

FALLA DE ORIGEN

BUSQUEDA DE UNA CEPA SILVESTRE O MUTANTE DEL GENERO  
*Bacillus* PARA SUSTITUIR A *S. marcescens* WF EN EL  
APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE SUBPRODUCTOS  
PROTEIN-QUITINOSOS POR VIA FERMENTATIVA

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A  
SANTILLAN FLORES MARIBEL



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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 está 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.

UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO

INCORPORADA A LA UNAM

BUSQUEDA DE UNA CEPA SILVESTRE O MUTANTE DEL GENERO *Bacillus* PARA  
SUSTITUIR A *S. marcescens* WF EN EL APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE  
SUBPRODUCTOS PROTEIN-QUITINOSOS POR VIA FERMENTATIVA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
PRESENTA:

SANTILLAN FLORES MARIBEL

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Enzimas Microbianas del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Ramón Cruz Camarillo .

La investigación se inserta dentro del programa ( P-2700 ) " **Aprovechamiento integral de subproductos protein-quitinosos por vía fermentativa** ". Y en el proyecto " **Busqueda de cepas bacterianas del género *Bacillus* con actividades proteolíticas y quitinolíticas semejantes a las encontradas con *S. marcescens* Wf** ", con clave 920843. El presente estudio contó con el apoyo institucional de la Dirección de Estudios de Postgrado e Investigación (DEPI), del Instituto Politécnico Nacional.

**A MIS PADRES . . . . .**

**POR SU EJEMPLO DE CONSTANCIA,  
FORTALEZA Y AMOR.  
GRACIAS POR TODO . . . . .**

**A DIOS . . . . .**

**POR MANTENER MI FE Y ESPERANZA  
DE ALCANZAR MI OBJETIVO.**

**AL Dr. RAMON CRUZ CAMARILLO . . . . .  
POR SUS ENSEÑANZAS, ORIENTACION  
Y PACIENCIA EN LA REALIZACION DE  
ESTA TESIS.**

**A LA MAESTRA GRIS . . . . .  
POR SU ATENCION Y SUGERENCIAS EN  
LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.**

**AL MAESTRO MISAEL . . . . .  
POR SU EJEMPLO DE ENTREGA, DEDICACION  
Y AMOR SIN LIMITE A SU PROFESION.**

**A MIS HERMANOS . . . . .  
POR SU CARIÑO Y APOYO ; POR TODOS LOS  
MOMENTOS COMPARTIDOS.**

**A MIS SOBRINOS . . . . .  
CON TODO MI AMOR ; DESEANDO QUE CUMPLAN  
TODAS SUS METAS.**

**A SANDRA . . . . .  
POR TODAS LAS ILUSIONES, SUEÑOS, EXPERIENCIAS  
Y METAS COMPARTIDAS.**

**..... POR ESCUCHARME Y DEJAR VOLAR MI IMAGINACION.**

**MARIBEL**

# INDICE

## 1. INTRODUCCION

Pag

1.1. Aprovechamiento de subproductos protein-quitinosos por vía microbiana	1
1.1.1 Proteasas extracelulares	2
1.1.2 Quitinasas y quitobiasas extracelulares	2
1.1.3 NAG y producción de levadura	2
1.1.4 Residuo solido, remanente al final de la fermentación	3
1.1.5 Biomasa bacteriana	3
1.2. Actividad quitinolítica en el género <i>Bacillus</i> . El caso patricular de <i>B. thuringiensis</i> .	4
1.3. Objetivo general	8
1.4. Objetivos particulares	8

## 2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Microorganismos empleados	9
2.2. Medios de cultivo	9
2.3. Técnicas para la mutación bacteriana	10
2.3.1. Mutación con Luz UV	10
2.3.2. Mutación con N- metil- N'- nitro- N"- nitroso-guanidina (NTG)	11
2.4. Enriquecimiento de la población mutante capaz de producir quitinasas.	11

## 3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Integración de una colección de cepas del género <i>Bacillus</i> para estudiar su capacidad quitinolítica	13
3.2. Capacidad productora de quitinasas del grupo de 68 cepas del género <i>Bacillus</i> , facilitadas por el Depto. de Biotecnología-Bioingeniería del CINVESTAV-ZACATENCO.	18
3.2.1. Actividad extracelular de nucleasas	18
3.2.2. Actividad de esterasa	19
3.3. Capacidad productora de quitinasas de las colecciones de cepas donadas	28
3.4. Mutación con luz ultravioleta	33
3.5. Mutacion de <i>B. licheniformis</i> con nitrosoguanidina	35

## 4. CONCLUSIONES

43

## 5. BIBLIOGRAFIA

45

# 1.-INTRODUCCION

## 1.1 APROVECHAMIENTO DE SUBPRODUCTOS PROTEIN QUITINOSOS POR VIA MICROBIANA.

En el laboratorio de Enzimas Microbianas (LEM) de la Escuela Nacional de Ciencias Biologicas ( ENCB) se realizan desde 1975 (1) , estudios relacionados con la degradación microbiológica de la quitina. En años recientes se ha pretendido dar a estos estudios un enfoque aplicado utilizando como modelo de sustrato quitinoso el carapacho de camarón , el cual es abundante, barato y fácil de conseguir.

Cuando el carapacho es suspendido en un medio sintético o en sólo agua de suministro y se inocula la bacteria quitinolítica *S.marcescens* Wf, ocurre una fermentación que origina productos potencialmente utilizables como quitinasas, quitobiasas, proteasas, N-acetil-D-glucosamina (NAG), un sólido remanente y biomasa bacteriana.La siguiente figura muestra el balance de materiales de dicho proceso (2).

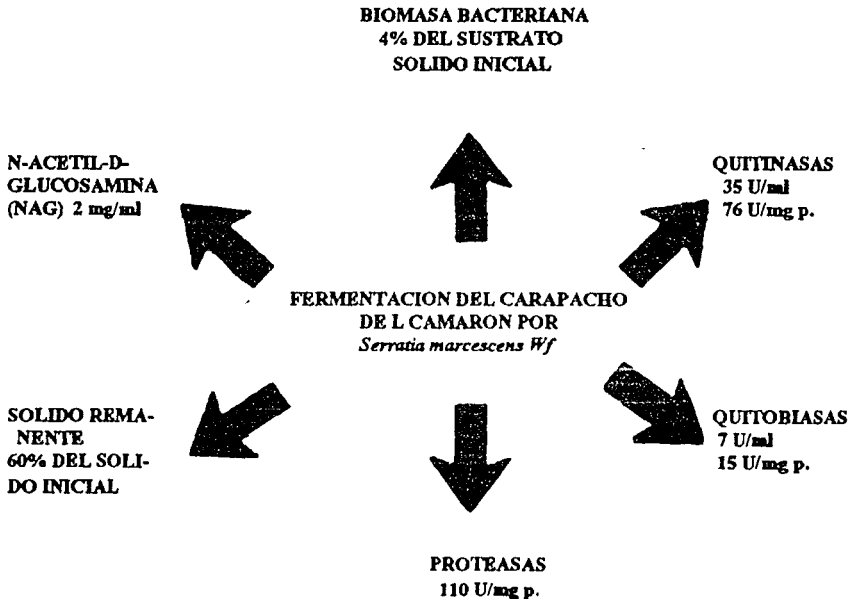


Figura 1. Esquema del balance de materiales que resultan de la fermentación del carapacho de camarón por *S. marcescens* Wf (2).



En cuanto a la búsqueda de los usos prácticos que podrían darse para estos productos, los avances realizados en cada caso se resumen a continuación:

**1.1.1) PROTEASAS EXTRACELULARES.** A este respecto se han efectuado diversos trabajos donde se ha demostrado que dichas proteasas son muy fáciles de producir en medios simples y económicos a base de harina de soya, y que por su pH óptimo de 9.0 podrían emplearse en la fabricación de detergentes biológicos (3,4).

También se han realizado estudios sobre estas mismas enzimas, pero producidas en medios conteniendo carapacho de camarón (5), y se comprobó que podrían utilizarse con excelentes resultados para producir hidrolizados de carne de pescado de especies grasosas y no grasosas (6, 7).

**1.1.2) QUITINASAS Y QUITOBIASAS EXTRACELULARES.** A diferencia de las proteasas, las enzimas quitinolíticas han resultado muy inestables y difíciles de purificar. Esta inestabilidad puede deberse en parte a que ambas enzimas son tiol-dependientes, parecen tener estructura cuaternaria, poseen isoenzimas y funcionan más como sistemas que como enzimas individuales (8,9).

Es claro que por las dificultades que se presentan para su purificación y por conveniencia económica, debe pensarse en la utilización de las enzimas quitinolíticas a nivel de extracto crudo para fines prácticos, por ejemplo para sacarificar quitina coloidal y producir NAG (10, 11). Además, y como una posibilidad a explorar, se tiene el proyecto de investigar el posible uso de enzimas quitinolíticas en compuestos antimicrobianos de uso tópico, o como aditivos para potenciar la acción insecticida de *Bacillus thuringiensis*.

**1.1.3) NAG Y PRODUCCION DE LEVADURA.** En el Laboratorio de Enzimas Microbianas se ha realizado una investigación que demuestra que el caldo residual obtenido después de la fermentación del carapacho de camarón contiene NAG, que puede ser utilizada entre otras alternativas para la producción de biomasa de levadura (12,13).

**1.1.4) RESIDUO SOLIDO, REMANENTE AL FINAL DE LA FERMENTACION.** En un estudio reciente se ha demostrado que durante la fermentación del carapacho de camarón, sólo el 31% del material sólido original es solubilizado por la acción de proteasas, quitinasas y quitobiasas. El remanente aún posee proteínas, sales y quitina, y ya se ha comprobado que aplicando al residuo procesos químicos suaves, se obtiene quitina pura. Esto permite proponer que es posible obtener este polisacárido a partir del carapacho de camarón por un procedimiento mixto; primero fermentativo - que tendría la ventaja de generar compuestos con utilidad práctica como proteasas, quitinasas, quitobiasas y NAG - , y después químico, para obtener quitina a partir del remanente sólido . Cabe enfatizar aquí, que tanto para la quitina como para la quitosana, se han propuesto una multitud de aplicaciones de enorme interés (2).

**1.1.5 Biomasa Bacteriana.** La biodegradación de la quitina y de materiales proteín-quitinosos, ocurre en la Naturaleza mediante la intervención de poblaciones mixtas microbianas.

Se ha reportado que los actinomicetos representan del 90 al 99% de los organismos quitinolíticos que se encuentran en el suelo. Otras bacterias reportadas como tales, están representadas por los géneros *Bacillus*, *Mixobacter* y *Serratia* (14). Al respecto, en 1969 Monreal y Reese publicaron un trabajo en el que concluyeron que entre 100 microorganismos estudiados (30 hongos y 70 bacterias) , el más eficiente biodegradador de quitina era *Serratia marcescens* (15). Los resultados obtenidos a lo largo de varios años en el LEM, confirman que en efecto *S.marcescens*, y en particular su cepa Wf, es altamente eficiente para crecer a expensas de cualquier tipo de subproducto proteín-quitinoso, produciendo enzimas proteolíticas y quitino-hidrolíticas (quitinasas y quitobiasas) . Como resultado las proteínas son transformadas en péptidos y aminoácidos libres, y la quitina es convertida en NAG. Estos compuestos son utilizados en parte como fuente de nitrógeno, carbono y energía para el crecimiento celular, y en parte se acumulan en el caldo de fermentación ( ver fig. 1) .

No obstante su gran eficacia como biodegradador de materiales protein-quitinosos, *S. marcescens* es un microorganismo con pocas posibilidades de ser aceptado en un proceso biotecnológico para fines industriales o ecológicos, en donde se pretenda aprovechar tales sustratos, por tratarse de un patógeno oportunista intrahospitalario que cada día adquiere más relevancia.

En tal virtud, en el LEM desde hace tres años se ha iniciado una investigación para encontrar un microorganismo alternativo que pueda sustituir a *S. marcescens* *Wf*. La presente investigación queda inserta dentro de este marco de referencia, y tiene el propósito de explorar la actividad quitinolítica de diferentes cepas del género *Bacillus*, siendo una continuación de investigaciones recientes llevadas a cabo en el LEM con *B. thuringiensis*. En el siguiente punto se dan los detalles correspondientes.

## **1.2 ACTIVIDAD QUITINOLITICA EN EL GENERO *Bacillus*. EL CASO PARTICULAR DE *B. thuringiensis*.**

En vista de la necesidad de reemplazar a *S. marcescens* *WF*, en los procesos biotecnológicos avocados al aprovechamiento de materiales protein-quitinosos, lo primero a considerar es que un microorganismo de uso industrial debe llenar al menos las siguientes características :

- 1.- No tener requerimientos nutricionales complejos, de manera que pueda crecer en medios de cultivo de fácil preparación y preferentemente con ingredientes de bajo costo.
- 2.- Tener una tasa elevada de crecimiento, para que los procesos fermentativos sean cortos.
- 3.- No requerir condiciones ambientales de cultivo complicadas.

- 4.- Ser eficientes en la conversión de los sustratos en los productos de la fermentación .
- 5.- Tener alta estabilidad genética para que no disminuyan los niveles de producción.
- 6.- Ser inocuo .
- 7.- Fácil de manipular .
- 8.- Fácil de separar del caldo de fermentación .
- 9.- Susceptible de ser mejorado genéticamente mediante técnicas clásicas de mutación, y por ingeniería genética.

*S. marcescens* llena ampliamente los puntos anteriores, excepto el referente a su inocuidad, ya que es un potencial patógeno oportunista intrahospitalario, lo que significa que sólo en ambientes nosocomiales se han realizado contagios con esta bacteria a través del uso de materiales contaminados como prótesis, material quirúrgico, soluciones diversas, etc, a pacientes con graves deficiencias en su sistema inmunológico. Ante este riesgo potencial resulta importante encontrar un microorganismo alternativo que tenga las ventajas de *S. marcescens* pero que resulte inocuo. La primera alternativa estudiada en el LEM fue *B. thuringiensis* (16) por las siguientes razones:

- 1.- Reune todas las cualidades deseables para un microorganismo industrial .
- 2.- Ya tiene usos biotecnológicos reconocidos en la elaboración de bioinsecticidas, debido a que produce cristales intracelulares entomopatógenos.

3.- En nuestro País existen colecciones importantes de *B.thuringiensis*, lo que facilita la realización de estudios con este microorganismo, sin necesidad de realizar aislamientos previos.

4.- El género *Bacillus* en lo general es un buen productor de exoenzimas (16,17).

5.- Aunque muy escasas, existen reportes que indican que en lo particular *B.thuringiensis* es quitinolítico (18).

Los estudios se realizaron con 150 cepas de *B.thuringiensis* y demostraron que casi todas ellas eran proteolíticas, incluso algunas más proteolíticas que *S. marcescens* WF (19); en cambio la frecuencia de cepas quitinasa- positivas era muy baja, y las pocas cepas con esta capacidad producían niveles enzimáticos muy modestos (16). Ante esta circunstancia, las cepas silvestres más prometedoras, seleccionadas mediante ensayos enzimáticos en placa, se sometieron a la acción de dos agentes mutagénicos; la luz UV y la nitrosoguanidina, en tratamientos simples o dobles usando alternativamente ambos mutágenos en sus dos secuencias posibles. Los mejores resultados se obtuvieron al alternar procesos de mutación con nitrosoguanidina primero, y luego con luz UV; de lo cual resultaron cepas con características similares a *S. marcescens* WF por su elevada capacidad proteo-quitinolítica. Lamentablemente estas cepas resultaron muy inestables, y pronto revirtieron hasta comportarse como las cepas silvestres originales (16).

Ante esta circunstancia, en el presente trabajo se reanuda la búsqueda de una cepa altamente proteo-quitinolítica, pero abarcando no solo la especie *B. thuringiensis*, sino el máximo posible de cepas del género *Bacillus* que nos sea posible conseguir. Al hacerlo se hacen las siguientes reflexiones:

1. Varias especies del género *Bacillus* ( por ejemplo: *B.subtilis*, *B.polimyxa*, *B.licheniformis*, etc ) tienen usos industriales por su capacidad para producir enzimas de interés práctico como proteasas, amilasas y lipasas. Su capacidad se extiende a otras enzimas de caracter hidrolítico como celulasas, pectinasas, fosfolipasas, nucleasas y muchas más. También producen antibióticos , aminoácidos, péptidos y otras sustancias de interés .

2. Las especies del género *Bacillus* en lo general, reúnen los requisitos deseables para los microorganismos que se emplean en Biotecnología.

3. Aunque muy escasos, hay reportes de que algunas cepas del género *Bacillus* pueden biodegradar a la quitina. Dentro de ellos puede mencionarse un estudio sobre la distribución de las quitinasas y quitobiasas. Las especies que resultaron positivas fueron *B.chitinosporus*, *B.pulvifaciens*, *B.alvei*, *B.thuringiensis*, *B.licheniformis*, *B.laterosporus* y *B.coagulans* (17) .

4. Al extender el estudio a diferentes especies del género *Bacillus*, y no a una en particular (*B. thuringiensis*) , es posible que se tengan más posibilidades de encontrar una cepa que pueda sustituir a *S. marcescens* WF.

En este contexto, los objetivos del presente estudio son:

### **1.3 OBJETIVO GENERAL**

Estudiar un grupo de cepas microbianas correspondientes al género *Bacillus*, en cuanto a su capacidad para producir quitinasas extracelulares.

### **1.4 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Reunir una colección de 100 cepas del género *Bacillus*, recurriendo a diferentes Instituciones Nacionales de Investigación.
2. Realizar una selección primaria evaluando la actividad quitinolítica extracelular de dichas cepas, mediante técnicas de cultivo en placa. Escoger las cepas más promisorias.
3. Intentar incrementar la capacidad quitinolítica de las cepas seleccionadas en el inciso anterior, mediante mutación con luz ultravioleta y/o nitrosoguanidina. Escoger las cepas más eficientes .

## 2.-MATERIALES Y METODOS

### 2.1 MICROORGANISMOS EMPLEADOS

**Cepas de trabajo.** Se emplearon 68 cepas del género *Bacillus*, facilitadas amablemente por el Departamento de Biotecnología-Bioingeniería del CINVESTAV-Zacatenco ; una colección de 8 cepas del género *Bacillus* donadas por la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI) del IPN ; 12 cepas obsequiadas por los Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial (LANFI) , 6 pertenecientes al género *Bacillus* y el resto a otros géneros y 12 cepas de *B. thuringiensis* perteneciente al LEM, que habían sido seleccionadas en un estudio previo (16) .

**Cepa de referencia .** Se usó la bacteria apigmentada *S. marcescens* Wf, la cual es altamente quitinolítica y proteolítica y que fue donada al LEM desde 1975, por el Dr. R.P. Williams del Baylor College of Medicine , Houston, Texas, U.S.A.

### 2.2 MEDIOS DE CULTIVO

**Medio base sintético .** Este contiene : 0.625 g de citrato diamónico; 0.250 g de NaCl; 0.375 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.125 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0.375 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> , ajustando el pH a 7.0 (18).

**Para la evaluación de quitinasa en placa .** Se empleó un medio compuesto por quitina coloidal al 13-14% peso húmedo, y agar al 2.3% , suspendidos en el medio base. La quitina coloidal se preparó pesando 10 g de quitina comercial (Sigma) previamente molida en un molino Wiley usando la malla 40, a la que se adicionaron 100 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> concentrado, y se movió hasta la homogenización. Después se dejó en refrigeración durante 24 horas y posteriormente se añadió agua en exceso para lograr el hinchamiento del polisacárido.



Finalmente se filtró a través de 3 capas de gasa y se lavó hasta la eliminación total del ácido. Se esterilizó en autoclave y se guardó en refrigeración hasta su uso.

Para preparar las placas se mezclaron el medio base con el agar y la quitina coloidal en las proporciones ya indicadas, y se esterilizó en autoclave en la forma habitual (15 lb/15'). Después se repartió en placas estériles teniendo la precaución de agitar constante y suavemente, a fin de repartir el material de manera uniforme. Cuando un microorganismo secreta quitinasas, puede observarse un halo transparente en torno a su colonia, debido a la digestión de las partículas insolubles de la quitina (20,21).

**QUITINA LIBRE DE PROTEINAS.-** Se mezclaron 10 g de quitina comercial con 500 ml de hidróxido de potasio al 4% y se sometió a ebullición con agitación manual vigorosa durante una hora, adicionando el hidróxido de potasio necesario para mantener el volumen constante. Posteriormente se filtró sobre gasa y se lavó exhaustivamente hasta la eliminación del álcali. El tratamiento mencionado disminuye el contenido de proteínas desde 11.3% en la quitina comercial hasta 0.2% en la quitina desproteínizada. Posteriormente se da el tratamiento correspondiente para que el polisacárido adquiriera la consistencia coloidal o de gel (8).

## **2.3 TÉCNICAS PARA LA MUTACION BACTERIANA**

Se realizó con el propósito de incrementar la producción de quitinasas, en aquellas cepas del género *Bacillus* escogidas después de la selección primaria en placa. Al respecto se emplearon 2 mutágenos.

**2.3.1 Mutación con Luz UV.** Se inocularon matraces Erlenmeyer conteniendo 25 ml del medio basal con la cepa a mutar. Se incubó durante 18 h a 29 C y 180 rpm para obtener células frescas. Se hizo un nuevo pase para sincronizar la población hasta fase logarítmica, se tomó un ml de la suspensión anterior y se sembró en medio fresco e incubó en las mismas condiciones durante 4 h.

Para mutar se tomó una alícuota de 3.0 ml de la nueva suspensión bacteriana, que se colocó en una caja de Petri estéril de 9.0 cm de diámetro y 1.5 cm de profundidad. En seguida se irradió durante 120 seg con una lámpara germicida GE de 15 W a una distancia de 40 cm; procurando que la muestra recibiera una dosis de irradiación uniforme, colocando la placa sobre un agitador rotatorio empleando movimientos lentos y suaves (3,20). Estas condiciones permitieron que la población bacteriana se redujera hasta un 1% de su número original, lo que hace muy probable que las sobrevivientes hayan sufrido algún tipo de daño mutagenético (16).

**2.3.2 MUTACION CON N- METIL- N' - NITRO - N'' - NITROSO- GUANIDINA (NTG).** La cepa a mutar se sembró en matraces Erlenmeyer conteniendo 25 ml de medio basal, incubando con agitación constante a 29° C durante 24 h. Después se transfirió un ml del cultivo a un matraz conteniendo igual volumen de medio fresco, y se incubó durante 4 h en las mismas condiciones. A continuación se añadió 0.1 ml de una solución (preparada al momento) de NTG en acetona a una concentración de 100 mg/ml y se dejó incubar 60 min en las mismas condiciones, cubriendo el matraz con papel aluminio para evitar la fotodescomposición del mutágeno. Para detener la acción, la NTG se eliminó centrifugando la muestra a 4000 rpm/ 15 min y descartando el sobrenadante. El paquete bacteriano se resuspendió en el volumen original de medio basal fresco. El efecto letal de este tratamiento origina que la población se reduzca hasta un 1% de la original (16).

Para favorecer la selección y proliferación de la población capaz de producir quitinasas, las células mutadas sobrevivientes fueron tratadas bajo las condiciones que serán referidas a continuación:

**2.4 ENRIQUECIMIENTO DE LA POBLACION MUTANTE CAPAZ DE PRODUCIR QUITINASAS.** Una porción (0.1 ml) de las bacterias mutadas con luz UV o con NTG se transfirió a un medio de cultivo conteniendo quitina desproteínizada al 4%, suspendida en 25 ml de la solución resultante después de esterilizar quitina comercial al 4% en medio basal, y se incubó durante 96 h a 29° C con agitación de 180 rpm. Luego

se sembró por dilución en placas de quitina coloidal y desproteïnizada. Las colonias crecidas representan mutantes productoras de quitinasas.

El principio de este experimento se basa en las siguientes consideraciones :

a) El inductor de las quitinasas no es el polisacárido quitina, ya que éste no puede introducirse como tal en la célula bacteriana. Los inductores son oligosacáridos solubles, presentes en muy pequeña proporción en los materiales proteïn-quitinosos nativos y que son solubilizados durante el tratamiento de esterilización con calor humedo.

Si se prepara el medio de cultivo esterilizando por separado los materiales proteïn-quitinosos mediante calor seco, luz UV , microondas , etc , y el medio basal o el agua de suministro se esteriliza por separado con calor humedo, y luego se mezclan ambos ingredientes, las quitinasas no se producen porque los inductores (quitodextrinas) no son extraídos y solubilizados en el medio de cultivo.

b) La quitina no se encuentra libre en la Naturaleza, sino asociada a proteínas ; por tanto, si para seleccionar la población mutante se usan los materiales proteïn- quitinosos en su forma nativa, se seleccionan tanto productores de proteasas como de quitinasas. En estas condiciones lo más probable es que acabe predominando la población proteolítica, por ser las proteínas sustratos de más facil degradación que la quitina. Por esta razón se utilizó como medio selectivo una suspensión de quitina desproteïnizada al 4% en agua de la llave, y la población obtenida se transfirió mediante dilución en placas conteniendo quitina coloidal desproteïnizada, posteriormente se incubó durante 96 h y se seleccionaron las mutantes con mayor halo de hidrólisis , las cuales se conservaron en placas de quitina desproteïnizada.

### 3.- RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1 INTEGRACION DE UNA COLECCION DE CEPAS DEL GENERO *Bacillus* PARA ESTUDIAR SU CAPACIDAD QUITINOLITICA.

La formación de este cepario como condición previa, indispensable para el desarrollo de la presente investigación , no era simplemente reunir indiscriminadamente un número determinado de microorganismos, correspondientes al género *Bacillus*, sino que en ésta debieron considerarse al menos los siguientes aspectos.

a) Son muchas las instituciones en México que tienen ceparios microbianos; como Universidades, Hospitales y Centros de investigación de carácter público y privado. La conservación de tales cepotecas es muy costosa por la erogación que debe hacerse en salarios para personal especializado, equipo e instalaciones, medios de cultivo, resiembras, ensayos de pureza e identificación taxonómica, conservación a largo plazo mediante liofilización y ultracongelación o por periodos más breves en medios sólidos apropiados. Por todo ello el precio de cada cepa es elevado, y el costo de una colección de cien cepas puede resultar excesivo. Por fortuna conseguir estas colecciones puede resultar relativamente simple y gratuito si se hace a través de instituciones oficiales como la ENCB, siempre que se utilicen en investigaciones debidamente registradas y con fines no lucrativos como fue en nuestro caso. Sin embargo, el concluir esta fase del trabajo requirió de varios meses, y la mayor parte debió realizarse en el CINVESTAV- Zacatenco por razones que luego se explicarán.

b) Las colecciones microbianas tienen por lo general un cierto grado de especialización, según los intereses de las instituciones que las mantienen. Por ejemplo las hay de hongos, bacterias, algas, protozoarios y virus. En Hospitales y Escuelas de Medicina se conservan preferentemente microorganismos patógenos para el hombre. En centros agropecuarios y veterinarios se interesan más por los patógenos para plantas y

animales, en centros acuícolas lo hacen más por algas y protozoarios para la alimentación de peces y crustáceos de interés comercial, etc.

En el presente estudio se requerían principalmente bacterias del género *Bacillus* para propósitos biotecnológicos, por tanto la opción lógica para conseguirlas era dirigirse a instituciones que realizan investigaciones en dicho campo. Entre las más prestigiadas dentro del área Metropolitana se tienen la UAM-Ixtapalapa, el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, la UAM-Xochimilco, el CINVESTAV-Zacatenco y otras. Después de hacer los trámites correspondientes, las únicas instituciones que respondieron a nuestra solicitud están señaladas en la tabla 1 y ellas fueron en primer lugar el Depto. de Biotecnología-Bioingeniería del CINVESTAV-Zacatenco del IPN, la Unidad Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI) del IPN, y los Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial (LANFI) ya desaparecidos. El Depto. de Microbiología de la ENCB donde se realizó la presente investigación no pudo apoyarnos, porque sus colecciones tienen preferentemente un interés médico y veterinario.

Cabe señalar que las instituciones que fueron nuestras donadoras tienen un gran prestigio y garantizan por un lado la pureza de sus cultivos y su correcta identidad taxonómica, y por otro, dada la naturaleza de sus investigaciones las cepas donadas tienen un alto valor por su capacidad para producir algún compuesto de interés práctico, que puede ser un antibiótico, aminoácido, enzima, vitamina, lípido, polisacárido, pigmento, aromatizante y toda una gama de productos útiles. Generalmente las instituciones donantes no indican la potencialidad de sus cepas por tener éste un carácter confidencial. En este aspecto es particularmente interesante la colección microbiana del CINVESTAV-Zacatenco, que probablemente es la más grande del País y abarca hongos filamentosos, levaduras y algas y es depositaria de una gran variedad de cepas de diferentes procedencias, todas las cuales tienen la potencialidad de usos prácticos.

c) Como fue indicado en el inciso anterior, la colección del CINVESTAV-Zacatenco-IPN es probablemente la más grande e importante de México. Ello explica que de las 100 cepas de *Bacillus* estudiadas 68 hayan sido proporcionadas por esta institución. Sin embargo cabe aclarar que dado lo valioso de la colección, no se nos permitió sacar dichas cepas del CINVESTAV-Zacatenco y tuvieron que estudiarse en el propio centro en forma ciega, es decir sólo se nos indicó que eran *Bacillus sp.* Con las 68 cepas se realizó un estudio sobre su capacidad para secretar quitinasas y otras exoenzimas, manejando las cepas con una clave numerica del uno al 68. De tal investigación resultó que 15 cepas eran interesantes para nuestros propósitos y fueron solicitadas, sin embargo sólo nos proporcionaron 5 de ellas, y solo hasta entonces se conoció su identidad taxonómica. Esta parte del trabajo será referida con más detalle más adelante .

d) Considerando que el interés primordial de la presente investigación, es sustituir a *Serratia marcescens* como microorganismo biodegradador de subproductos proteín-quitinosos por ser un patógeno oportunista, no obstante su elevada eficiencia , es conveniente considerar los posibles riesgos que se tienen al manejar cepas del género *Bacillus*. Al respecto el Manual Bergey's de Bacteriología Sistemática, considera 34 especies para dicho género, de las cuales solo *B. anthracis* tiene interés veterinario por producir el antrax, y *B. cereus* puede originar intoxicaciones alimentarias si es consumido en forma masiva por individuos inmunodeprimidos. Todo ello permite concluir que el género *Bacillus* es hasta el momento un grupo microbiano de poca significación patogénica. Los microorganismos incluidos en el presente caso, son cepas de poca o ninguna significación patogénica y sanitaria.

e) Cabe señalar finalmente, que en el presente estudio se incluyen 100 cepas cuya procedencia se explica en la tabla 1. De las 100 cepas consignadas en la tabla 1, se destaca que 68 de ellas procedieron del Depto. de Biotecnología-Bioingeniería del CINVESTAV-Zacatenco-IPN, 8 lo fueron de la UPIBI-IPN; 6 de los LANFL, y 13 del LEM de la ENCB. Además se incluyeron seis cepas no correspondientes al género

*Bacillus* que fueron : *Mycobacterium asteroides*; *M. plei*; *Streptomyces kanamyceticus* ATCC 121853 y ATCC 21252 ; *Streptomyces griseus* y *Streptomyces roseochromogenus*. Todas ellas productoras de antibióticos y donadas por los LANFI , y por ello se consideró importante su ensayo . Como cepa de referencia por su alta capacidad secretora de quitinasas se incluyó a *Serratia marcescens WF*, procedente del LEM de la ENCB, donde se realizó la mayor parte de la presente investigación.

**TABLA 1. COLECCION MICROBIANA UTILIZADA EN EL PRESENTE ESTUDIO PARA ESTABLECER SU CAPACIDAD QUITINOLITICA POR TECNICAS DE PARCHADO EN PLACA.**

CEPAS CORRESPONDIENTES AL GENERO <i>Bacillus</i>			
INSTITUCION DONANTE	CEPAS PROPORCIONADAS	CLAVE UTILIZADA O IDENTIDAD TAXONOMICA	COMENTARIOS
Depto. de Biotecnología Bioingeniería del CINVESTAV-Zacateco	68	Se numeraron del 1 al 68	Se trabajaron como <i>Bacillus sp</i> en la propia institución.
Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI) del I.P.N.	8	GM-2 GM-3 GM-6 GM-7 GM-8 GM-9 GM-11	Todas las cepas eran <i>Bacillus sp</i> aisladas en el UPIBI. Se trabajaron con la clave del donador
Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial (LANFI)	6	<i>Bacillus sp</i> <i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> (2 cepas) <i>B. thuringiensis</i> <i>B. polymyxa</i>	Se conservaron y estudiaron con la clave del donador.
Laboratorio de Enzimas Microbianas de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas	13	<i>B. thuringiensis</i> (13 cepas)	Entre las cepas estudiadas se encontraban Bt-149 y Bt-47, escogidas en trabajos previos.

**CEPAS CORRESPONDIENTES A OTROS GENEROS**

Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial (LANFI)	6	<i>Mycobacterium plei</i> <i>Mycobacterium asteroides</i> <i>Streptomyces kanamyceticus</i> ATCC 121853 <i>St. kanamyceticus</i> ATCC 21252 <i>St. griseus</i> <i>St. roseochromogenus</i>	Se conservaron y estudiaron con la clave del donador.
Laboratorio de Enzimas Microbianas de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas	1	<i>S. marcescens</i> WF	<i>S. marcescens</i> es cepa de referencia por su elevada capacidad quitinolítica



### **3.2 CAPACIDAD PRODUCTORA DE QUITINASAS DEL GRUPO DE 68 CEPAS DEL GENERO *Bacillus*, FACILITADAS POR EL DEPTO. DE BIOTECNOLOGIA- BIOINGENIERIA DEL CINVESTAV-ZACATENCO.**

Como fue ya indicado, la reglamentación de esa institución impide la salida de cepas, si la solicitud es por un gran número de ellas . En nuestro caso fue solicitada la donación de las 68 cepas del género *Bacillus* que posee su colección , y por lo mismo se nos indicó que esto era imposible, pero a cambio ofrecieron proporcionarnos dicha colección, si los estudios se realizaban en sus propias instalaciones, llevando nuestros propios materiales y reactivos. Al final deberíamos hacer un reporte lo más amplio posible, y en base al mismo justificar la solicitud de sólo algunas de las cepas más promisorias.

Considerando que ésto era una oportunidad única para estudiar dicho cepario, se decidió no limitar la investigación a solo el caso de las quitinasas, que era nuestro objetivo principal, y se incluyeron otras enzimas como : nucleasas y esterases.

**3.2.1 ACTIVIDAD EXTRACELULAR DE NUCLEASAS.** Sería mejor referirse a esta actividad como DNasas , dado que el medio empleado contenía DNA. Esta enzima puede visualizarse si se preparan cajas conteniendo el medio basal adicionado de DNA sigma al 0.03 % , verde de metilo al 0.05 % y agar al 2.3 %. Las placas presentan un color verde uniforme debido a la formación de un complejo DNA-verde de metilo. Cuando un microorganismo se desarrolla sobre las placas y secreta nucleasas, aparece en torno a las colonias un halo de color rosa debido a que las propiedades espectrofotométricas del complejo DNA integro-verde de metilo son diferentes a las del complejo DNA hidrolizado- verde de metilo . La medición de los halos se realizó a las 24 h. Los resultados se valoraron en una escala arbitraria, donde cero indica ausencia total de halo; una cruz incluye halos de 1 a 3 mm; dos cruces de 4 a 6 mm; tres cruces halos de 7 a 9 mm y cuatro cruces halos mayores a 10 mm.

En la figura 2 A puede verse que sólo 2 cepas mostraron halos de 4 cruces, 7 presentaron halos de 3 cruces; en 14 sus halos correspondieron a 2 cruces y 6 cepas a una cruz. En suma el 37% de la colección estudiada presentó actividad de nucleasa positiva, y sólo dos cepas fueron altamente nucleolíticas.

**3.2.2 ACTIVIDAD DE ESTERASA.** Esta enzima se evaluó sembrando los microorganismos sobre placas conteniendo un medio sintético con tween 80 al 0.4 % y cloruro de calcio al 0.15% . La esterasa hidroliza al detergente liberando un ácido orgánico que forma la sal cálcica correspondiente, que se aprecia como halos de precipitación opacos, particulados y grumosos, frecuentemente con aspecto de anillos concentricos. Para valorar esta enzima se adoptó una escala arbitraria que partió de cero cuando no se observó halo de precipitación; una cruz para halos de 2 a 4 mm; dos cruces si correspondió a 5 - 7 mm y tres cruces para halos de 10 mm o mayores.

En la figura 2 B se observa que 12 cepas presentaron halos de 4 cruces, 7 mostraron halos de 3 cruces, en 3 cepas su halo correspondió a 2 cruces y 4 formaron un halo de una cruz. Por lo tanto , de las 68 cepas estudiadas el 17 % presentó una alta actividad esterásica , 14 % fue moderadamente esterolítica y el 5 % mostró una actividad modesta . El resto de la colección no presentó esta actividad.

Volviendo al caso de las quitinasas, y como no fue posible obtener evidencia fotográfica de esta parte del trabajo, conviene recordar que cada una de las cepas se sembró sobre un medio sólido conteniendo quitina coloidal, de modo que al desarrollarse las colonias microbianas, las quitinasas eran secretadas al medio circundante y la quitina presente era digerida y desaparecía, formándose un halo transparente cuyas dimensiones eran proporcionales a la cantidad de enzima secretada. Para su evaluación se adoptó una escala arbitraria en donde cero significaba crecimiento con ausencia total de halos, una, dos y tres cruces indicaban respectivamente halos de dos, tres y cuatro mm de diámetro.

Los experimentos se repitieron por triplicado para obtener un promedio más confiable, con el cual se obtuvieron los datos consignados en las figuras 3A, 3B y 3C que muestran el comportamiento de las cepas a diferentes tiempos, a una temperatura de incubación de 29°C. A las 24 h sólo 4 cepas presentaron escasa actividad, la cual fue aumentando conforme se extendió el tiempo de incubación. Las graficas muestran también algunas cepas que no presentaron actividad a las 24 h, sin embargo si lo hicieron a partir de las 48 h de incubación.

En algunas cepas al incrementar la temperatura de incubación aumentó la actividad quitinolítica; como ejemplo de esto se muestran las figuras 4A , 4B y 4C, donde se observa el comportamiento de las cepas a las 24, 48 y 72 h de incubación a 37 C.

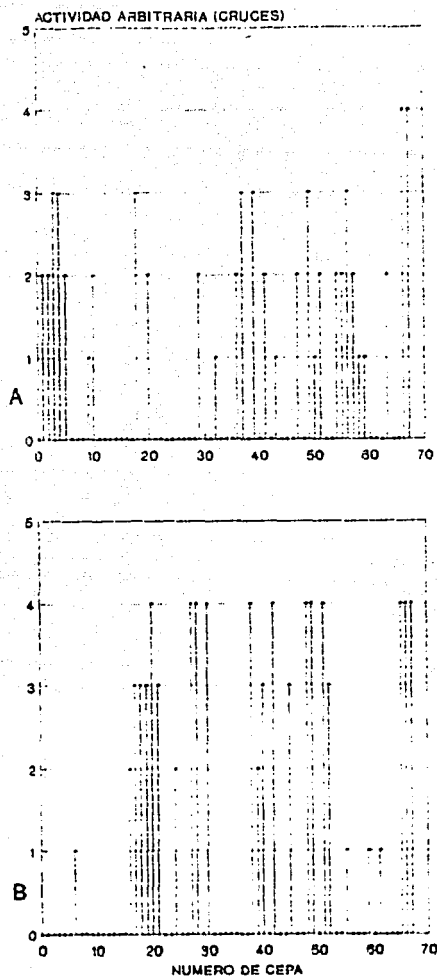


Fig. 2. En A se muestra el perfil de actividad extracelular de nucleasas en 68 cepas microbianas del género *Bacillus*. En la fig. B se observa la actividad esterásica de las mismas cepas. El ensayo se realizó en placa y se basa en la medición de los halos de hidrólisis de los sustratos específicos. Las lecturas se tomaron a las 24 h.

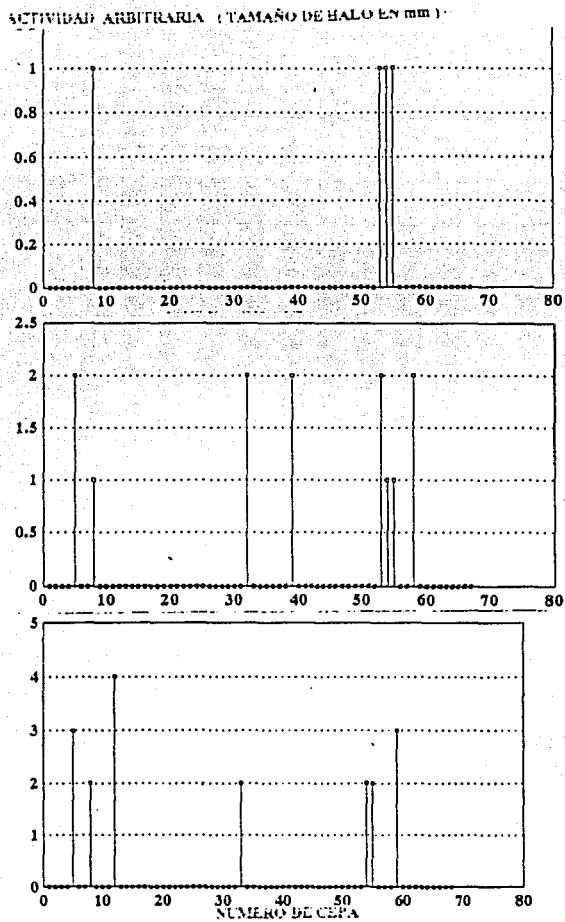


Fig.3 Actividad quitinolítica de 68 cepas microbianas del género *Bacillus*, proporcionadas por el CINVESTAV-Zacatenco. El ensayo se realizó en placas y se basa en la medición del halo de hidrólisis de la quitina coloidal, añadida a un medio salino solidificado con agar; las lecturas se tomaron a las 24 (A), 48 (B) Y 72 h (C).

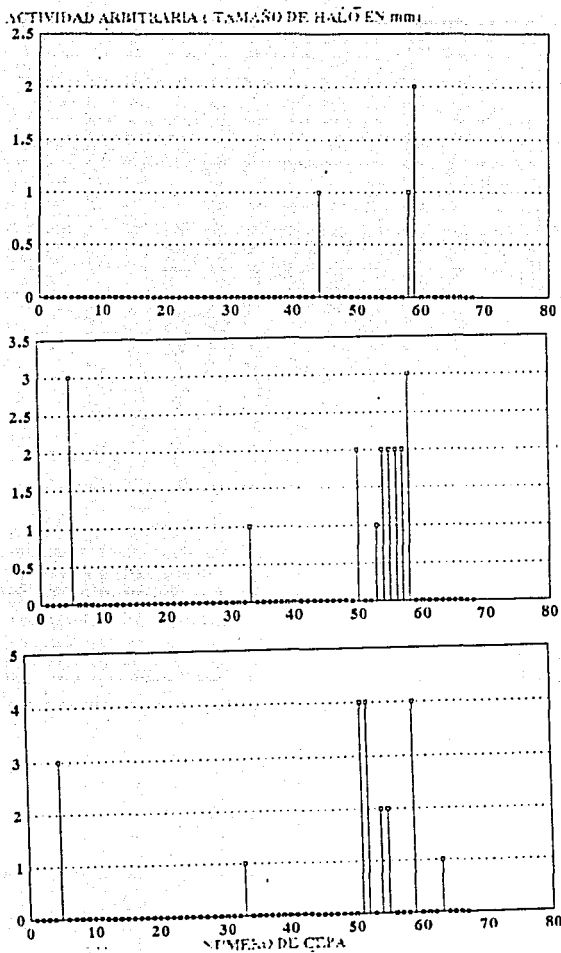


Fig.4 Actividad quitinolítica de 68 cepas de *Bacillus sp.*, evaluada en placas con quitina coloidal a las 24 (A), 48 (B) y 72 h (C) de incubación a 37 °C.

Los resultados descritos se resumen en la tabla 2, en la que se concentran sólo los datos obtenidos con las cepas quitinasa-positivas, que fueron 15 de un total de 68 ensayadas. Se encontró que la temperatura de incubación modificaba el perfil de secreción, de manera que a 29°C las cepas más quitinolíticas fueron las 5, 12 y 59; en menor proporción se mostraron eficientes las cepas 8, 33, 52 y 55. A 37° C las cepas más efectivas fueron las 5, 51, 52 y 59.

Como puede verse las cepas más interesantes por secretar altas cantidades de quitinasa fueron a fin de cuentas la 5 y la 59, y en menor grado la 54 y la 55. Como puede apreciarse en la figura 5 que representa en forma integrada los resultados obtenidos a 29 y 37°C a los tres tiempos de lectura utilizados.

Cabría señalar ahora que los datos descritos fueron la base para hacer un amplio reporte para solicitar del CINVESTAV-Zacatenco, la donación de las 15 cepas más interesantes por haber mostrado mayor actividad quitinolítica (ver tabla 2), de las cuales nos fueron proporcionadas sólo 7, sin incluir la cepa " 59 " que era la más prometedora. Más detalles al respecto se dan en el siguiente rubro.

**TABLA 2. EVALUACION<sup>1</sup> DE LA ACTIVIDAD QUITINOLITICA DEL CEPARIO<sup>2</sup> DEL GENERO *Bacillus* DEL DEPTO DE BIOTECNOLOGIA Y BIOINGENIERIA DEL CINVESTAV ZACATENCO.**

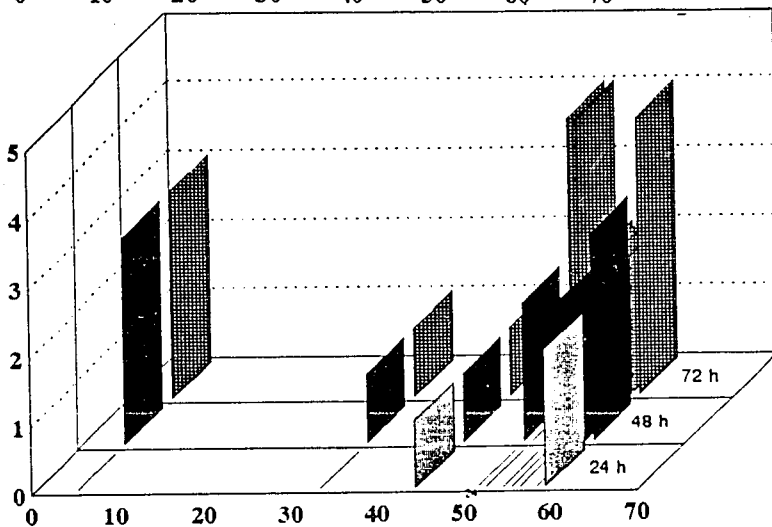
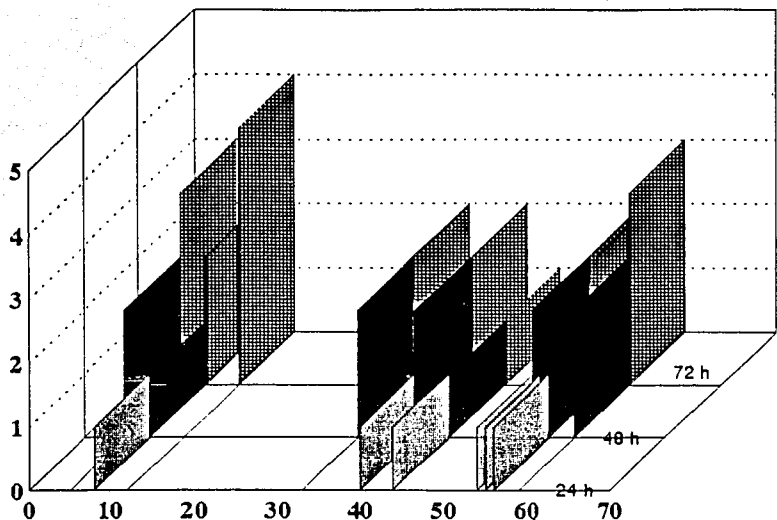
No. DE CEPA	A 28 ° C			A 37 ° C		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
5		++	+++		+++	+++
8	+	+	++			
12			++++			
33		++	++		+	+
40	+	++	++			
44	+	+	+	+	+	+
51					+++	++++
52						++++
54	+	++	++		+	++
55	+	+	++		++	++
56	+	+	+		++	++
57					++	++
58				+	++	++
59		++	+++	++	+++	++++
63						+
<i>S. m. Wf</i>	++	+++	++++	++	+++	++++

<sup>1</sup> La actividad se determinó en placas conteniendo un medio basal y quitina coloidal, mediante la medición de los halos de hidrólisis, de aspecto transparente.

<sup>2</sup> El cepario contaba con 68 microorganismos del género *Bacillus*. Las cepas fueron designadas con un número progresivo, puesto que se desconocía la especie. Los números ausentes corresponden a cepas negativas o con muy bajos niveles de actividad y por eso no están consignadas.



## ACTIVIDAD ARBITRARIA (CRUCES)



NUMERO DE CEPA

Fig. 5. En A se resumen los resultados obtenidos al evaluar la actividad quitinolítica de 68 cepas de *Bacillus sp.* procedentes del cepario del CINVESTAV-ZACATENCO a 24, 48 y 72 h de incubación a 29 °C. En B se muestran los datos obtenidos a 37 °C.

### 3.3 CAPACIDAD PRODUCTORA DE QUITINASAS DE LAS COLECCIONES DE CEPAS DONADAS.

Como se explicó anteriormente, el estudio de la colección de las 68 cepas del género *Bacillus* del CINVESTAV-Zacatenco se realizó dentro de esa institución, debido a las políticas de dicho lugar. Después de realizar los experimentos necesarios se concluyó que sólo 15 de ellas presentaban actividad quitinolítica y se pidió que nos fueran donadas. De ellas nos proporcionaron 7 que correspondieron a las cepas : 5, 12, 51, 52, 54, 55 y 58.

Cumplida esta etapa fue posible finalmente reunir las cepas procedentes de las diferentes instituciones, y ensayarlas en nuestro laboratorio. Para ello cada una de las cepas se sembró sobre un medio sólido conteniendo quitina coloidal, y como en los experimentos realizados en el CINVESTAV-Zacatenco se observó que la temperatura de incubación modificaba el comportamiento de las cepas, se decidió realizar experimentos tanto a 29 °C como a 37 °C. Los resultados obtenidos mostraron que sólo las cepas del CINVESTAV-Zacatenco tenían una actividad significativa de quitinasa.

Para ilustrar lo anterior se anexa la fig.6, en donde se observa que a 29 °C las cepas 5 y 51, correspondientes a *B.licheniformis* presentaron los halos de hidrólisis más grandes, aunque estos son pequeños en comparación con el que formó la cepa testigo.

Las cepas donadas por UPIBI presentaron una actividad casi despreciable en las dos diferentes condiciones a las que se trabajó. Ninguna de las cepas de LANFI resultó quitinasa positiva. De las cepas pertenecientes al LEM (todas *B.thuringiensis*), la única que presentó una moderada actividad quitinolítica a 37 °C fue Bt-149.

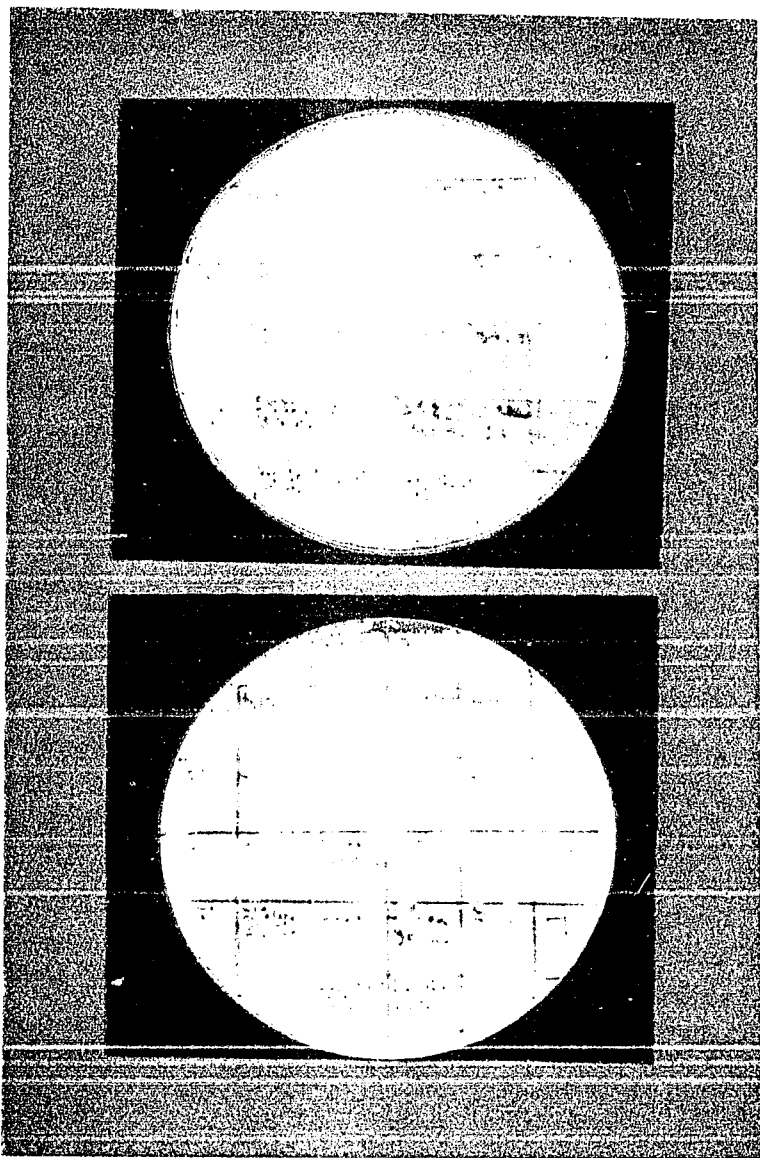


Fig.6 Actividad quimiotáctica de las zonas periféricas del medio por recomendadas por diferentes instituciones para la colonización de este medio. El ensayo se realizó en placas de agar basadas en la medición del halo de hidrólisis de la amilasa (estándar: maní) con medio "huevo" (contaminado con agua) de maní a 37 °C (A) y 29 °C (B).



Con objeto de someter a las diferentes cepas a una presión mayor, y obligarlas a secretar quitinasa, se realizó un nuevo experimento en donde las cepas se sembraron sobre un medio sólido que contenía quitina coloidal desproteïnizada con la finalidad de evitar que las bacterias utilizaran las proteínas presentes en el sustrato nativo. También se incubó a diferentes temperaturas como en los experimentos anteriores. En la fig. 7 se observa que bajo estas condiciones algunas cepas respondieron favorablemente, por ejemplo la cepa 54 (especie desconocida) cuando se inoculó en quitina nativa coloidal no presentó halo; en cambio en quitina coloidal desproteïnizada a 29 °C formó un halo pequeño que resultó más ostensible al incubar a 37 °C.

Por su parte *B. licheniformis* (cepas 5 y 51) también presentó un incremento en el tamaño de su halo de hidrólisis, sobre todo cuando fue incubado a 37 °C.

De todo lo anterior se desprende que encontrar una cepa silvestre del género *Bacillus* hiperproductora de quitinasas es un evento poco frecuente. No obstante, estudios previos mostraron que mediante manipulación genética, usando técnicas de mutación, pueden obtenerse cepas de *B. thuringiensis* hiperproductoras de quitinasas (16). Esta posibilidad resulta interesante ya que mediante este recurso pudieran obtenerse cepas con alta producción de quitinasas y proteasas, las cuales aparte de biodegradar eficientemente los desechos proteína-quitinosos podrían ser más efectivas en el control biológico de insectos, pues atacarían a los mismos "por fuera" mediante mecanismos enzimáticos que afectarían su cutícula, y por "dentro" mediante la acción de sus cristales intracelulares que tienen propiedades entomotoxigénicas (24, 25). En función de estas suposiciones se hicieron las experiencias que se indican en el siguiente inciso.

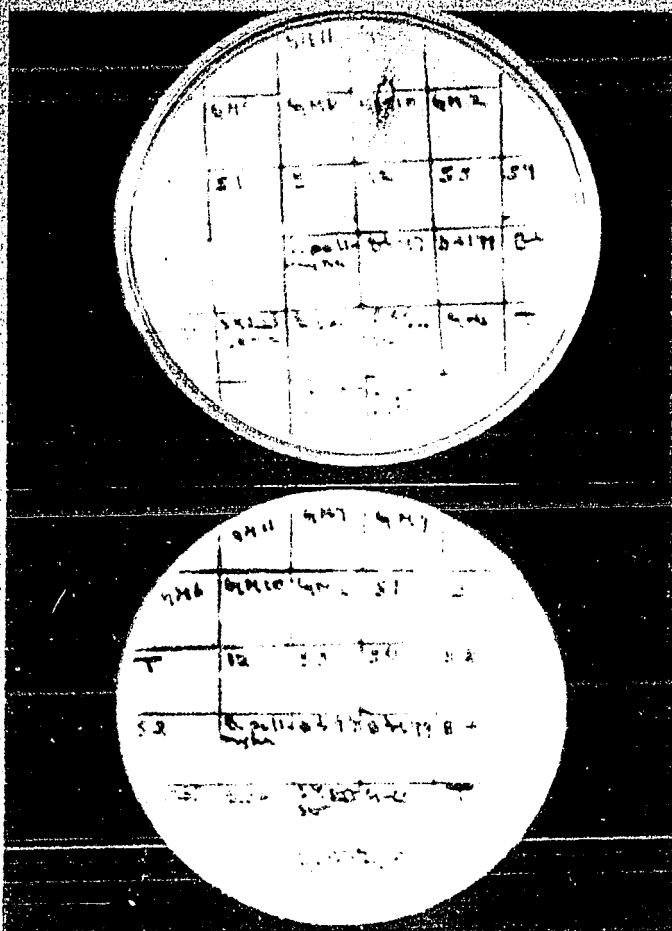


Fig.7 Actividad quórum sensing de las cepas microbianas indicadas en este estudio. El ensayo se realizó en placas y se basa en la medición del halo de difusión de una cantidad desproteínizada, añadida a un medio salino solidificado con agar (concentración 2.0%).

### 3.4 MUTACION CON LUZ ULTRAVIOLETA

Como resultado de los experimentos anteriores se seleccionaron 2 cepas de *B.licheniformis* (5 y 51), con la intención de mejorar la producción de quitinasa se sometieron a una mutación con luz UV. Como es usual en estos casos, fue necesario hacer la curva de letalidad (o de sobrevivencia) de los microorganismos en estudio, con objeto de establecer el tiempo de irradiación más conveniente. En la figura 8 se muestra la curva de *B.thuringiensis* realizada en nuestro laboratorio. Se puede observar que el trazo es lineal, indicando una proporcionalidad entre el tiempo de irradiación y la disminución en el número de células viables. También puede apreciarse que después de 120 seg de irradiación, la población sobreviviente es apenas el 1% de la que existía al inicio, es decir en este tiempo la concentración celular se redujo de  $10^7$  a  $10^5$  UFC/ML. Tan drástica es la disminución en la población que se supone que las sobrevivientes han sufrido algún tipo de cambio genético.

Para los experimentos realizados en esta tesis, las suspensiones celulares de las cepas 5 y 51 se irradiaron durante 120 seg, para asegurar que las sobrevivientes tengan algún tipo de mutación. Estas se sometieron después a un enriquecimiento de la población productora de quitinasas, inoculando 0.1 ml de las bacterias mutadas en un medio de cultivo conteniendo quitina coloidal desproteínizada al 4%, suspendida en 25 ml de la solución resultante después de esterilizar quitina comercial al 4% en medio basal, y se incubó durante 96 h a 29 °C con agitación de 180 rpm. Luego se sembró por dilución en placas de quitina coloidal y desproteínizada; con la finalidad de seleccionar únicamente a la población mutante capaz de producir quitinasas.

No se obtuvieron resultados favorables, ya que no se observó crecimiento de las bacterias; probablemente debido a que el tiempo de irradiación con la luz UV fue demasiado largo y pudieron afectarse diversas vías metabólicas, ya que la curva de letalidad aplicada se realizó con *B.thuringiensis* (fig.8).

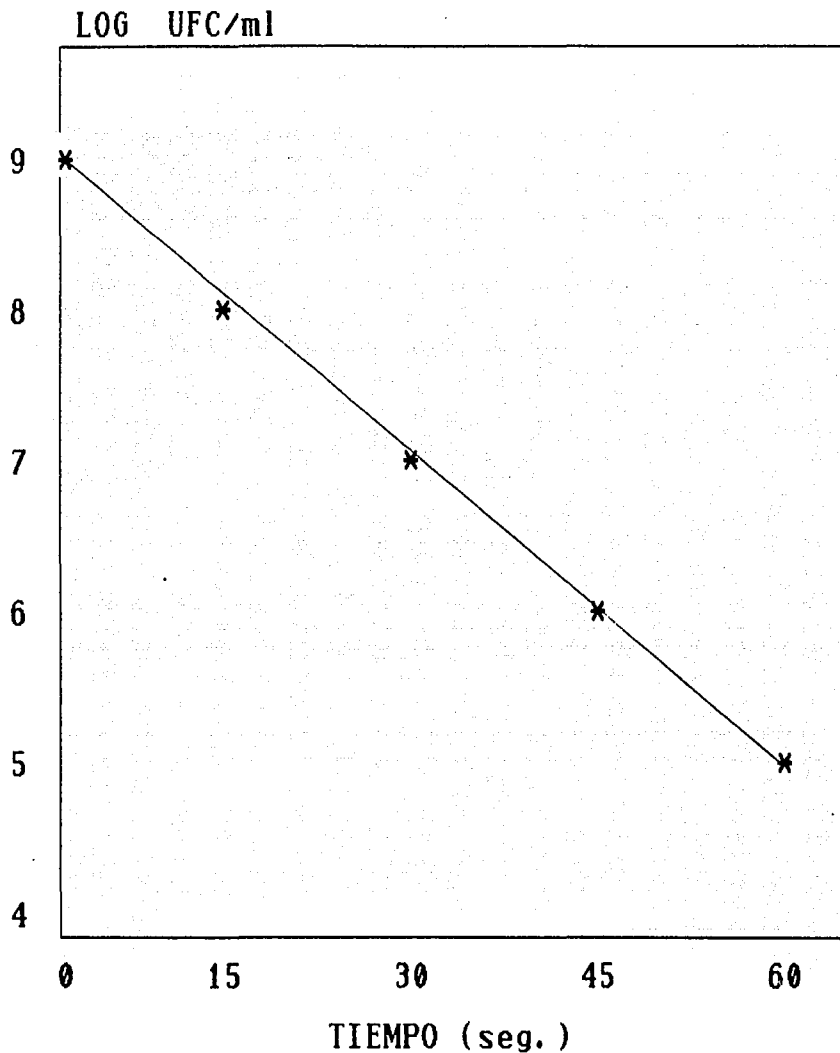


Fig. 8. Efecto letal de la luz ultravioleta sobre una suspensión de *B.thuringiensis* Bt-47, cepa silvestre. La curva se obtuvo luego de que una delgada capa de la muestra, en condiciones de agitación orbital suave, se expuso a la acción de una lámpara germicida G.E. de 15 w a una distancia de 40 cm.



### 3.5 MUTACION DE *B. licheniformis* CON NITROSOGUANIDINA

Como en el caso de la luz UV, cuando se va a utilizar cualquier mutágeno, es necesario averiguar previamente la curva de sobrevivencia frente al mutágeno escogido, y bajo las condiciones específicas que van a utilizarse. La curva de letalidad de la NTG que se utilizó se muestra en la fig. 9, donde se observa que el efecto letal se manifiesta a partir de los 15 min de exposición; después ocurre una paulatina caída de la viabilidad, de manera que al cabo de 60 min se observa también una disminución de la población hasta el 1% en relación a la inicial.

Como se hizo para el caso de la luz UV, también en éste se sometió a las bacterias mutadas al enriquecimiento de la población productora de quitinasas para favorecer su selección y proliferación. Después se sembró por dilución en placas de quitina coloidal desproteïnizada y se escogieron al azar 100 de las colonias crecidas después de incubar durante 96 h a 29 °C, para transferirlas por picadura sobre placas conteniendo quitina coloidal desproteïnizada. En la figura 10 se observan cepas mutantes que fueron inoculadas en un medio de quitina coloidal desproteïnizada; sólo 4 de ellas presentaron halo de hidrólisis, pero éste fue demasiado pequeño en comparación al halo de la cepa testigo *S. marcescens* WF.

Resultó interesante realizar una comparación de las bacterias cuando eran inoculadas en un medio de quitina coloidal y cuando se inoculaban en un medio de quitina coloidal desproteïnizada, después del enriquecimiento de la población productora de quitinasas. En la fig. 11 se muestran mutantes inoculadas en un medio de quitina coloidal, en donde se observan colonias con multiplicidad en la morfología colonial con forma y bordes irregulares, de las cuales sólo 3 colonias correspondientes a la cepa 5 presentaron halo de hidrólisis. En cambio las colonias provenientes de cultivos en un medio con quitina desproteïnizada presentaron un crecimiento regular y uniforme.

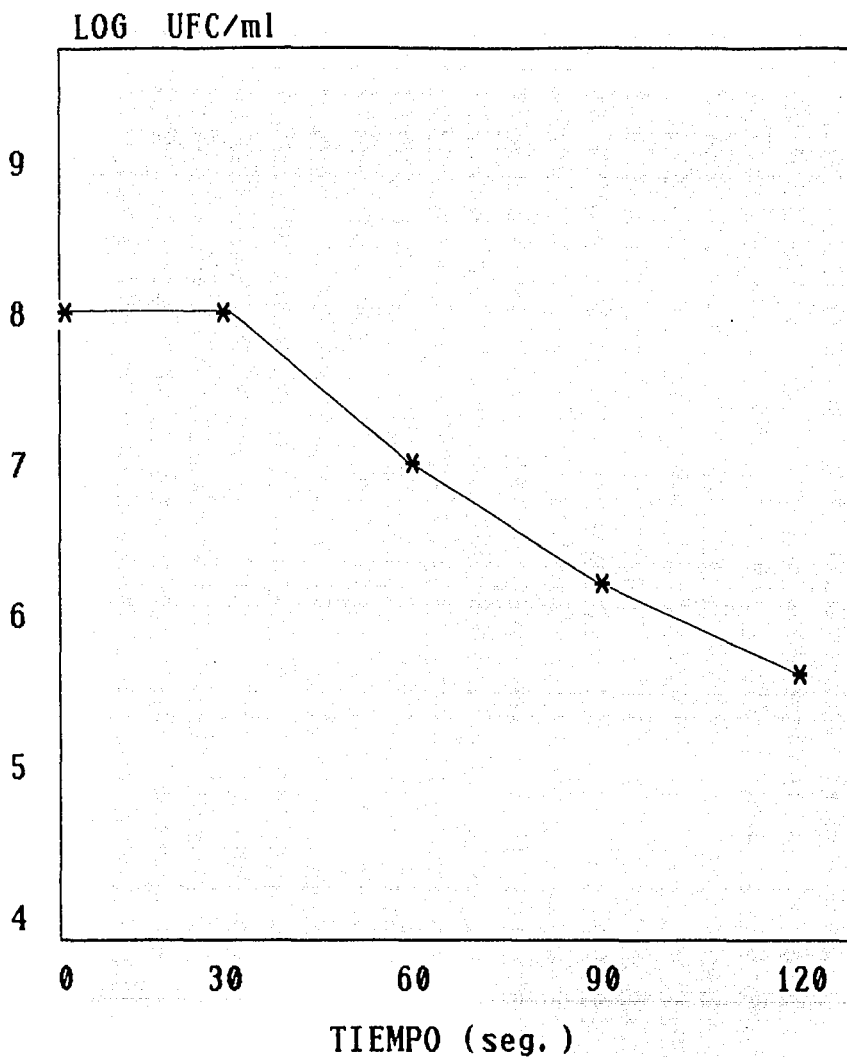
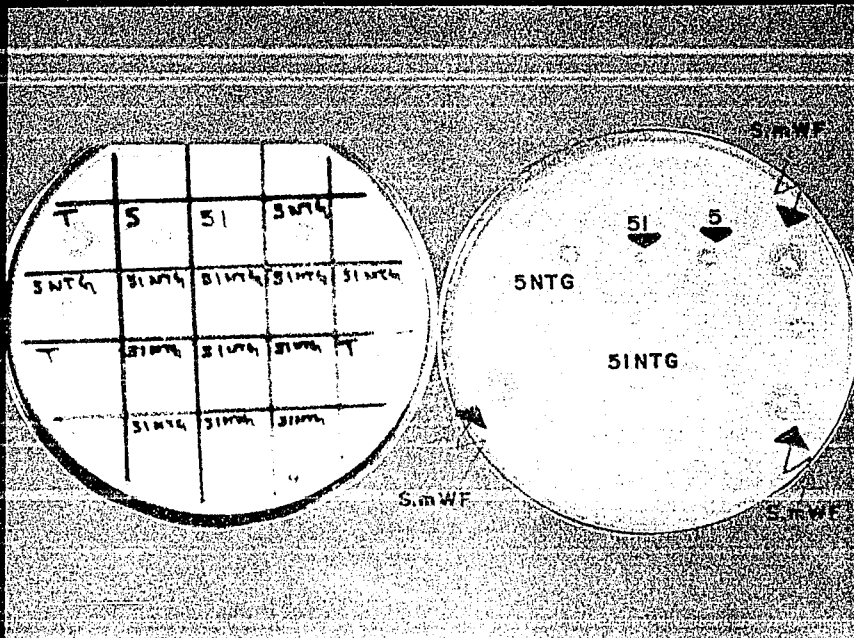


Fig. 9. Curva de Supervivencia de una cepa silvestre de *B.thuringiensis* al ser tratada con una solución de NTG a una concentración de 10 mg/ml



1. The first diagram shows a grid of letters and numbers, likely representing a sequence of operations or a code. The letters T, S, 51, and 5NTG are arranged in a grid pattern.

2. The second diagram shows a circle with several markings, including the letters 51, 5, and 5NTG, and the label S.m WF. The markings are arranged in a circular pattern, possibly representing a sequence of operations or a code.

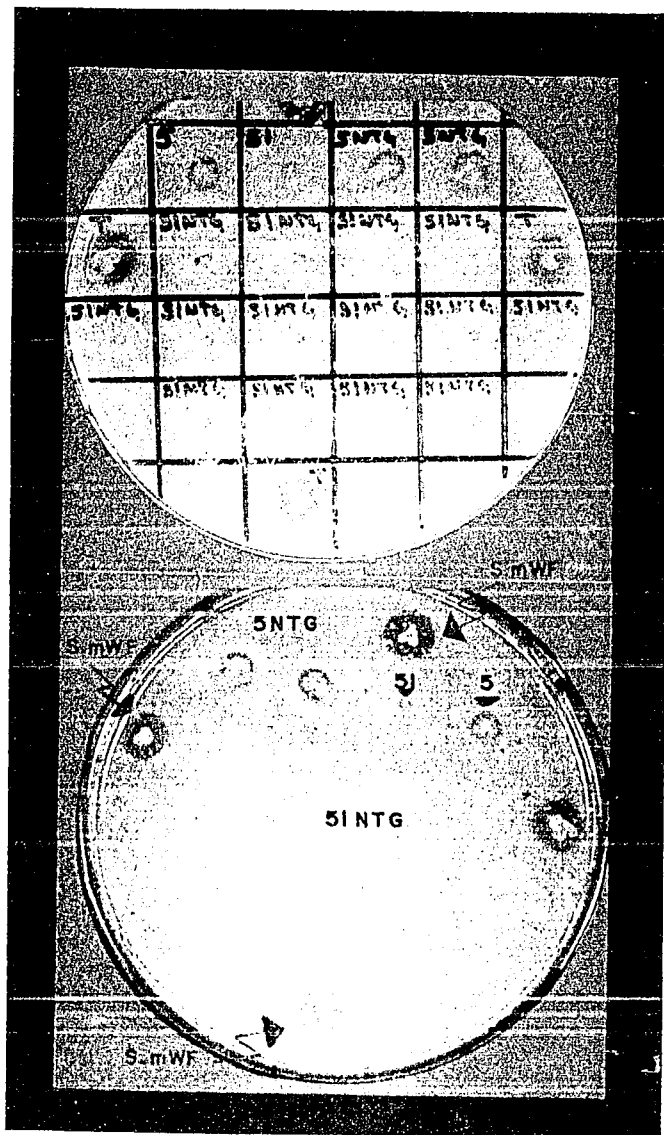


Fig. 11 Actividad de quinnasa en las mutantes obtenidas después de ser tratadas con NTG. El ensayo se realizó en placas y se basa en la medición del halo de hidrólisis de la quinta coloidal, añadida a un medio salino solidificado con agar. Se observan colonias con forma y borde irregulares (anverso y reverso de la placa).

Conforme se fue ganando en experiencia, se observó el efecto que ejerce el tamaño de partícula de la quitina en la formación de los halos de hidrólisis; ya que al tener partículas cada vez más finas de quitina se favorece su degradación por quitinasas, puesto que es más fácil para las bacterias digerir las partículas insolubles del polisacárido.

Para ilustrar mejor el fenómeno descrito se anexa la figura 12, donde se observan placas que contienen un medio de quitina coloidal desproteïnizada, en donde fueron inoculadas cepas mutantes e incubadas a 29°C. Las partículas finas de quitina permitieron visualizar perfectamente los halos de hidrólisis formados; se observa que la mutante 5 NTG formó un halo de muy buen tamaño, mientras que la mutante 51 NTG formó un halo muy pequeño en comparación con la cepa testigo.

El experimento se realizó por duplicado, pero incubando a 37 °C y se observó que la cepa 5 NTG continuaba formando un halo más grande que el de la cepa 51 NTG ; sin embargo la mutante 5 NTG formó un halo mayor que cuando se incubó a 29 °C . Para ilustrar lo anterior se anexa la fig. 13 .

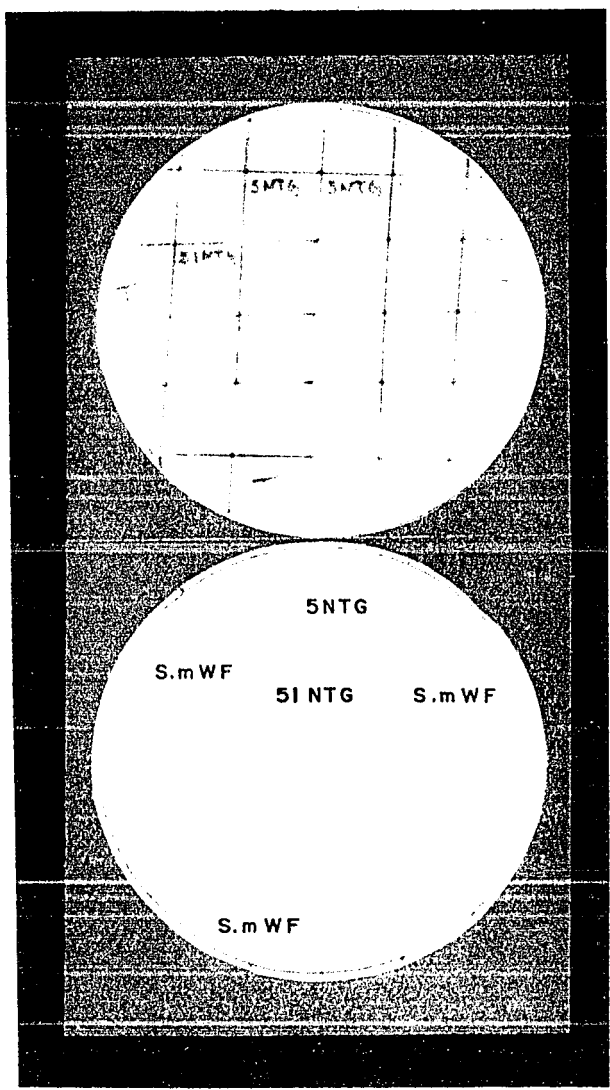


Fig 12 Mutantes inoculadas en un medio de quitina coloidal des-proteinizada añadida a un medio salino solidificado, se incubó a 29 °C. Se observa el efecto que ejerce el tamaño de partícula de la quitina en la visualización del halo de hidrólisis (anverso y reverso de la placa).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

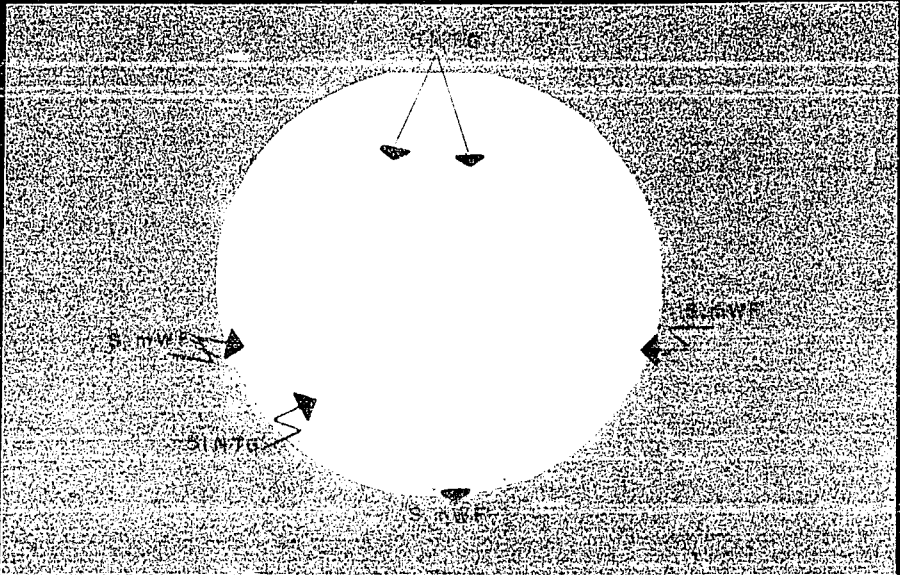


Fig 13 Mutantes inoculadas en un medio de quitina coloidal desproteínizada añadida a un medio salino solidificado, se incubó a 37 °C. Se observa que el fino tamaño de partícula de la quitina coloidal y la temperatura de 37 °C; favorecieron al aumento del tamaño del halo de hidrólisis (anverso).

Los resultados anteriores permiten decir que *B.licheniformis* resultó la bacteria más quitinolítica entre todas las cepas silvestres ensayadas. Después de someterla a mutación no se observó un aumento significativo en su actividad quitinolítica. Sin embargo, las cepas obtenidas ofrecen características interesantes pues crecen y degradan fácilmente a la quitina en un medio simple conteniendo quitina coloidal y aún en un medio más selectivo conteniendo quitina desproteïnizada, siempre y cuando incubando a 37 °C , ya que está temperatura favoreció a la formación de halos de hidrólisis.

Cabría señalar que *B.licheniformis* se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente, particularmente en suelos. También se encuentra en alimentos como cereales, hierbas, cocoa y especies. Puede considerarse no patógeno y las autoridades de Estados Unidos, Europa y Japón han aprobado su uso industrial (23). Existen antecedentes por otra parte, que indican que han sido aisladas 4 quitinasas de *B.licheniformis*, éstas demostraron ser termoestables (24) y han sido usadas en la preparación de agentes antitumorales (25) .

En suma nuestros resultados permiten establecer que de las cepas estudiadas *B.licheniformis* podría sustituir a *S. marcescens*, en los procesos biotecnológicos avocados al aprovechamiento de materiales protein-quitinosos.

De acuerdo a la literatura consultada existen artículos de revisión sobre la producción de enzimas extracelulares en el género *Bacillus* (17), donde sólo se incluye a *B.circulans* como productor de quitinasas.

Fue realizado un estudio más específico sobre la presencia de quitinasas y quitobiasas en este mismo género (22), habiéndose demostrado que de 62 cepas que incluyen 29 taxoespecies, sólo *B.alvei* ATCC 6344, *B.chitinosporus* ATCC 19986, *B.lentus* NRRL B-369 y *B.pulvificiens* ATCC 13537 producen endoquitinasas.



Más aún en el Manual Bergey's al referirse a la taxonomía del género *Bacillus*, se señalan intentos aislados de incorporar ensayos de quitinasas como un criterio de identificación. Los intentos además de escasos, reportan resultados negativos en todos los casos.

## 4. CONCLUSIONES

Aún cuando el género *Bacillus* es importante, sobre todo a nivel industrial, dada la capacidad que presentan sus diferentes especies para producir enzimas hidrolíticas y un buen número de antibióticos, además de algunos aminoácidos, peptidos y proteínas; enzimas como las quitinasas no se han investigado extensivamente dentro de este género, y por tanto son pocos los reportes al respecto. En este orden de ideas cabe señalar que existen en México diversos grupos que trabajan con el género *Bacillus* y que colaboraron con la realización de este trabajo, donando diferentes colecciones de cepas del género *Bacillus* y 6 cepas pertenecientes a otros géneros. En este sentido los datos obtenidos en la presente tesis permiten concluir lo siguiente :

1.- En la selección primaria efectuada por técnicas de parchado en placas con quitina coloidal con la colección de 68 cepas de *Bacillus sp.*, se determinó que únicamente 15 cepas presentaron actividad quitinolítica. Los niveles de enzima variaban de acuerdo al tiempo y la temperatura de incubación. Aún cuando se hicieron los informes y tramites correspondientes, de las 15 cepas solicitadas sólo se donaron 7, que no incluyeron a las más quitinolíticas.

2.- Adicionalmente se encontró que el 37% de la colección estudiada en el CINVESTAV-Zacatenco presentó actividad de nucleasa positiva, pero sólo dos cepas fueron altamente nucleolíticas.

3.- En cuanto a la actividad de esterasa de dicha colección, el 17% presentó una alta actividad esterásica, 14% fue moderadamente esterolítica y el 5% mostró una actividad modesta.

4.- Las colecciones donadas por UPIBI, LANFI y el LEM no mostraron actividad quitinolítica interesante.

5.- En las cepas correspondientes a otros géneros no se encontró actividad quitinolítica, por tal motivo se decidió descartarlas del estudio.

6.- De las 7 cepas donadas por el CINVESTAV-Zacatenco se seleccionaron dos (5 y 51) que correspondieron a *B.licheniformis*, como cepas promisorias con actividad quitinolítica semejante a *S.marcescens* WF, las cuales se sometieron a experimentos de mutación y fueron conservadas en un medio selectivo a base de quitina desproteïnizada.

7.- Las mutantes obtenidas no revirtieron al efectuar la conservación en un medio pobre en proteína.

8.- La mutación no aumento significativamente la actividad quitinolítica de *B.licheniformis*.

9.- De acuerdo a los resultados obtenidos se puede proponer a *B.licheniformis* como posible cepa que pueda sustituir a *S. marcescens*. De acuerdo a la bibliografía consultada *B.licheniformis* es un organismo inocuo, por lo tanto se puede someter a usos biotecnológicos, puesto que las autoridades de Europa, Estados Unidos y Japón han aprobado su uso industrial .

## 5. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aguayo Rousell, B. 1975. Estudios preliminares sobre la producción de quitinasa por *Serratia marcescens*, Tesis profesional, ENCB .
- 2.- Mejía López, A. 1990. Fermentación del carapacho de camarón suspendido en agua de la llave, dirigida a la producción de quitinasas y al estudio del sólido remanente. Tesis Profesional. ENCB-IPN .
- 3.- Albores Medina, A. 1971. Obtención con posibles fines comerciales de la proteasa extracelular de *Serratia marcescens*. Tesis Profesional, ENCB.
- 4.- Venegas Guzmán, R. M. 1978. Un enfoque sobre la obtención con fines comerciales de la proteasa de *S. marcescens* . Tesis Profesional . ENCB - IPN.
- 5.- Moreira Avila, G.N. 1979. Aprovechamiento por vía microbiana de materiales quitinosos utilizando *Serratia marcescens* . Tesis Profesional, ENCB .
- 6.- Gutiérrez García, A. 1989. Producción de la proteasa extracelular de *S. marcescens* mediante la fermentación de desechos quitinosos, su posible uso en la obtención de hidrolizados de carne de pescados de especies no grasosas. Tesis Profesional. ENCB-IPN.
- 7.- Rabadán López, A. 1991. Producción de proteasas por la fermentación de desechos quitinosos. Su posible uso en la obtención de hidrolizados de carne de pescados grasosos. Tesis Profesional. ENCB - IPN .
- 8.- Chávez Camarillo, G. y Cruz Camarillo, R. 1984. El sistema quitinolítico de *S. marcescens* Rev. Lat. Ame. Microbiol. 26: 203 - 215.
- 9.- Arredondo Martínez, D. 1989. Nuevos aportes a la purificación de la quitinasa y quitobiasa de *Serratia marcescens*. Tesis Profesional, ENCB.
- 10.- Camacho Velázquez, M. 1992. Separación de la N- acetil-D-glucosamina proveniente de la sacarificación enzimática *in vitro* de subproductos protein-quitinosos. Tesis Profesional, ENCB.
- 11.- Hernández Carmona, L.A. 1990. Producción de N-acetil-D-glucosamina por sacarificación enzimática de residuos quitinosos. Tesis profesional, ENCB,IPN .
- 12.- Perez Martínez, M.E. 1986. Selección de una levadura capaz de crecer en un hidrolizado enzimático de subproductos quitinosos ( caparazón de camarón). Tesis Profesional, ENCB.

- 13.- Segoviano Pinto, G. 1994. Producción de Levadura en sacarificados de quitina. XXV Congreso Nacional de Microbiología. Trabajo M-31. Ciudad Obregón, Son.
- 14.- Cody, R. M. 1987 Distribution of chitinolytic activity in *Bacillus* species - *Bacillus thuringiensis*, *B.alvei*, *B.laterosporus*, *B.coagulans*. Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 87:294 .
- 15.- Monreal, J y M. T. Reese. 1969.- The chitinase of *Serratia marcescens*. Can. J. Microbiol. 15 : 689 - 696
- 16.- Esquivel- Esquivel, I.E. 1993. Perfil enzimático extracelular de *B. thuringiensis*, y búsqueda de una cepa con niveles de quitinasa semejantes a los de *S. marcescens* Wf. Tesis Profesional. UNAM (Realizada en el LEM-ENCB).
- 17.- Priest, F. G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Bacteriol. Rev. 41 (3) : 711 -753
- 18.- Smirnoff, V. A. y J. Valero. 1977. Determination of chitinolytic activity of nine subspecies of *B.thuringiensis*. J.invert.Pathol. 30 : 265 - 266.
- 19.- Santo Segura, A. 1993. Síntesis y caracterización de las proteasas de *B.thuringiensis* (extracto crudo) secretadas durante la fermentación de subproductos protein-quitinosos. Tesis Profesional ENCB.
- 20.- Cruz Camarillo, R y M.C. García Ramos. 1968. Aislamiento y purificación de la proteasa extracelular de *Serratia marcescens*. Rev. Amer. Microbiol.Parasitol.10: 15-126.
- 21.- Barrios Sanchez, M.. 1982. Estudios bioquímicos con cepas de *Serratia marcescens* de origen clínico. Tesis Profesional. ENCB, IPN.
- 22.- Cody, R. M. 1989. Distribution of chitinase and chitobiase in *Bacillus*. Current Microbiology. 19 : 201-205.
- 23.- De Boer As, Priest F, Diderichsen B. 1994. On the industrial use of *B.licheniformis*. Applied Microbiology and Biotechnology. 40 : 595-598.
- 24.- Takayanagi T, Ajisaka K, Takiuchi Y, Shimahara K. 1991. Insolation and characterization of thermostables chitinases from *Bacillus licheniformis* X-7U. Biochimica et Biophysica Acta 3 : 404-410.
- 25.- Shimabara, Kenzo; Takiguchi, Yasuyuki; Ajisaka, Katsumi; Takayanagi, Tsutomu; Fujimoto, Hiroshi. Thermostable chitinase, its manufacture with *Bacillus licheniformis*, and its use for preparing anti-tumor agents. Patent. Meiji Milk Products Co.,Ltd.