medios líquidos la cinética de crecimiento y de producción de hemolisina de las cepas más efectivas.

❖ Comparar y determinar el mejor sustrato para la producción de hemolisinas con la cepa de mayor efecto hemolítico.

❖ Evaluar las alteraciones morfológicas provocada por el sobrenadante de *Bacillus cereus*, sobre los eritrocitos, leucocitos y trombocitos de la sangre de *Iguana iguana*,

5. HIPÓTESIS

Si el sobrenadante de cultivo de *Bacillus cereus* es rico en hemolisinas, entonces este producirá hemólisis en eritrocitos de *Iguana iguana* sin afectar leucocitos ni trombocitos.

6. JUSTIFICACIÓN

Las iguanas son un recurso útil para los seres humanos. En México han sido utilizadas como alimento por las comunidades rurales desde tiempos anteriores a la llegada de los españoles. Con la modernidad, las iguanas también se utilizan como mascotas, existiendo un mercado internacional para las crías. Debido a esto, es importante el estudio científico de estos reptiles, cuyos resultados permitirán el uso racional y sustentable de las iguanas en México (Reynoso 2008).

El poder realizar un conteo de eritrocitos y de leucocitos proporcionan marcadores que favorecen diagnósticos específicos para determinar el estado de salud, aspectos del metabolismo y la fisiología de *Iguana iguana*.

Los métodos de conteo de las células sanguíneas en los mamíferos implican la lisis selectiva de los eritrocitos; en las aves, reptiles, peces y anfibios no es posible lizarlos debido a su característica nucleada.

Las técnicas para el conteo de las células de la sangre en reptiles se realizan de forma manual, de tal manera que en la actualidad no hay forma de realizar el conteo de todas las células mediante aparatos automatizados.

Solo se ha realizado un trabajo para lizar selectivamente a los eritrocitos de reptiles, utilizando agentes químicos, donde la conclusión indica que no fue de utilidad práctica, por lo que en el presente estudio se utilizará la bacteria *Bacillus cereus* que lisa eritrocitos de *Gallus gallus* sin afectar a leucocitos y al ser nucleado el eritrocito de *Iguana iguana* como el de *Gallus gallus* nos lleva a pensar que el efecto será el mismo para eritrocitos de *Iguana iguana*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 3 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal (UIMSA) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Carretera Teoloyucan Km. 2.5 Colonia San Sebastian Xhala, Cuautitlán Izcalli. Ésta zona se orienta geográficamente a 19° 40' 50'' latitud norte y a los 99° 12' 25'' longitud oeste, su altura sobre el nivel del mar es de 2252 m. La temperatura promedio anual en esta área es de 16° C y cuenta con 600 mm de precipitación pluvial.

Material biológico.

Cepas de *Bacillus cereus* RCC7, RCC8 y RCC9.

Agar Soya Trypticaseína (AST) BBL®.

Caldo Soya Trypticaseína (CST) BBL®

Caldo Nutritivo (CN) BBL®.

Caldo Brucella (CB) BBL®.

Caldo Todd Hewitt (CTH) BBL®.

Caldo Soya Trypticaseína (CST) BBL®.

PBS

Sangre de *Gallus gallus*

Sangre de *Iguana iguana*

Agar sangre de *Iguana iguana* (AST y sangre de *Iguana iguana* al 2.5%)

Agar blando (CST y Agar Bacteriológico marca BBL®)

Medio especial (5% bactopectona y 1.5 % de agar bacteriológico)

Material no biológico.

Autoclave Kitlab®

Estufa bacteriológica BG®

Fotocolorímetro Klett Summerson®

Congelador General Electric®

Tubos Eppendorf de 5ml

Centrifuga Eppendorf centrifuge 5403®

Matraz nefelométrico

Microplaca de fondo en U.

Cajas de Petri.

METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN.

Las cepas de *Bacillus cereus* RCC7, RCC8, RCC9, fueron obtenidas del cepario de la UIMSA aisladas de heces y cavidad oral de aves, estas cepas se encontraban en viales de medio especial de mantenimiento, fueron resembradas en medio sólido AST preparado de acuerdo a las especificaciones del fabricante, (por asada); a estas cepas se les determinó la pureza y las características bioquímicas por medio de pruebas primarias y secundarias (Cofas, 2011).

Estas cepas fueron sembradas en agar sangre de reptil, el cual fue preparado con AST, posteriormente se agregó sangre a razón del 2.5%. Una vez solidificado éste, se sembraron las cepas RCC7, RCC8 y RCC9 de *Bacillus cereus* en línea sobre el agar y se incubó a 37° C durante 18 horas y posteriormente se evaluó la hemólisis de acuerdo a Brown (García y Zamudio., 1998).

El CST se preparó, de acuerdo a las especificaciones del fabricante, una asada de la cepa RCC7 de *Bacillus cereus* fue colocada en un tubo de ensaye que contenía 3 ml del CST, se incubo en una estufa bacteriológica por 24 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo, los 3 ml fueron colocados en 47 ml de CST en un matríz nefelométrico, éste se incubó a 37 °C, cada hora se tomó lectura de la turbidez utilizando un fotocolorímetro, utilizando un filtro número 54 color verde, con un espectro aproximado de 500-570 nm esta lectura se tomó hasta que los valores se repetían, a los mismos tiempos se tomaron 3 ml de este cultivo, estos fueron colocados en tubos de ensaye y puestos en un congelador a -22 °C.

El procedimiento anterior se repitió con las cepas RCC8 y RCC9.

Se descongelaron los 3 ml de las cepas de *Bacillus cereus* y se realizaron diluciones (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7}), posteriormente 0.1 ml de cada dilución fue colocado en 3 ml de agar blando que fue preparado con CST y agar bacteriológico al 0.75%, el volumen final fue agitado en Vortex y vaciado en una caja de Petri que contenía agar blando, esta fue incubada a 37 °C por 24 horas, transcurrido el tiempo se realizó el conteo de colonias. Con los resultados obtenidos se realizaron gráficos y se calculó la tasa de crecimiento d/U_t , número de divisiones $\log R_2 - \log R_1 / \log 2$ y tiempo de generación 1 ut/d.

Una vez seleccionada la cepa con mayor número de divisiones, mayor tasa de crecimiento y menor tiempo de generación. Se realizó una cinética de crecimiento con diferentes medios de cultivo, una asada de la cepa seleccionada de *Bacillus cereus* fue

colocada en un tubo de ensaye que contenía 3 ml del medio, se incubó por 24 h a 37 °C, los 3 ml fueron colocados en 47 ml del mismo medio en un matríz nefelométrico, éste se incubó a 37 °C y cada hora se tomaron lecturas de la turbidez utilizando un fotocolorímetro Klett esta lectura se tomó hasta que ya no hubo variación entre 2 valores, a los mismos tiempos se tomaron 3 ml, fueron centrifugados a 3,000 rpm durante 10 minutos y se separó el sobrenadante del sedimento de acuerdo a Cofas (2011); éste sobrenadante fue colocado en tubos cónicos de polietileno de 2 ml y puestos en un congelador a -22 °C.

El procedimiento anterior se realizó con el CST, CN, CB, CTH.

Debido a que es más fácil obtener sangre de ave se decidió primero trabajar con ella para estandarizar las técnicas y después compararla con la sangre de *Iguana iguana* para posteriormente llevar a cabo el presente experimento.

En el laboratorio DIVET[®] se realizó la toma de muestras sanguíneas de *Gallus gallus* que eran remitidas para algún diagnóstico, se obtuvieron 0.5 ml de sangre completa de la vena radial utilizando heparina como anticoagulante a razón de 25 UI/ml de sangre en una jeringa insulínica.

En una microplaca de 96 pozos con fondo en U se colocaron 100 µl de PBS en cada pozo y posteriormente 100 µl del sobrenadante de cultivo de *Bacillus cereus* previamente centrifugado (CST, CTH, CB, CN) en el primer pozo y se realizaron diluciones dobles seriadas, agregándose 100 µl a cada pozo de una solución de sangre al 2% de acuerdo con Fagerlund *et al.*, (2008). Ésta placa se incubó por 2 horas a 37 °C y se realizó una lectura visual de la placa cada hora, tomando en cuenta únicamente las diluciones donde había hemólisis total.

Una vez determinado el mejor sustrato, a los sobrenadantes se les determinó la cantidad de proteínas totales por el método de Bradford (Bradford *et al.*, 1976).

En el laboratorio DIVET[®] se realizó la toma de muestras sanguíneas de reptiles (*Iguana iguana*) que eran remitidos para algún diagnóstico y se obtuvieron 0.4 ml de sangre completa de la vena yugular, utilizando heparina como anticoagulante a razón de 25 UI/ml de sangre en una jeringa insulínica.

En una microplaca de 96 pozos con fondo en U se colocaron 100 µl de PBS en cada pozo y posteriormente 100 µl del sobrenadante de cultivo de *Bacillus cereus* centrifugado previamente al primer pozo y se realizaron diluciones dobles seriadas, agregándose 100 µl a

cada pozo de una solución de sangre al 2% de acuerdo con Fagerlund *et al.*, (2008). Ésta placa se incubó por 2 horas a 37 ° C y se realizó una lectura visual de la placa cada hora, tomando en cuenta únicamente las diluciones donde había hemólisis total, paralelamente se tomaron 20 µl del sedimento con los cuales se realizaron frotis que se tiñeron con la técnica de Wright de acuerdo con Corrons (2006). Se observaron al microscopio y se evaluó la proporción de glóbulos rojos, glóbulos blancos, el efecto sobre las células y la cantidad de cada leucocito.

De cada experimento se realizaron 3 repeticiones y posteriormente se calculó un promedio y se realizó estadística descriptiva.

8. RESULTADOS

La evaluación de la β hemólisis sobre agar sangre se observó una zona clara incolora alrededor de la línea de crecimiento de las cepas RCC7, RCC8, RCC9 que de acuerdo a la clasificación de Brown (García y Zamudio 1998) correspondía a una β hemólisis sobre agar sangre de *Iguana iguana*.

En la cinética de crecimiento se observó que la cepa RCC7 de *Bacillus cereus* alcanzó la fase estacionaria a las 5 horas de incubación, la cepa RCC8 de *Bacillus cereus* alcanzó la fase estacionaria a las 8 horas de incubación, mientras que la cepa RCC9 de *Bacillus cereus* alcanzó la fase estacionaria a las 9 horas de incubación (Figura 4).

En las curvas de crecimiento de las cepas RCC7, RCC8, RCC9 de *Bacillus cereus* se observa que hay una mayor cantidad de colonias viables de la cepa RCC9, mientras que en las cepas RCC7 y RCC8 la cantidad de colonias viables fue muy similar entre ellas (Figura 2)

Los resultados del crecimiento de las cepas se graficaron como cinética de crecimiento, así mismo se realizaron los cálculos de crecimiento para cada cepa, Figura 5.

En el medio CTH y CB la cepa RCC7 presentó 2 fases estacionarias, la primera fase estacionaria se observó a la hora 1 de incubación, mientras que la segunda fase estacionaria se presentó a las 5 horas de incubación, en CN y CST la cepa RCC7 de *Bacillus cereus* solo presentó una fase estacionaria. (Figura 6)

La cantidad de hemólisis, medida como unidades hemolíticas sobre sangre de *Gallus gallus* y sangre de *Iguana iguana* se muestran en el Cuadro 2.

La actividad lítica de los sobrenadantes de la cepa RCC7 de *Bacillus cereus* crecida en CTH se observan en la Fig. 4.

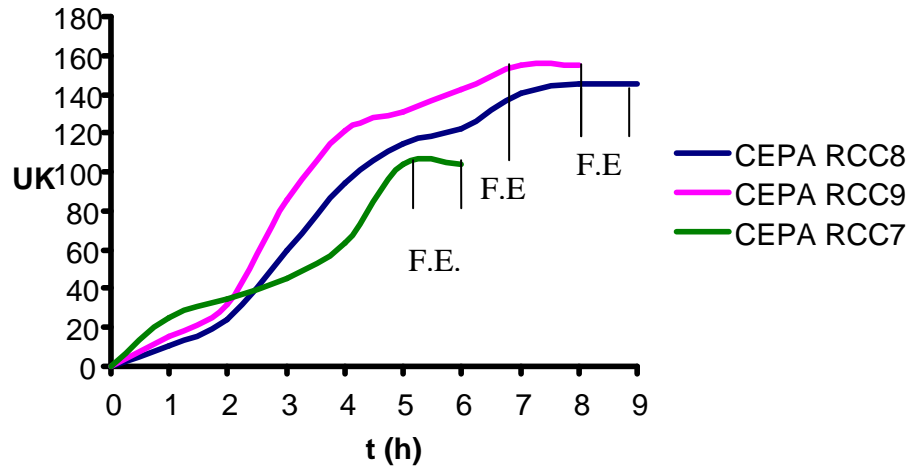
Para la actividad específica del sobrenadante sobre sangre de *Gallus gallus* se observa que fue mayor a las 6 horas de incubación, mientras que en sangre de *Iguana iguana* la mayor actividad específica fue a las 5 horas (Cuadro 3, Fig. 5, Fig. 5)

La identificación de las células sanguíneas de *Iguana iguana* se realizó comparando las fotografías mostradas por Campbell (2007), en los glóbulos rojos se observó que la mayor parte de alteraciones fueron en la membrana citoplasmática, núcleos agrandados, sin embargo casi no se observaron núcleos sueltos, disminución del color de la cromatina, mientras que los leucocitos hubo disminución en la cantidad de células, alguno leucocitos eran difíciles de distinguir ya que estaban deformados como se muestra en la figura 10, únicamente se

muestran las fotografías de aquellas diluciones donde se observaron diferencias importantes (Figura. 10, 11, Cuadro 4 y 5).

Figura 4.

Curva de crecimiento de las cepas RCC7, RCC8, RCC9 de *Bacillus cereus* en CST.

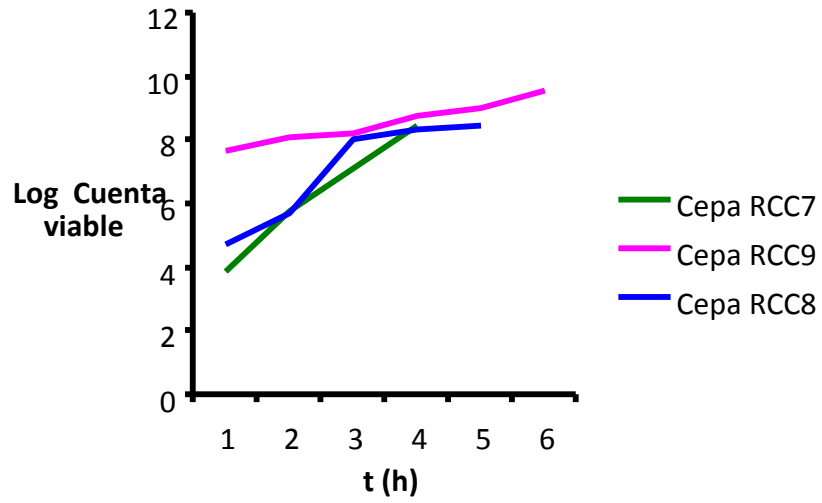


UK Unidades Klett, h Hora, CST Caldo Soya Trypticaseína. F. E. Fase estacionaria.

Se utilizó un aparato Klett summerson utilizando un filtro verde (500-570 nm) midiendo la turbidez en UK a diferentes tiempos. Empleando un preinoculo de *Bacillus cereus* cepa RCC7 en Caldo Soya Trypticaseína.

Figura 5.

Curva de crecimiento de la cepa RCC7, RCC8, RCC9 de *Bacillus cereus* sobre CST.



Se realizó el conteo de UFC/ ml por el método de vaciado en placa.

Cuadro 1.

Algunas características de crecimiento sobre CST de *Bacillus cereus* de las cepas RCC7, RCC8 y RCC9.

	Cepas de <i>Bacillus cereus</i>		
	RCC7	RCC8	RCC9
Nº de divisiones	15.43	12.32	6.47
Tasa de crecimiento *	3.85	2.46	1.07
Tiempo de generación ⁺	15.55	24.34	55.6

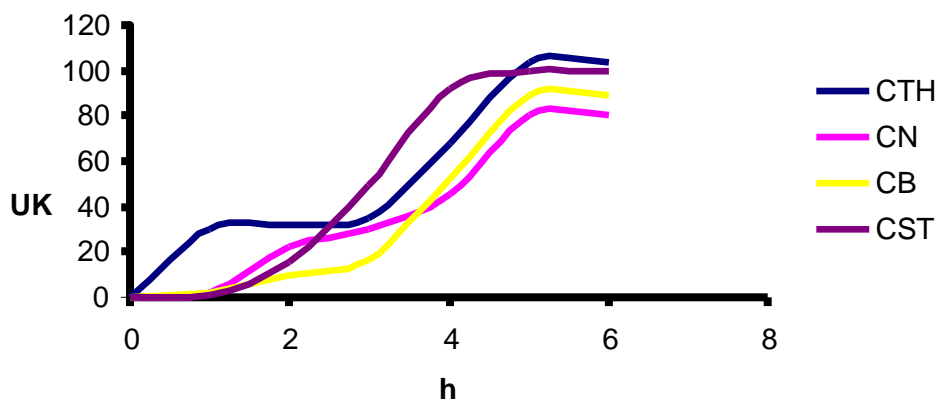
* Generaciones por hora.

+ Minutos por generación.

Los cálculos se realizaron: el N° de divisiones $\frac{\log R_2 - \log R_1}{\log_2}$, la tasa de crecimiento $\frac{d}{dt}$ y el tiempo de generación $\frac{1}{\mu}$ ut/d.

Figura 6.

Cinética de crecimiento de las cepas RCC7 de *Bacillus cereus* en diferentes medios líquidos.



UK Unidades Klett, h Hora, CTH Caldo Todd Hewitt, CN Caldo nutritivo, CB Caldo Brucella, CST Caldo Soya Trypticaseína.

Se utilizó un aparato Klett Summerson utilizando un filtro verde (500-570 nm) midiendo la turbidez en UK a diferentes tiempos, utilizando diferentes medios líquidos. Empleando un preinoculo de *Bacillus cereus* cepa RCC7 utilizando el mismo medio.

Cuadro 2

Hemólisis sobre sangre de *Iguana iguana* y *Gallus gallus* a las 2 horas de incubación de la cepa RCC7 de *Bacillus cereus*.

Tiempo de crecimiento. (h)	Hemólisis sobre sangre de <i>Gallus gallus</i> UH/ml.				Hemólisis sobre sangre de <i>Iguana iguana</i> UH/ml.
	CB	CST	CN	CTH	CTH
1	0	40	40	0	0
2	0	40	40	0	0
3	0	40	40	0	0
4	0	40	40	80	0
5	20	40	40	160	40
6	20	40	40	320	20

CB = Caldo Brucella

CST = Caldo Soya Trypticaseina

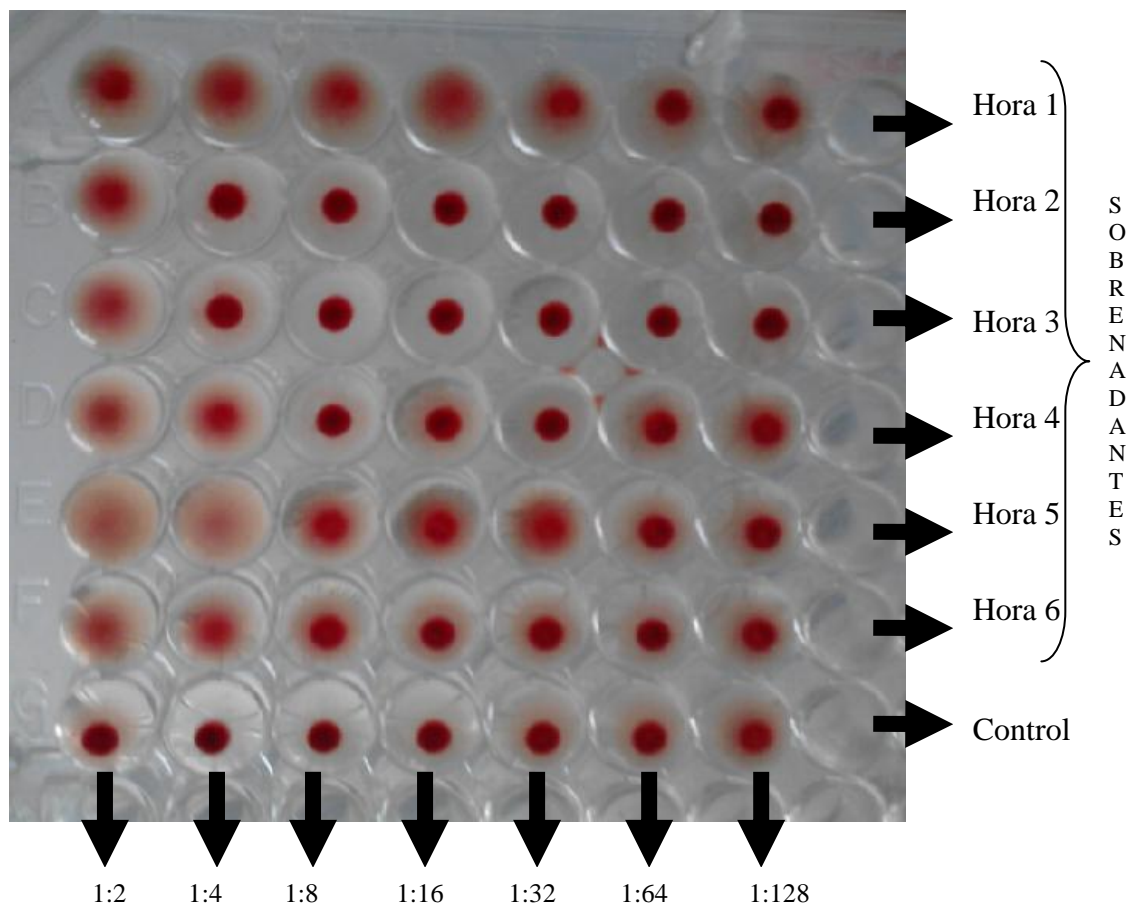
CN = Caldo Nutritivo

CTH = Caldo Todd Hewitt

La lisis se observó en una placa de fondo en U a las 2 horas de incubación con los sobrenadantes de las cepas RCC7 de *Bacillus cereus* crecidos en CB, CST, CN, CTH sobre sangre de ave al 2% mientras que sobre sangre de *Iguana iguana* al 2% se utilizaron los sobrenadantes de cepa RCC7 de *Bacillus cereus* crecida en CTH.

Figura 7.

Fotografía de la microplaca de los sobrenadantes de la cepa RCC7 de *Bacillus cereus* crecida en Caldo Todd Hewitt en sangre completa de *Iguana iguana*.



La lisis se observó en una placa de fondo en U a las 2 horas de incubación con los sobrenadantes de las cepas RCC7 de *Bacillus cereus* crecida en CTH sobre sangre de *Iguana iguana* al 2 %.

Cuadro 3.

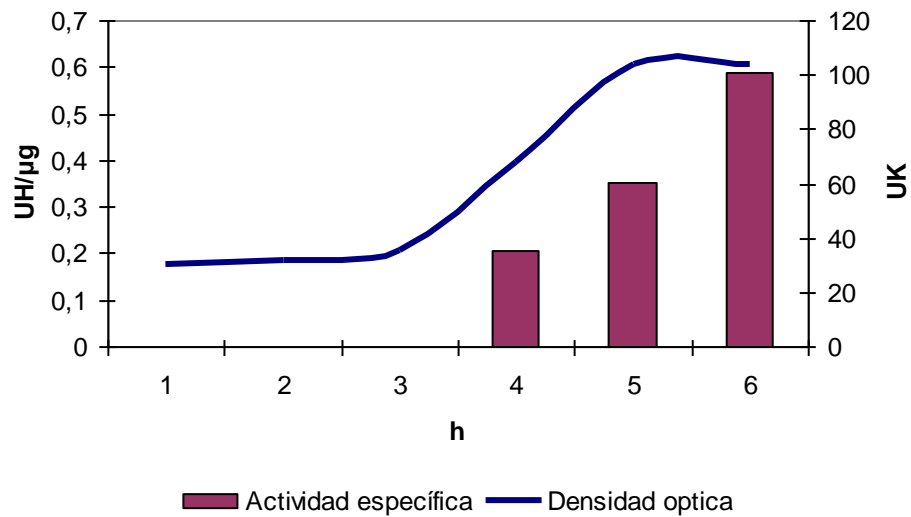
Actividad específica del sobrenadante de *Bacillus cereus* crecido en medio de Todd Hewitt sobre diferentes sustratos.

Tiempo de crecimiento (h)	Proteína $\mu\text{g/ml}$	UH/100 μl en sangre de <i>Gallus gallus</i> ..	UH/100 μl en sangre de <i>Iguana iguana</i>	Actividad específica en sangre de <i>Gallus gallus</i> (μg).	Actividad específica en sangre de <i>Iguana iguana</i> (μg).
1	33,9	0	0	0	0
2	36,9	0	0	0	0
3	38,3	0	0	0	0
4	38,8	8	0	0,206	0
5	45,7	16	4	0,350	0,087
6	54,5	32	2	0,587	0,036

La Actividad específica se calculo: UH/100 μg Proteína.

Figura 8.

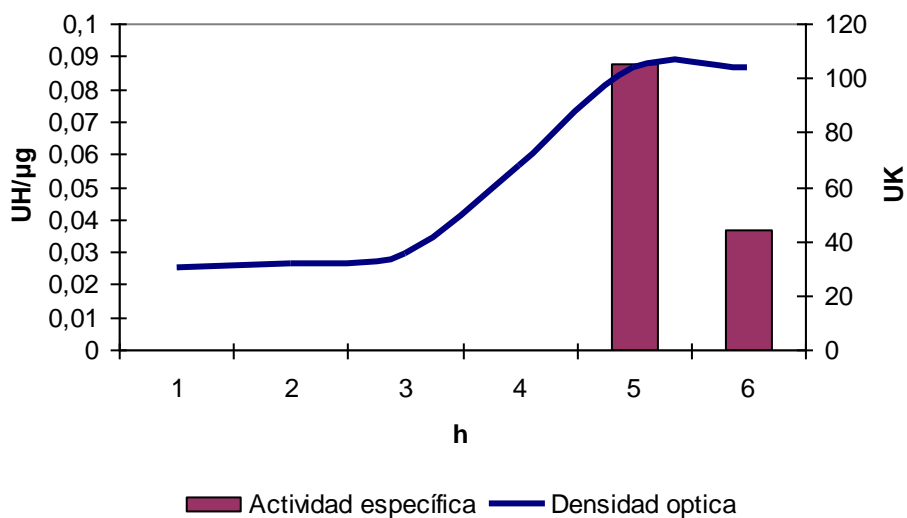
Curva de crecimiento y producción de hemolisina de *Bacillus cereus* de la cepa RCC7 sobre sangre de *Gallus gallus* al 2 %.



Actividad específica y densidad óptica sobre sangre de *Gallus gallus*.

Figura 9.

Curva de crecimiento y producción de hemolisina de *Bacillus cereus* de la cepa RCC7 sobre sangre de *Iguana iguana* al 2 %.



Actividad específica y densidad óptica sobre sangre de *Iguana iguana*.

Cuadro 4

Efectos de los sobrenadantes sobre glóbulos rojos de *Iguana iguana*.

Tiempo de crecimiento. (h)	UH/100 μl en sangre de <i>Iguana iguana</i>	Glóbulos rojos por campo (40 x)	Observaciones
5	4	8	MCA
6	2	9	MCA.

MCA = Membrana citoplasmática amorfa

Se realizaron frotis de las diluciones, se tiñeron con Wright, se observaron al microscopio.

Cuadro 5.

Efectos de los sobrenadantes sobre glóbulos blancos de *Iguana iguana*.

Tiempo de crecimiento (h)	UH/100 μ l en sangre de <i>Iguana iguana</i>	Basófilos	Heterofilos	Linfocitos	Monocitos	Total de glóbulos blancos
5	4	1	2	3	0	6
6	2	1	0	4	0	5

Se realizaron frotis de las diluciones, se tiñeron con Wright, se observaron al microscopio, y se calculo el número de glóbulos blancos en base al porcentaje.

Figura 10.

Morfología de las células observadas en los frotis sanguíneos de la dilución 1:4 sobre sangre de *Iguana iguana* al 2% a las 2 horas de incubación.

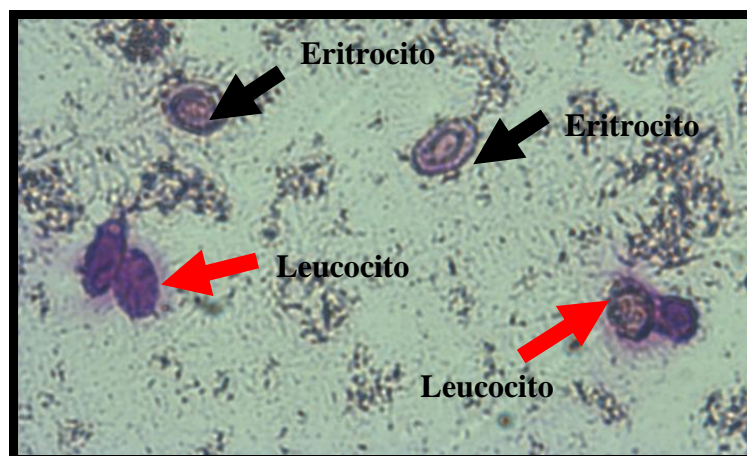


Figura 11.

Morfología de las células observadas en los frotis sanguíneos de la dilución 1:2 sobre sangre de *Iguana iguana* al 2% a las 2 horas de incubación.



9. DISCUSIÓN

Como se observa en la **Figura 4**; las 3 cepas de *Bacillus cereus* tuvieron cinéticas de crecimiento diferentes, esto se debe a que de acuerdo con Kramer *et al.*, (1982) hay diferentes variedades de *Bacillus cereus* y cada variedad tiene diferentes requerimientos, para su crecimiento, por lo tanto tienen diferentes números de divisiones, tasas de crecimiento y diferente tiempo de generación, así por ejemplo la cepa RCC7 al alcanzar la fase estacionaria primero que las cepas RCC8 y RCC9 de *Bacillus cereus* tiene mayor número de divisiones, por tanto la tasa de crecimiento es superior y el tiempo de generación es más corto en comparación con las otras cepas (**Cuadro 1**).

La cinética de crecimiento de *Bacillus cereus* de la cepa RCC7, tuvo un comportamiento diferente en diferentes medios de cultivo evaluados, se observó un comportamiento digauxico en CTH y CB dicho efecto se observó posiblemente a la presencia de los bacteriófagos, se han reportado hasta 12 diferentes fagos, 10 de estos son Myoviridae y 2 Sapoviridae (Ahmed *et al.*, 1995). Al respecto, una bacteria cuando es lisogénica por un bacteriófago, puede por diversas causas (por ejemplo daño al DNA) entrar en el ciclo lítico y lisa a la bacteria con la consiguiente disminución del crecimiento o densidad óptica (Allen *et al.*, 2008).

Otra posibilidad del comportamiento digauxico es que los medios en los que se presenta el comportamiento digauxico tengan algún nutriente limitante; por lo que la bacteria detiene su crecimiento momentáneamente hasta que se adapta al uso de otro requerimiento (Tórtora 2007).

Una unidad hemolítica fue definida como la cantidad de proteína que causó un 50% de lisis a los eritrocitos después de una incubación a 37 °C por 2 horas (Yadav *et al.*, 2008). En nuestra investigación una unidad hemolítica para glóbulos rojos de *Iguana iguana* es representada como la cantidad de hemolisina que causa lisis del 100% total de los eritrocitos expuestos al sobrenadante de *Bacillus cereus* cepa RCC7, ya que en esta investigación en algunos pozos había una hemólisis al 50%. Sin embargo, los frotis de estas diluciones no presentaban cambios significativos.

La fosfatidilcolina y la esfingomielinasa trabajan por cooperación y sinergismo para poder lisar a los eritrocitos y ésta depende de la composición de los eritrocitos (Douglas *et al.*, 2000), la esfingomielinasa induce hemólisis en eritrocitos con alta cantidad de esfingomielinasa

(Odda *et al.*, 2010), por lo tanto la morfología de los glóbulos rojos nucleados en las diferentes especies que los portan tienen la misma estructura. Sin embargo la composición química de su membrana puede variar y con ello expresa diferentes receptores para la toxina, lo que explica el diferente efecto en los glóbulos rojos de ave y reptil producidos por la cepa de *Bacillus cereus* RCC7 (**Cuadro 2 y Figura 7**).

Por consiguiente la mayor actividad hemolítica sobre sangre de *Iguana iguana* y sangre de *Gallus gallus* se observa a las 2 horas de incubación en placa. Sin embargo, en sangre de *Iguana iguana* la mayor actividad hemolítica se presentó con los sobrenadantes utilizados en la fase de crecimiento logarítmica, mientras que para la sangre de *Gallus gallus* se presentó con los sobrenadantes de la fase estacionaria. La variación en la actividad hemolítica puede deberse a las concentraciones variables de colesterol presentes en la sangre, y a la diferente composición de la membrana de los eritrocitos (Gradinski-Verbanak *et al.*, 2002) al respecto *Gallus gallus* tiene de 125-200 mg de colesterol por cada 100 ml en suero, mientras que en *Iguana iguana* es de 110-341 mg de colesterol por cada 100 ml en suero (Campbell y Ellis, 2007) lo que indica que la sangre de *Iguana iguana* por tener más colesterol, es posible que la hemolisina que actúa sobre eritrocitos de *Iguana iguana* es dependiente de la concentración del mismo.

La hemolisina que probablemente actuó contra eritrocitos de *Iguana iguana* fue la BL, ya que de acuerdo con Spira, (1972), ésta se produce en la fase franca de crecimiento logarítmico; mientras que para los eritrocitos de *Gallus gallus* la mayor actividad hemolítica se observó en la fase estacionaria y de acuerdo con Lindback *et al.*, (1999), esta hemolisina no contribuye significativamente a la actividad hemolítica sobre eritrocitos de ave, en consecuencia la actividad específica es diferente para los dos tipos de sangre. En el presente estudio la citotoxina que probablemente afectó a los glóbulos rojos de ave es la toxina emética producida durante la fase estacionaria (Shaheen *et al.*, 2006).

Se obtuvo una mayor concentración de proteína en el sobrenadante de cultivo de *Bacillus cereus* a las 6 horas de incubación. Sin embargo, esto no fue un indicativo que todas las proteínas sean hemolisinas.

El sobrenadante de cultivo de la bacteria, produjo una disminución de los leucocitos sangre de *Iguana iguana* en ensayos *in vitro*, esto probablemente debido a la Cereolisina, ya que de acuerdo con Drobniowski, (1993) tiene una acción citolítica amplia en condiciones *in*

vitro sobre células de mamífero. En condiciones *in vivo* es hemolítica y con frecuencia tiene efectos subléxicos importantes en leucocitos y en la función de macrófagos.

10. CONCLUSIONES

- Las 3 cepas de *Bacillus cereus* son variedades diferentes.
- La cepa RCC7 alcanzo la fase estacionaria en menor tiempo, tiene mayor número de divisiones, mayor tasa de crecimiento y menor tiempo de generación.
- La cepa RCC7 tuvo un crecimiento diauáxico en Caldo Todd Hewitt y en Caldo Brucella.
- La cepa RCC7 mostró la mejor cinética de crecimiento sobre Caldo Todd Hewitt.
- La cepa RCC7 produjo 0.6 UH por 100 µg en Caldo Todd Hewitt sobre los eritrocitos de *Gallus gallus*.
- La cepa RCC7 produjo 0.08 UH por 100 µg en Caldo Todd Hewitt sobre los eritrocitos de *Iguana iguana*.
- El sobrenadante hemolítico de la cepa RCC7 tuvo efecto citolítico sobre leucocitos de *Iguana iguana*.
- Los eritrocitos de las dos especies son lisados por hemolisinas diferentes, producidas en fases de crecimiento diferentes de la cepa empleada.
- El sobrenadante de la cepa RCC7 de *Bacillus cereus* produjo alteraciones en la membrana citoplasmática de eritrocitos.

10. Literatura citada

1. Ahmed R, Sankar-Mistry P, Jackson S, Ackermann HW, Kasatiyam SS. *Bacillus cereus* phage typing as an epidemiological tool in outbreaks of food poisoning. *Journal Clinical Microbiology*, 1995.
2. Allen W, Koneman J, Schreckenberger P, *Diagnostico microbiológico* 6° ed Panamericana, 2008.
3. Andreeva IZ, Nesterenko FV, Fomkina GF, Ternovsky IV, Suzina EN, Bakulina YA, et al The properties of *Bacillus cereus* hemolysin II pores depend on environmental conditions *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Vol. 1768, 2007.
4. Baida GE, Kuzmin NP. Mechanism of action of hemolysin III from *Bacillus cereus*. *Biochimica Biophys.* 1996.
5. Beecher DJ, MacMillan JD, Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* 1991.
6. Beecher DJ, Wong AC, Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Hemolytic analysis of component interactions and a model for its characteristic paradoxical zone phenomenon, *Biology Chemical.* 1997..
7. Bradford MM., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - Dye Binding, *Analytical Biochemistry* 72, 1976:248-254.
8. Branson WR, Greg JH, Linda RH, *Avian Medicine: Principles and application* Wingers publishing, 1994.
9. Campbell TW, Ellis CK. *Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology*, 3aed. USA: Blackwell Publishing Professional, 2007.
10. Choma C., Granum PE. The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. *FEMS Microbiol. Lett*, 2002..
11. Cofas RC. *Establecimiento de métodos de lisis de eritrocitos para el conteo de los leucocitos de ave (tesis de licenciatura)*, México: UNAM Fes Cuautitlan, 2011.
12. Coolbaugh JC, Williams RP, Production and characterization of two hemolysins of *Bacillus cereus*. *J. Microbiology.*, 1978.
13. Corrons VJ, *Técnicas de laboratorio en hepatología* 3ª ed. España Elsevier 2006.

14. Cossart P, Boquet P, Normaik S, Rappuoli R. Cellular microbiology 2^o ed Washington D.C. 2005.
15. Dierick K, Van CE., Swiecicka I., Meyfroidt G, Devlieger H., Meulemans A. et al Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning, J. Clinical Microbiology, 2005.
16. Douglas JB, Wong CLA Cooperative, synergistic and antagonistic haemolytic interactions between haemolysin BL, phosphatidylcholine phospholipase C and sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. Microbiology 2000.
17. Drobniowski AF, *Bacillus cereus* and related species. Clinical Microbiology Reviews, 1993.
18. El-sayed MY, Roberts MF. Lanthanide derivatives of phospholipase C from *Bacillus cereus*. Biochim. Biophys, 1983.
19. Fagerlund A, Lindbäck T, Storset AK, Granum PE, Hardy SP, *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. Microbiology 2008.
20. Fagerlund A, Lindbäck T, Storset AK, Granum PE, Hardy SP. *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. Microbiology 2008.
21. Fagerlund A, Ween O, Lund T, Hardy SP, Granum PE, Genetic and functional analysis of the cytK family of genes in *Bacillus cereus*. Microbiology 2004.
22. García AV, Zamudio DM, Manual de microbiología medica facultad de estudios superiores zaragoza 1998.
23. Gilbert RJ, Kramer JM, *Bacillus cereus* food poisoning. In Progress in Our Knowledge of Foodborne Disease During the Life of the Food Research Institute. Madison: Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison, 1986.
24. Gilmore MS, Cruz-Rodz AL, Leimeisterwächter MJ, Goebel W. A *Bacillus cereus* cytolytic determinant, cereolysin AB, which comprises the phospholipase C and sphingomyelinase genes: nucleotide sequence and genetic linkage. J. Bacteriology, 1989.
25. Gradinski-Vrbanac B, Stojević Z, Milinković- Tur S, Balenović TJ, Zdelar-Tuk M. In vitro susceptibility of duck, chicken, and pig erythrocyte lipids to peroxidation. Vet. Med. – Czech, 2002.

26. Kramer JM., Turnbull PC, Munshi G, Gilbert RJ. Identification and characterization of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species associated with foods and food poisoning. In Isolation and identification methods for food poisoning organisms. London: Academic Press.1982.
27. Lindback T, Andreas O, Rishovd A, Kolsto AB. Insertional inactivation of hblC encoding the L2 component of *Bacillus cereus* ATCC 14579 haemolysin BL strongly reduces enterotoxigenic activity, but not the haemolytic activity against human erythrocyte. Genetics and molecular biology. 1999.
28. Lindbäck T, Fagerlund A, Rødland MS, Granum PE, Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. Microbiology, 2004.
29. Lund T, Buyser ML, Granum PE. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. Molecular Microbiology, 2000.
30. Murray RM., KEN RS., Michael PA., Microbiología Médica 5° ed. España: Elsevier Mosby S.a., 2006.
31. Novoa FD, Benitez TI, Corredor MR, Rodriquez PJ, Hallazgos hematologicos en Iguana verde suramericana (*Iguana iguana*), de ejemplares ubicados en zona urbana y suburbana de Villavicencio, Orniquia Universidad de los Llanos, 2008.
32. Odaa M, Takahashia M, Matsunoo T, Uooa K, Nagahamaa M, Sakurai J, Hemolysis induced by *Bacillus cereus* sphingomyelinase. Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University, 2010.
33. Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Uria MA, Fraile B, Anadon R, et al. Citología e histología vegetal y animal 3° ed. España: Mc Graw Hill – Interamericana S.A.U., 2000.
34. Reynoso HV. Ecología, evolución y biología de las iguanas. Memorias de XII reunión nacional sobre iguanas subcomité; 2008 Mayo 21-23; Puebla (Puebla) México D.F. Subcomité técnico consultivo para la conservación, manejo y aprovechamiento sustentable de las iguanas de México, 2008: 7-12.
35. Shaheen R, Andersson MA, Apetroaie C, Schulz A, Ehling-Schulz M, Ollilainen VM, et al. Potential of selected infant 48 food formulas for production of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. Int. J. Food Microbiol, 2006.
36. Spira WM, Goepfert JM, *Bacillus cereus*-induced *fluid* accumulation in rabbit ileal loops.1972. Aplicacion. Microbiology, 1972.

37. Struthers JK, Westran PR. *Bacteriología Clínica* 1º ed. Barcelona: Masson S.A., 2003.
38. Tortora F, Case, *Introducción a la microbiología*. 1º ed Medica Panamericana 2007.
39. Yadav SP, Ahmad A, Pandey BK, Singh D, Asthana N, Verma R, A peptide derived from the putative transmembrane domain in the tail region of E. Coli toxin hemolysin E assembles in phospholipid membrane and exhibits lytic activity to human red blood cells: Plausible implications in the toxic activity of the protein. Molecular and structural biology division, central drug research institute, 2008.