



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

**DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRIA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

**“FENOTIPIFICACION DE CEPAS DE *Bacillus cereus*
AISLADAS DE GERMINADOS Y HORTALIZAS”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A D A P O R

Q.B.P. CLAUDIA MIRIAM PERALTA GONZALEZ

**COMITE TUTORIAL: DR. CARLOS VAZQUEZ SALINAS
DR. JOSE MARIANO GARCIA GARIBAY
M. en C. EDUARDO CASAS HERNANDEZ**

MEXICO, D. F.,

ENERO 2008

COMITÉ TUTORIAL

Director: Dr Carlos Vázquez Salinas

Departamento de Biotecnología

Area de Investigación de Alimentos

cvs@xanum.uam.mx

Asesor: Dr. José Mariano García Garibay

Departamento de Biotecnología

Area de Investigación de Alimentos

jmgg@xanum.uam.mx

Asesor: M. en C. Eduardo Casas Hernández

Departamento de Ciencias de la Salud

Area de Biología Celular

dido@xanum.uam.mx

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN

M. en C. Elsa Irma Quiñones Ramírez

Departamento de Microbiología

Laboratorio de Microbiología Sanitaria

equinon@encb.ipn.mx

Este trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) al posgrado de Biología Experimental con número de registro UAM-I: 309-0 CON CLAVE C/PFPN-2002-35-32.

Agradezco el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por los apoyos obtenidos, número de becario 153026/159537 durante el periodo comprendido de febrero de 2000 a enero de 2002.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada:

“Fenotipificación de cepas de *Bacillus cereus* aisladas de germinados y hortalizas” con fecha 27-Enero-2006

Presidente: Dr. José Mariano García Garibay

Secretaria: M. en C. Elsa Irma Quiñones Ramírez

Vocal: M. en C. Eduardo Casas Hernández

La ciencia manejada sin conciencia, produce la ruina del alma

Niceto Mata

La única elegancia que puede permitirse el escritor científico es la brevedad

G. Marañón

INDICE GENERAL

	Página
INDICE.	i
INDICE DE FIGURAS.	iii
INDICE DE CUADROS.	iv
RESUMEN.	v
ABSTRACT.	vi

Indice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Grupo de <i>B. cereus</i>	2
1.2. Antecedentes	3
1.3. <i>Bacillus cereus</i>	4
1.4. Factores de virulencia	6
1.5. Síndrome diarreico	7
1.6. <i>B. cereus</i> y sus toxinas diarreicas	7
1.7. Síndrome emético	10
1.8. Factor vacuolizante de <i>B. cereus</i>	11
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. OBJETIVO GENERAL	16
4. OBJETIVOS PARTICULARES	18
5. HIPÓTESIS	20
6. MATERIAL Y METODOS	22
6.1. Cepas bacterianas	23
6.2. Aislamiento de <i>B. cereus</i>	23
6.3. Identificación de <i>B. cereus</i>	24
6.4. Presencia de hemolisinas	24

6.5. Selección de cepas psicrotróficas de <i>B. cereus</i>	24
6.6. Identificación de las cepas productoras de la toxina emética	25
6.6.1. Obtención de la toxina emética	25
6.6.2. Vacuolización de las células HEP-2	25
7. RESULTADOS	27
7.1. Resultados de las pruebas bioquímicas	28
7.2. Aislamiento de cepas de <i>B. cereus</i> y <i>B. mycoides</i> a partir de germinados y hortalizas	29
7.3. Diferenciación de las especies de <i>B. cereus</i> y <i>B. mycoides</i>	30
7.4. Determinación de la producción de hemolisina	31
7.5. Selección de cepas psicrotróficas	32
7.6. Detección de las cepas productoras de la toxina emética	32
8. DISCUSIÓN	34
9. CONCLUSIONES	39
10. REFERENCIAS	42
11. APÉNDICE	50

INDICE DE FIGURAS

Figura No.		Pag.
1.	<i>B. cereus</i> observado por microscopía electrónica	5
2.	Estructura química del cerulido comparada con la de la valinomicina	13
3.	Crecimiento característico de <i>B. cereus</i> y <i>B. mycoides</i> .	31
4.	Hemólisis presentada por <i>B. cereus</i>	32
5.	Monocapa de células HEp-2 testigo.	32
6	Monocapa de células HEp-2 con vacuolización y destrucción debida a la toxina emética de <i>B. cereus</i>	33

INDICE DE CUADROS

Cuadro No.	Pag.
1. Resultado de las pruebas bioquímicas para <i>B. cereus</i>	28
2. Muestras positivas e intervalo de crecimiento de <i>B. cereus</i> en hortalizas	29
3. Muestras positivas e intervalo de crecimiento de <i>B. cereus</i> en germinados	30

RESUMEN

Las enfermedades diarreicas transmitidas por los alimentos revisten especial importancia por sus altas tasas de morbilidad y de mortalidad y las de etiología bacteriana ocupan el segundo lugar implicando a bacterias como *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Bacillus spp.* entre otros.

Las hortalizas y germinados pueden constituir un vehículo de esos microorganismos, produciendo toxiinfecciones como es el caso en particular de *B. cereus*, aunque este ha sido asociado con mayor frecuencia a platillos elaborados con arroz, en budín de vainilla, con carnes de cerdo, res, pollo, pescado, con mariscos, productos lácteos entre otros.

Se analizaron 300 muestras de hortalizas y 100 muestras de germinados mediante la técnica recomendada por la FDA para el aislamiento de *B. cereus* a partir de los alimentos, su identificación se hizo mediante pruebas bioquímicas.

De las 300 muestras de hortalizas el 10.3% fueron positivas para el aislamiento de *B. cereus* y de los 100 germinados el porcentaje obtenido fue de 18%, obteniendo así un total de 49 cepas y se encontró que, fueron capaces de crecer a 7°C. Por otro lado en el ensayo realizado para demostrar la presencia de hemolisinas se obtuvo que incluyendo las de *B. mycoides* fueron capaces de llevar a cabo β -hemólisis en eritrocitos de carnero.

Una de las cepas de *B. cereus* dio positiva para la prueba de vacuolización en la línea celular HEp-2 y un dato importante de esta cepa es que es incapaz de hidrolizar el almidón, característica encontrada principalmente en las cepas productoras de la toxina emética.

ABSTRACT

Propagation of diarrheic diseases through food consumption have a great importance because their high morbidity and mortality and those from bacterial aetiology produced for example by *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Bacillus spp.* are considered in second place.

Vegetables and germinated plants can represent a vehicle for dissemination of such microorganisms producing toxic infections as in the case of *B. cereus* although this strain has been associated mainly to consumption of rice, vanilla sauce, pork, chicken, fish and cattle meat, sea food and dairy products.

Three hundred samples of vegetables and one hundred samples of germinated plants were analysed by the technique recommended by FDA for their isolation of *B. cereus* from food, the identification was made by biochemical testing.

Results showed that from 300 samples of vegetables 16.3% were positive for isolation of *B. cereus* and from 100 samples of germinated plants 18% were positive and 49 strains were obtained, all these strains were capable to grow to 7°C. In the test by the production of hemolysin all the strains, include *B. mycoides*, gave a positive results.

One strain of *B. cereus* was capable to produce vacuolisation in HEp-2 cell cultures.

1. INTRODUCCION

1.1. GRUPO DE *B. cereus*

El grupo de *B. cereus* está comprendido por cuatro especies las cuales son *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* y *B. anthracis*. Recientemente se han descrito las especies de *B. pseudomycoides* (Nakamura, 1998) y *B. weihenstephanensis* comprendiendo así seis las especies que conforman dicho grupo (Lechner *et al*, 1998). Es posible diferenciar estas especies con base en algunos parámetros los cuales son considerados como únicos para cada especie.

Estos son la presencia de los plásmidos pXO1 de 181 kb y pXO2 de 93.5 kb que codifican para la toxina de *B. anthracis* (Makino *et al*. 1993), la producción de una toxina en forma de cristal por *B. thuringiensis*, la cual es usada como control biológico en la agricultura y que puede ser observada por microscopía (González *et al*, 1981; Kronstadt *et al*, 1983); *B. mycoides* y *B. pseudomycoides* se pueden diferenciar por su crecimiento rizoide en agar (Nakamura, 1998). Para diferenciar a la cepa psicrófila *B. weihenstephanensis* se emplea la capacidad que tiene ésta de crecer a temperaturas más bajas de 7°C, y a su incapacidad de hacerlo a temperaturas mayores a 40°C (Lechner *et al*, 1998, Lotte & Granum, 2001).

Debido a que en la naturaleza las cepas de *B. thuringiensis* pueden perder su toxina, al ser observados con microscopía electrónica pueden fácilmente ser confundidas con cepas de *B. cereus* debido a que son extremadamente similares, se utilizan técnicas moleculares como PCR entre otras en ciertas regiones del genoma como el *cryIA* que codifica para la toxina de *B. thuringiensis* (Bourque *et al*, 1993).

B. cereus y *B. thuringiensis* exhiben un alto grado de clonabilidad y el intercambio de material genético se lleva a cabo con alta frecuencia en condiciones normales en el medio ambiente (Helgason *et al*, 1998), lo cual puede hacer un poco más difícil su diferenciación.

También se recurre a técnicas de PCR para la diferenciación de *B. cereus* de *B. weihenstephanensis* por medio del gen *cpsA* que codifica las proteínas de choque térmico de éste último (Nakamura, 1998).

1.2.ANTECEDENTES

Las enfermedades diarreicas, en cuya etiología influyen los alimentos contaminados, son una de las causas más importantes de mortalidad en varios países latinoamericanos. (OPS, 1982)

Entre los alimentos que pueden transmitir a microorganismos patógenos como *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Bacillus spp*, entre otros; se encuentran las hortalizas y los granos, en los cuales las bacterias pueden sobrevivir por periodos importantes.

Se define como hortaliza a la parte comestible de una planta, entre las que se incluyen raíces, tubérculos, bulbos, tallos hojas, flores y frutos. Los tejidos vegetales que forman a estos órganos, por lo general son pobres en proteínas, sus componentes principales son; fibras, almidón ácidos orgánicos, algunas vitaminas, minerales y ciertos lípidos (CIEMA, 1985).

El pH de los productos hortícolas cuando se encuentran maduros está comprendido en el intervalo de 5 a 7, por lo tanto numerosas especies microbianas son capaces de crecer, si las condiciones de humedad son adecuadas (CIEMA, 1985).

Los germinados son semillas de hortalizas en las que han aparecido los primeros brotes de una planta, como un incipiente tallo, y unas diminutas hojas. Estos son ricos en proteínas y contienen los 10 aminoácidos esenciales, además de ser ricos en los complejos de vitamina B y E (Jensen, 1977).

Las hortalizas y germinados pueden contener a *Bacillus cereus* en forma natural, debido a que, su habitat es el suelo y a la costumbre de que en algunos estados de la República Mexicana, son regados durante su cultivo con aguas residuales y fertilizados con abonos de origen animal, lo cual contribuye a que sean considerados como un probable vehículo de transmisión de enfermedades diarreicas (Vázquez *et al*, 1998).

Dentro de las hortalizas que se consumen en forma cruda con mayor frecuencia, en ensaladas como: aderezos, adorno, salsa, y/o como parte integrante de un guiso se encuentran: apio, cilantro, espinaca, lechuga orejona, papaloquelite y perejil. Y dentro de los germinados los que se han comercializado con mayor éxito están: el germinado de soya, lenteja, trigo y alfalfa (Jensen, 1977).

1.3. *Bacillus cereus*

Esta bacteria fue descubierta por Frankland y Frankland a principios del Siglo XX (Gilbert & Taylor, 1975), pero no fue sino hasta 1950 que Hauge le asoció como agente contaminante de alimentos, en un brote ocasionado por salsa de vainilla preparada y almacenada a temperatura ambiente por un día antes de ser servida. Hauge implicó a *B. cereus* como el agente patógeno; demostrándolo al inocular salsa de vainilla estéril, incubándola 24 horas, posteriormente él consumió esta salsa y desarrollo los síntomas que se habían presentado en el brote (Hauge, 1955).

Bacillus cereus es un bacilo gram positivo, aerobio facultativo, posee flagelos peritricos y mide de 1.0 – 1.2 μm de ancho por 3.0 – 5.0 μm de largo, tiene esporas elípticas subterminales o centrales que no agrandan ni deforman el esporangio y es capaz de esporular en medios nutritivos, (figura 1). (Gilbert & Taylor, 1975; Brock & Mandigan, 1991; Baker & Griffiths, 1993).

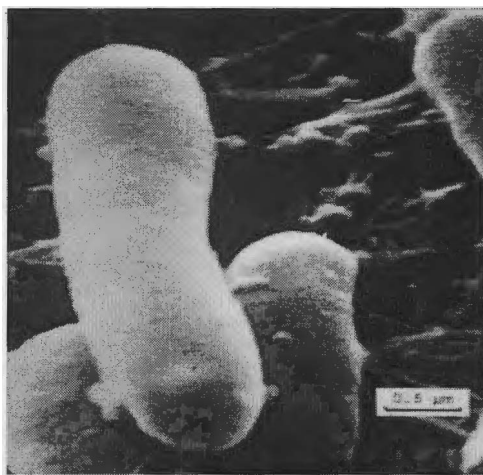


Figura 1. *Bacillus cereus* observado por microscopía electrónica
Fuente: <http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/bac-cer.htm>

La esporulación puede ocurrir en un intervalo de temperaturas comprendidas entre los 7 y 30°C; dentro de los requerimientos para la germinación están la presencia de los aminoácidos glicina y alanina (Benedict *et al*, 1993).

Se tiene conocimiento de cepas en las que sus esporas resisten la temperatura de pasteurización (Zwietering *et al*, 1996), aunque valores de pH de 4.2–4.4 y altas concentraciones de ácidos orgánicos tales como el fórmico, acético y láctico son capaces de inhibir la germinación de la endospora (Valero *et al*, 2003).

Se han reportado cepas que son capaces de esporular y crecer a bajas temperaturas, así como, de producir la enterotoxina diarreica en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis (Simone *et al*, 1982; Mäntynen & Lindström, 1998; Finlay *et al*, 2000).

El tiempo de generación en un medio rico a la temperatura óptima es de 18-27 minutos (Vázquez *et al*, 1998). La actividad acuosa (A_a) mínima para su crecimiento es de 0.95 y el pH en el que puede crecer está comprendido en el intervalo de 4.9-9.3 (Jay, 1992; Reed, 1994).

A esta bacteria la podemos encontrar ampliamente distribuida en la naturaleza ya que es un habitante natural del suelo, polvo, tracto intestinal de animales (Gilbert & Taylor, 1975).

Se han reportado brotes tanto eméticos como diarreicos causados por *B. cereus* en alimentos ricos en almidones, en cereales, pudín de vainilla, arroz cocido y frito, vegetales hervidos y crudos, harinas, carnes de res, cerdo, pollo, pescado, puré instantáneo, productos de pastelería, frutas, salsas, sopas, queso, leche cruda y pasteurizada, así como en leche en polvo, fórmulas infantiles reconstituidas, cremas, y granos cuando no son adecuadamente almacenados. (Portnoy *et al*, 1976; Bennet & Harmon, 1989; Turnbull *et al*, 1990; Reed, 1994).

B. cereus es también capaz de producir infecciones como (Drobniowski, 1993; García-Arribas y Kramer, 1990):

1. Síndromes diarreico y emético.
2. Infecciones del Sistema Nervioso Central (meningitis y abscesos).
3. Infecciones respiratorias (neumonía, abscesos, pleuritis).
4. Infecciones locales relacionadas con quemaduras, en oídos, en ojos, en heridas de cirugía e incluso como productor de gangrena.
5. Bacteriemia y septicemia
6. Endocarditis y pericarditis
7. En infecciones oculares como queratitis intensa, endoftalmitis, panoftalmitis.

1.4. FACTORES DE VIRULENCIA DE *B. cereus*

Entre los factores de virulencia descritos en *B. cereus* se incluyen: cinco tipos de enterotoxinas, varios tipos de hemolisinas (cereolisina, hemolisina II y esfingomielinasa), algunas fosfolipasas C (fosfatidilinositol hidrolasa, fosfatidilcolina hidrolasa) y la toxina emética (Hsieh *et al*, 1999).

1.5. SÍNDROME DIARRÉICO

Aun no se tiene esclarecido si las enterotoxinas pueden o no ser producidas en los alimentos y causar intoxicación por si mismas, por lo que se cree que para que se desarrolle una gastroenteritis es necesario que el alimento contenga una gran cantidad de microorganismos o bien esporas para que tal fenómeno se lleve a cabo (Granum y Lund, 1997).

Lo que se tiene esclarecido es que las enterotoxinas producidas durante el crecimiento vegetativo de la bacteria en el intestino delgado y en una amplia variedad de alimentos tales como carnes, platillos conteniendo verduras sopas y productos lácteos han sido implicados en los brotes (Abriouel *et al*, 2002).

La dosis para que el síndrome diarréico se presente es de 10^5 a 10^7 UFC/g en adultos sanos (Granum & Lund, 1997); en niños menores de un año y en inmunosuprimidos, la dosis para que se manifieste la enfermedad es de 10^3 a 10^5 UFC/g (Jaquette & Beuchat, 1998).

El periodo de incubación señalado para que se presenten los síntomas es de 8-16 h luego de haber consumido el alimento (Ombui *et al*, 1997) Una vez que aparecen duran de 20-36 h, se presenta diarrea acuosa sin moco, dolor abdominal intenso, vómito en algunos casos, tenesmo rectal y la fiebre es ocasional (Schaechter *et al*, 1993). Esta sintomatología es muy parecida a la que produce *Clostridium perfringens* (Reed, 1994).

1.6. *B. cereus* Y SUS TOXINAS DIARREICAS

El número de enterotoxinas y sus propiedades han sido tema de debate por largo tiempo, pero como ya se mencionó hasta el momento se han identificado al menos cinco enterotoxinas. Se tienen caracterizados dos complejos proteicos: la hemolisina BL (HBL), la enterotoxina no hemolítica (NHE) y tres productos únicos codificados por los genes *entFM*, *cytK* y *bceT*.

No se cuenta con evidencia de que *bceT* haya provocado algún brote (Granum & Lund, 1997). Se ha demostrado que no posee la capacidad toxigénica por si sola (Agata *et al*, 1995); en estudios posteriores hechos por Hansen y cols., descubrieron que la actividad toxigénica era debida a una fusión temprana del gen *bceT* a un fragmento complementario al gen pXO1 productor de la toxina de *B. anthracis* (Hansen *et al*, 2003).

Por otro lado Choma y cols. demostraron que la toxina *bceT* no posee capacidad citotóxica en células epiteliales, así como que tampoco es producida por la bacteria en niveles tales que pueda ser detectada por lo que se llegó a la conclusión de que esta enterotoxina no es capaz de producir brotes (Choma & Granum, 2002).

La enterotoxina principalmente encontrada y reportada como causante de brotes es la hemolisina BL (HBL); esta toxina está conformada por tres subunidades de naturaleza proteica, dos de los cuales poseen actividad lítica y son denominadas L₁ y L₂ con masas moleculares de 38.2 y 46 kDa respectivamente; la tercer subunidad, B, con masa molecular de 37 kDa tiene la capacidad de unir a las subunidades L₁ y L₂ con la célula blanco o enterocito (Prüß *et al*, 1999). Los componentes de la toxina HBL pueden ser expresadas en cantidades variables en diferentes cepas de *B. cereus* pero es necesario que las tres subunidades esten presentes para que se lleve a cabo la actividad biológica de la enterotoxina la cual incluye acumulación de fluidos en asa ligada de conejo, reacción dermonecrótica positiva en conejo y citotoxicidad en células CHO y Vero (Granum & Lund, 1997, Schoeni & Wong, 1999).

Como se mencionó anteriormente es necesario que las tres subunidades estén presentes para que se lleve a cabo la actividad de la enterotoxina, pero se ha visto que hay actividad, aunque muy débil, cuando se encuentran sólo los componentes L₁ y B (Lund & Granum, 1997a).

La toxina es producida durante el crecimiento exponencial del microorganismo, aunque la mayor cantidad se encuentra al principio de la fase estacionaria, la toxina es detectable cuando se encuentran 10^6 UFC/g en un alimento (Jay, 1992).

Los componentes de la enterotoxina al unirse a la célula blanco lo hacen de forma independiente y esto constituye un complejo de ataque hacia la membrana del enterocito dando como resultado una lisis osmótica, debida a la creación de un poro que permite la entrada de iones, agua y moléculas de baja masa molecular (Beecher & Wong, 1997).

Posee un punto isoeléctrico de 4.9; es termolábil, se inactiva calentándola 5 minutos a 56°C , así como con pH's mayores de 11 y menores de 4. Se sabe también que es sensible a la pronasa y a la tripsina, se ha observado que es inestable durante el almacenamiento a 4°C o 25°C (Bennet & Harmon, 1989; Sutherland *et al*, 1996). Es extremadamente lábil a los jugos gástricos que se producen en el estómago. Por lo cual es necesario que el alimento posea un número elevado de bacterias y la toxina se produce en el intestino, para que se lleve a cabo la infección.

Una enterotoxina no hemolítica también se ha reportado como causa de brotes diarreicos y se le ha denominado NHE. Al igual que la HBL son tres las subunidades de las cuales son llamadas también L_1 y L_2 poseen una masa molecular de 39 y 45 kDa respectivamente y una tercera B con masa molecular de 105 kDa y que provoca los mismos efectos biológicos (Granum & Lund, 1997).

Los tres componentes de la enterotoxina NHE fueron purificados por primera vez de una cepa de *B. cereus* aislada de un brote de gastroenteritis que se presentó en Noruega en 1995. Esta cepa fue utilizada para caracterizar la NHE debido a que produce el componente L_2 y otras cepas no son capaces (Granum *et*

al, 1996; Lund & Granum, 1997 a). Algunas cepas producen las dos enterotoxinas NHE y HBL mientras otras sólo un tipo (Granum *et al*, 1996; Lund & Granum, 1997a).

El tercer componente con actividad de enterotoxina es el denominado T el cual tiene un masa molecular de 41 kDa y con la capacidad de producir diarrea en monos *Rhesus* (Granum & Lund, 1997). Poco es lo que se conoce de esta toxina aunque como ya se mencionó anteriormente se sabe que por si sola no es capaz de producir daño (Choma & Granum, 2002, Hansen *et al*, 2003).

Se sabe de la toxina producto del gen *cytK*, que es una proteína con un masa de 34 kDa y es denominada citotoxina K, que causa hemólisis en glóbulos rojos de conejo y bovino, se encontró además que esta toxina es muy parecida a la toxina β de *C. perfringens* y que es la responsable del brote diarreico ocurrido en 1998 en Francia en donde se reportaron tres muertes (Lund *et al*, 2000).

Se han elaborado varios inmunoensayos comerciales para detectar la presencia de las enterotoxinas de *B. cereus*. El ensayo dirigido a la detección de la subunidad L₂ (Oxoid) no detecta las cepas que contienen sólo la toxina NHE, porque como ya se mencionó anteriormente hay cepas que producen esta toxina sin este componente. Mientras que otro ensayo, detecta únicamente la proteína de 45kD (L₂) (Tecra), que está presente únicamente en la enterotoxina NHE, lo que deja fuera el complejo HBL (Granum *et al*, 1996; Lund & Granum, 1997b).

1.7. SÍNDROME EMÉTICO

Para el síndrome emético, la dosis señalada es de 10^5 a 10^8 UFC/g (Granum & Lund, 1997; Jaquette & Beuchet, 1998), la sintomatología se presenta luego de un periodo de incubación que va de 0.5-5 h después de haber comido el alimento contaminado. Los síntomas duran de 6-24 h (Ombui *et al*, 1997) y son vómito (en ocasiones hay diarrea debido a la producción de la toxina diarréica),

dolor abdominal y un malestar general en todos los casos (Broks *et al*, 1996). El cuadro es muy parecido al ocasionado por contaminación de alimentos por *Staphylococcus aureus* (Reed, 1994).

1.8. FACTOR VACUOLIZANTE DE *B. cereus*

El síndrome emético es producido por un péptido con masa molecular de aproximadamente 1.2 kDa (Granum & Lund, 1997), es no polar, resiste temperaturas de 126°C hasta por 90 minutos, es capaz de soportar intervalos de pH entre 2 y 11, no es sensible a la pepsina o a la tripsina, y es estable durante dos meses a 4°C. (Johnson, 1984).

Agata y cols. (1994) fueron los primeros en decifrar la estructura química de ésta toxina y la denominaron cerulido, dicha estructura consta de un anillo de tres repeticiones de cuatro aminoácidos y/o oxiácidos (D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val)₃. Esta estructura en anillo (dodecapéptido) esta estrechamente relacionado químicamente con el ionóforo de potasio valinomicina. Figura 2. (Agata *et al*, 1994).

No es antigénico por lo cual para su detección se recurre a la capacidad que tiene de vacuolizar células HEp-2 (Hughes *et al*, 1998, Agata *et al*, 1994; Nishikawa *et al*. 1996).

Se ha reportado que la dosis mínima de toxina requerida para que se lleve a cabo la formación de vacuolas en células HEp-2 es de aproximadamente 5 ng/mL en 24 horas y de ahí se sabe que la dosis mínima del factor vacuolizante requerida para causar vómito en monos es de al menos 70 µg/mL (Agata *et al*, 1994).

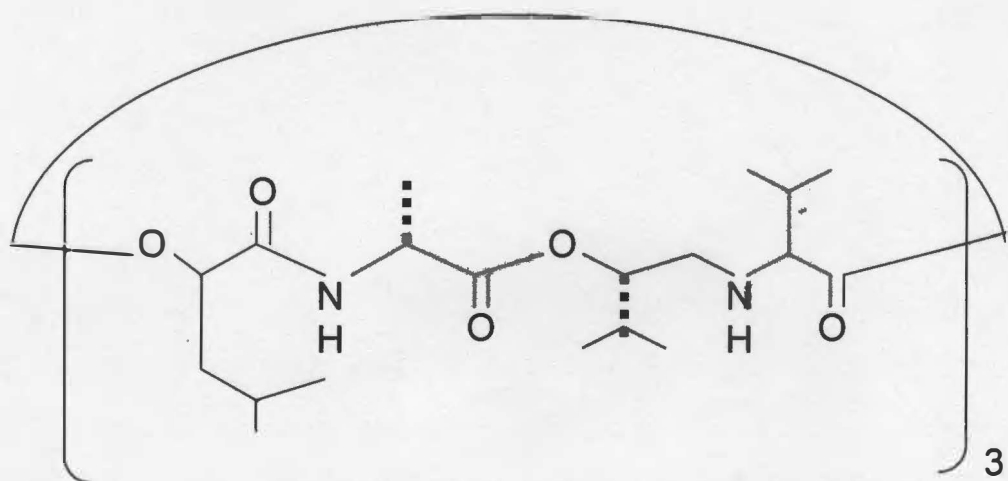
Otro método descrito para demostrar la presencia de la toxina emética de *B. cereus* es por medio del uso de espermatozoides de jabalí en los que se observa pérdida de la movilidad así como la presencia de vacuolas (Andersson *et al*,

1998). No está esclarecido si la toxina es producto de un gen modificado o bien si se trata de un producto enzimático resultado de la modificación de los componentes en el medio de crecimiento. Sin embargo, debido a su estructura molecular se cree que no es un producto genético directamente (Granum & Lund, 1997).

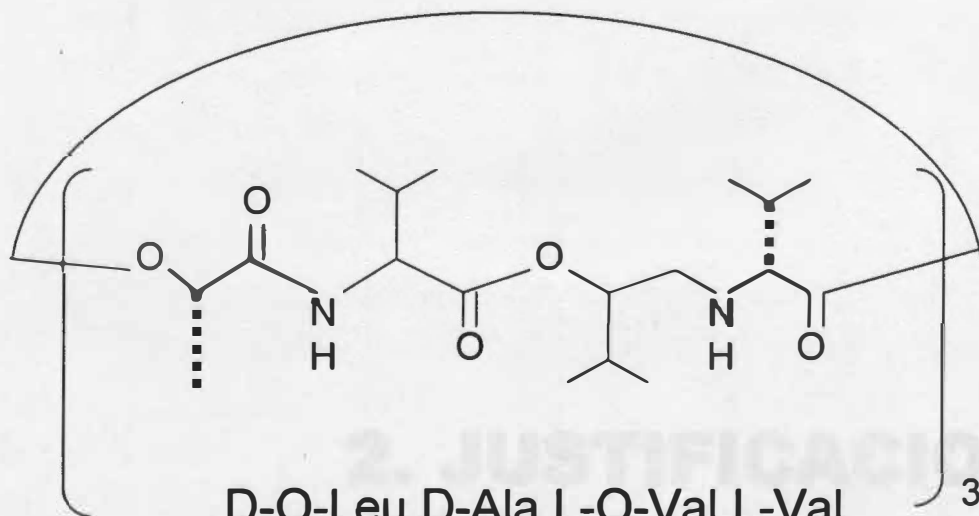
Esta toxina causa emésis a través de la estimulación del receptor 5-TH₃ del vago aferente (Agata *et al*, 1994), y se produce durante la fase de esporulación de *B. cereus*. Se ha observado que las cepas que producen la toxina emética son incapaces de hidrolizar el almidón o fermentar la salicina (Raevuori *et al*, 1977; Shinagawa, 1990; Nishikawa *et al*, 1996).

Esta toxina es también capaz de provocar daños en hígado lo cual ha sido demostrado por medio del uso de ratones en el laboratorio (Yokoyama *et al*, 1999).

Christiansson y colaboradores 1989 demostraron que *B. cereus* es capaz de producir toxinas diarreicas a temperaturas más bajas que las óptimas para su crecimiento. Por otro lado Finlay y cols.(2000) encontraron que había producción de la toxina emética en el rango de temperaturas de 10 a 46°C encontrando que entre 12 y 15°C en 4 días se obtenía la máxima cantidad. A las temperaturas extremas de 10 y 46°C no creció la bacteria, a 37°C es poca la producción de toxina emética lo que relacionaron con la cantidad presente en el intestino.



D-O-Leu D-Ala L-O-Val L-Val
Cerulido



D-O-Leu D-Ala L-O-Val L-Val
Valinomicina

Figura 2. Estructura química del cerulido comparada con la de la valinomicina

2. JUSTIFICACION

JUSTIFICACION

Los alimentos pueden ser vehículos de transmisión de enfermedades entéricas, las cuales revisten especial importancia por sus altas tasas de morbilidad y mortalidad, por lo tanto los estudios microbiológicos de dichos padecimientos, se deben enfocar a los agentes causales y vehículos de transmisión.

La gastroenteritis bacteriana ocupa el segundo lugar de las enfermedades que ocurren en el país, desconociéndose en la mayoría de los casos o brotes el microorganismo involucrado. En México, no se cuenta con datos que permitan evaluar la importancia epidemiológica de *B. cereus*, como causante de enfermedades entéricas, por lo que, es necesario estimar su presencia en hortalizas y germinados así como el riesgo potencial que representa la producción de sus toxinas. Así como determinar la capacidad de las cepas de producir algunos factores de virulencia

3. OBJETIVO GENERAL

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las cepas de *B. cereus* aisladas de hortalizas y germinados mediante técnicas fenotípicas .

4. OBJETIVOS PARTICULARES

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislamiento de *B. cereus* a partir de seis diferentes tipos de hortalizas (cilantro, perejil, papaloquelite, lechuga orejona, apio y espinaca) y cuatro tipos de germinados (germinado de soya, trigo, alfalfa y lenteja).
- Diferenciar las cepas de *B. cereus* de las cepas de *B. mycoides*.
- Demostrar la existencia de cepas psicrófilas dentro de *B. cereus*
- Poner en evidencia la producción de hemolisinas de las cepas de *B. cereus*.
- Selección de las cepas productoras del factor vacuolizante en la línea celular HEp-2.

5. HIPOTESIS

HIPÓTESIS

Bacillus cereus se encuentra presente en los germinados y en las hortalizas y poseen la capacidad de producir factores de virulencia los cuales pueden llegar a ser responsables de brotes de gastroenteritis.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Cepas bacterianas

Como testigo positivo de *B. thuringiensis* EM-ENCB se utilizó una cepa de referencia donada por el laboratorio de Enzimas Microbianas de la ENCB.

La cepa de *B. cereus* ATCC 11778 donada por el laboratorio de Microbiología Sanitaria de la ENCB.

6.2. Aislamiento de *B. cereus*

De la Central de Abastos de la Ciudad de México, D. F. se recolectaron las muestras de las 6 hortalizas de estudio; apio, cilantro, espinaca, lechuga orejona, papaloquelite y perejil, así como de los 4 germinados de soya, de lenteja, de trigo y de alfalfa. Cada muestra de hortaliza con un peso aproximado de 1Kg y 500g de germinado, fueron transportadas en un recipiente térmico en bolsas de plástico evitando el contacto entre ellas y con el medio ambiente. El tiempo entre la colección y el análisis fue aproximadamente de cuatro horas. Se trabajaron 30 muestras semanales de cada producto.

La metodología utilizada para la determinación de la presencia, de *B. cereus*, fue la recomendada por el Manual de Bacteriología Analítica de la Administración de Alimentos y Medicamentos (Stanley, 1992).

1. Se pesó una muestra de 50 g y se colocó en una bolsa de plástico en condiciones asépticas y se le adicionó 450 mL de agua peptonada al 0.1%, ésta constituyó la dilución 10^{-1} , se homogenizó de tal forma que al mismo tiempo se hiciera un lavado de la hortaliza y/o germinado.
2. Se llevó a cabo una serie de diluciones hasta 10^{-6} .
3. De cada dilución se transfirió 0.1 mL a placas con agar manitol-yema de huevo-polimixina B (MYP), y se sembró por la técnica de espátulado con una asa de vidrio acodada.
4. Se incubó las placas a 30°C durante 24 h.

5. Posteriormente se llevó a cabo el conteo de las colonias sospechosas que presentaran la morfología característica de *B. cereus*, (colonias redondas de 4-7 mm de diámetro que tuvieran aspecto de vidrio esmerilado o bien gota de cera, con una coloración rosada y un halo de precipitación alrededor de ellas).
6. Se seleccionaron 3 colonias de la dilución mayor y se transfirieron a gelosa nutritiva, se incubó a 30°C durante 24 h.
7. Del crecimiento obtenido en los tubos se procedió a hacer tinción de Gram, prueba de movilidad y catalasa.

6.3. Identificación de *B. cereus*

1. Del mismo crecimiento se sembró las bioquímicas: producción de ácido y de gas a partir de glucosa, sacarosa, manitol, salicina y glicerol reducción de nitratos a nitritos, leche tornasolada, tubos de Voges Proskauer (VP) y rojo de metilo, hidrólisis del almidón y de la gelatina.
2. Se incubó a 30°C durante 24 h, excepto el de VP que se incubó 48 h.
3. Se llevó a cabo la lectura de las pruebas bioquímicas y por último se reportó el número de *Bacillus cereus* / g de muestra.

6.4. Presencia de hemolisinas

1. Se tomó una asada de las cepas identificadas como *B. cereus* y se sembraron en caldo BHI.
2. Se incubó a 30°C durante 18 h.
3. Una muestra de cada cepa se sembró en gelosa sangre (adicionada con 5% de sangre de carnero)
4. Se incubó a 30°C durante 24 h.
5. Se observó la hemólisis presentada alrededor de las colonias.

6.5. Selección de cepas psicrotróficas de *B. cereus*

1. Se inoculó dos series de tubos con caldo BHI con las cepas de *B. cereus*
2. Se incubó a 7°C con agitación (200 rpm) hasta que se vio crecimiento.

3. Se seleccionó los tubos que presentaron crecimiento.

6.6. Identificación de las cepas productoras de la toxina emética

6.6.1. Obtención de la toxina emética

Método modificado de Huges *et al* (1988).

1. Las cepas de *B. cereus* sospechosas se cultivaron en 10 mL de caldo BHI durante 18 h a 30°C.
2. Alícuotas de 0.1 mL del cultivo anterior se transfirieron a caldo BHI-arroz (el cual se preparó adicionando 0.3 g de arroz por cada 10 mL de caldo BHI) sembrándose cada cepa por duplicado.
3. Se incubó una serie por 15 h a 30°C con agitación moderada (250 rpm).
4. La otra serie se incubó durante 4 días a 15°C (Finlay *et al* 2000).
5. Se centrifugó el cultivo en microcentrifuga a 2000 X g durante 10 min.
6. El sobrenadante se calentó en agua en ebullición por 10 min.
7. Se tomaron alícuotas de 25 µl. Se diluyeron 1:2 con solución salina.
8. Se almacenó a -20°C.

6.6.2. Vacuolización de las células HEp-2

Se llevó a cabo por la selección de cepas productoras de vacuolización de acuerdo al método de Nishikawa *et al* (1996).

1. Se incubaron las células HEp-2 a 37°C en medio MEM (Medio Mínimo Esencial de Eagle), con sales de Earle y 2 mM de glutamina, suplementado con suero bovino al 10% y en atmósfera de CO₂ al 5%.
2. Se seleccionaron las botellas que tenían de 90 a 100% de confluencia y se hizo disgregación celular con solución de Pucks 1X.
3. Se sembraron las células en microplacas de 96 pozos.
4. Posteriormente se adicionaron las alícuotas diluídas 1:2 del sobrenadante del crecimiento de *B. cereus* en caldo BHI-arroz.
5. Se incubaron las células durante 48 h a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 5%.

6. Se dieron como positivos los cultivos celulares que presentaron mas de 25% de vacuolización, el cual se obtuvo contando las células vacuolizadas en un campo definido teniendo presente que el título de vacuolización fue definido como la presencia de 10 vacuolas/célula en 24 horas.

7. RESULTADOS

RESULTADOS

7.1. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS

En el cuadro 1 se presentan los resultados de las bioquímicas para las cuatro bacterias principales que comprenden el grupo de *B. cereus*.

Cuadro 1. Resultado de las pruebas bioquímicas para *B. cereus*.

Característica	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. mycoides</i>
Tinción de Gram	+	+	+	+
Movilidad	+	+	-	-
Catalasa	+	+	+	+
Producción de ácido y gas a partir de Glucosa	+	+	+	+
Producción de ácido y gas a partir de Manitol	-	-	-	-
Producción de ácido y gas a partir de Glicerol	+	+	+	+
Producción de ácido y gas a partir de Salicina	+	+	+	+
Producción de ácido y gas a partir de Sacarosa	+	+	+	+
Reducción de Nitratos a Nitritos	+	+	+	+
Reacción de Voges Proskauer	+	+	+	+
Hidrólisis del almidón	+	+	+	+
Hidrólisis de la Gelatina	+	+	+	+
Producción de Lecitinasa	+	+	+	+
Crecimiento rizoide	-	-	-	+

+:Positivo

Fuente: Stanley, 1992.

-:Negativo

7.2. AISLAMIENTO DE CEPAS DE *B. cereus* y *B. mycoides* A PARTIR DE GERMINADOS Y HORTALIZAS.

En el cuadro 2 se puede apreciar que en el 10.3% de las 300 muestras de hortalizas se encontró la presencia de *B. cereus* del total de muestras positivas para cada hortaliza se tuvo: en la lechuga orejona un 22%, en la espinaca un 16%, en el cilantro un 10%, el perejil 6%, el papaloquelite con 2% y el menor número de muestras positivas se tuvo en el apio con un 2%. El intervalo de crecimiento obtenido para estas muestras analizadas es de 10^2 a 10^7 UFC/g.

Cuadro 2. Muestras positivas e intervalo de crecimiento de *B. cereus* en hortalizas

Hortaliza	Nombre científico	Numero de muestras analizadas	Muestras positivas	Intervalo de crecimiento UFC/g
Lechuga orejona	<i>Lactuca sativa</i> (L)	50	11	$10^4 - 10^7$
Espinaca	<i>Spinacia oleracea</i> (L)	50	8	$10^4 - 10^7$
Cilantro	<i>Coriandrum sativum</i> (L)	50	5	$10^4 - 10^7$
Perejil	<i>Petroselinum crispum</i> (H)	50	3	$10^4 - 10^7$
Papaloquelite	<i>Porophyllum macrocephalum</i> (H)	50	2	$10^3 - 10^5$
Apio	<i>Apium graveolus</i> (L)	50	2	$10^2 - 10^3$

Para el caso de los germinados (cuadro 3) se puede observar que se encontró en el 18% de las 100 muestras analizadas. Se aisló *B. cereus* en

germinado de trigo en el 28%, se puso en evidencia a esta bacteria en el 16% de las muestras de germinado de lenteja, 16% en el germinado de soya y el menor número en el germinado de alfalfa con un 12% el crecimiento de este microorganismo estuvo en el intervalo comprendido de 10^2 a 10^6 UFC/g.

Cuadro 3. Muestras positivas e intervalo de crecimiento de *B. cereus* en germinados.

Hortaliza	Nombre científico	Número de muestras analizadas	Muestras positivas	Intervalo de crecimiento UFC/g
Germinado de trigo	<i>Triticum aestivum</i> (L)	25	7	$10^2 - 10^6$
Germinado de lenteja	<i>Ervum lens</i> (L)	25	4	$10^2 - 10^6$
Germinado de soya	<i>Glycyne hispida</i> (L)	25	4	$10^2 - 10^4$
Germinado de alfalfa	<i>Medicago sativa</i> (L)	25	3	$10^2 - 10^5$

7.3. DIFERENCIACIÓN DE LAS ESPECIES DE *B. cereus* Y *B. mycoides*

El crecimiento característico en medio sólido de *B. mycoides* hizo posible diferenciarlo fácilmente de *B. cereus* con sólo sembrarlo en gelosa nutritiva o bien en cualquier tipo de gelosa y en la figura 3 se puede observar esta diferencia; en donde el crecimiento de *B. mycoides* se caracteriza por su apariencia rizoide, mientras que el de *B. cereus* semeja al vidrio esmerilado o bien a una gota de cera que es de donde proviene propiamente su nombre.

Aunque las cepas que crecieron con esta característica no fuesen realmente *B. mycoides* si no mas bien *B. pseudomycoides*, esto se descartó por medio de los resultados presentados en las bioquímicas que se utilizaron en el ensayo para la diferenciación de las especies del grupo de *B. cereus*.

B. thuringiensis se diferenció de *B. cereus* gracias a las bioquímicas características de una y otra cepa.

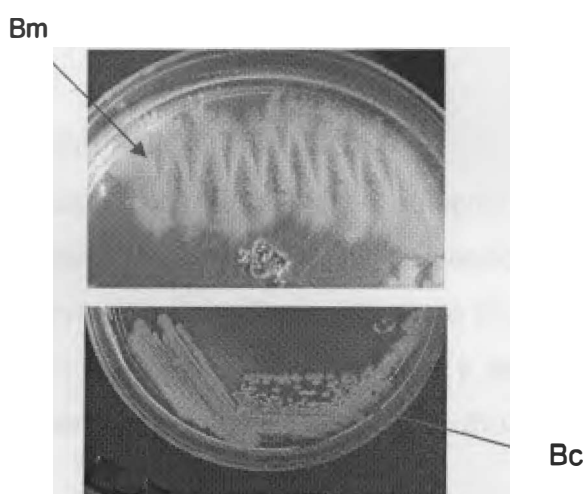


Figura 3. Crecimiento de *B. mycoides* (Bm) y *B. cereus* (Bc) en medio sólido de infusión cerebro corazón (BHI).

7.4. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE HEMOLISINA.

La capacidad hemolítica de las cepas se demostró en gelosa adicionada de sangre de carnero al 5% y se observó que las 49 cepas en estudio, así como en, la de referencia de *B. thuringiensis* y las 3 aisladas de *B. mycoides* fueron capaces de llevar a cabo una β -hemólisis de los eritrocitos (Figura 4).

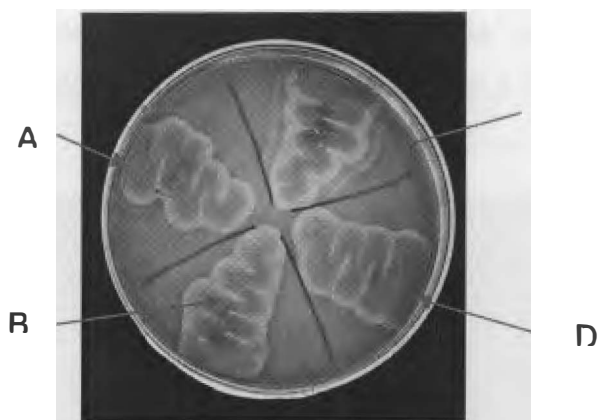


Figura 4. Hemólisis presentada por *B. cereus*. A) Cepa 108, B) Cepa 13 C) Cepa 58 y D) Cepa 102.

7.5. SELECCIÓN DE CEPAS PSICROTROFICAS

Por otro lado las cepas psicrótróficas se seleccionaron con ayuda de su capacidad de crecer a bajas temperaturas (7°C) teniendo que del total cepas de estudio que si lograron llevarlo a cabo fueron las que pertenecen a *B. mycoides* analizada en conjunto con las cepas de *B. cereus* y las cepas que no fueron capaces de crecer a ésta temperatura pertenecen a *B. thuringiensis*.

7.6. DETECCIÓN DE LAS CEPAS PRODUCTORAS DE LA TOXINA EMETICA

Sólo una cepa indujo la formación de vacuolas en células HEp-2, lo que indica la presencia de la toxina que provoca el vómito. En la figura 5 puede verse la monocapa representativa del testigo negativo en la cual se adicionó el medio de crecimiento para *B. cereus* (BHI adicionado con arroz al 1%) y puede verse la ausencia de vacuolas

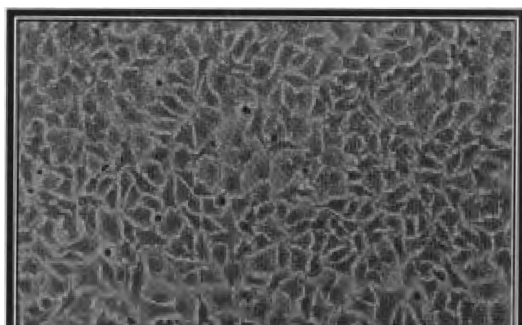


Figura 5. Monocapa de células HEp-2 testigo

En la figura 6 se muestra la monocapa en la cual se observa la vacuolización y una destrucción debida a la toxina emética de *B. cereus* en las células de HEp-2

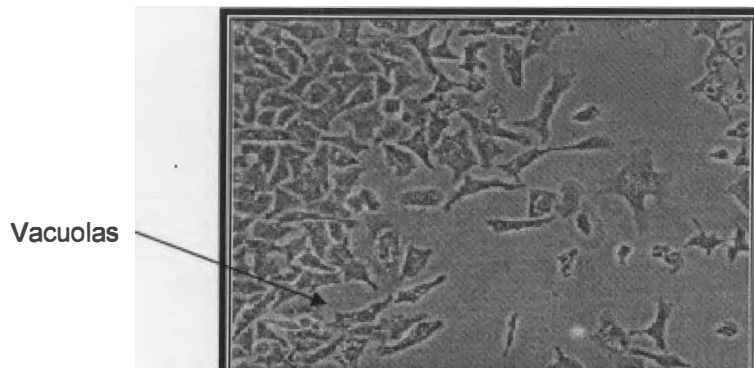


Figura 6. Monocapa de células HEp-2 con vacuolización y destrucción debida a la toxina emética de *B. cereus*

8. DISCUSSION

DISCUSIÓN

Como puede verse en los resultados, la bacteria *B. cereus* en las hortalizas y germinados está ampliamente distribuida y es factible encontrarla en este tipo de alimentos y eso es básicamente debido a que es un microorganismo que tiene como habitat principal el suelo y el polvo.

Además que esta bacteria forma parte de la flora normal de los desechos fecales de animales y humanos y en México existe la práctica de riego de las hortalizas con aguas negras.

Por otro lado, gracias a que es una bacteria que soporta la desecación por su capacidad de esporular, puede estar presente de esta forma, en dichos reservorios y si se le provee de las condiciones necesarias es capaz de germinar y producir células vegetativas, lo cual es muy importante en el caso de los alimentos ya que si no son eliminados correctamente pueden desarrollarse y producir, si es que poseen la capacidad, las toxinas tanto emética como diarreicas (Abriouel *et al*, 2002).

En nuestros resultados se puede observar que *B. cereus* está presente en los germinados, el que más muestras positivas tuvo fue el de trigo posteriormente los de lenteja y soya, por último se encontró que en el de alfalfa dos muestras contenían este microorganismo. En la literatura no existen reportes acerca de la presencia de *B. cereus* en germinados por lo cual esta investigación adquiere una importancia mayor ya que se está poniendo de manifiesto que existe la posibilidad de que esta bacteria se encuentre como parte de la flora de este tipo de productos.

Por otro lado en las hortalizas, la que obtuvo 11 número de muestras positivas fue la lechuga orejona, que aunque es un numero de aislamientos mayor que los de germinado de trigo, también la cantidad de muestras analizadas fue

superior por lo cual no se puede concluir que se encuentre mas frecuentemente en las hortalizas o en los germinados por la discrepancia en el número de muestras estudiadas.

La presencia de *B. cereus* en los germinados y hortalizas es de especial interés ya que estos alimentos se consumen crudos como parte de ensaladas, en jugos o bien acompañando platillos, por lo que no reciben ningún tipo de tratamiento térmico que pueda acabar con la bacteria y por tal motivo es necesario investigar si son capaces de producir toxinas o bien factores que en un momento dado puedan desencadenar algún tipo de daño en los individuos que los consuman.

Se han reportado casos de gastroenteritis en los que los vehículos de transmisión de la enfermedad corresponden a hortalizas, en su mayoría provocando diarrea; por otro lado el síndrome provocado por la toxina emética ha sido reportado en casi todos los casos en alimentos constituidos en su mayor parte de cereales, básicamente en aquellos en los cuales el principal ingrediente es el arroz (Guinebretière *et al*, 2002).

Es importante diferenciar entre las especies que conforman el grupo de *B. cereus* lo cual es factible gracias a características especiales de cada una de ellas,. Para el caso de algunas especies en las cuales la relación es tan estrecha que solo hay diferencias muy específicas, como se ha venido diciendo, es relativamente fácil diferenciar a *B. cereus* de *B. mycoides* incluso desde el momento en que se hace la selección presuntiva de las cepas de *B. cereus* en el agar manitol-yema de huevo-polimixina B, por lo cual no es necesaria una diferenciación más específica, sin embargo se hace una confirmación del crecimiento de *B. mycoides* en gelosa nutritiva y en la cual se puede observar claramente el crecimiento rizoide tan característico de esta cepa.

Se ha reportado que *B. anthracis* es de las que mayor similitud guarda con *B. cereus*, incluso se han llevado a cabo estudios de hibridación de DNA-DNA para diferenciarlas, pero un ensayo muy sencillo que nos diferencia estas dos especies es la capacidad de *B. cereus* de hemolizar los eritrocitos característica que no posee *B. anthracis* y como puede observarse en los resultados de producción de hemolisinas todas las cepas analizadas en este estudio son β -hemolíticas, incluso las de *B. thuringiensis* y las de *B. mycoides* (Makino *et al.* 1993).

En el caso de *B. thuringiensis* la presencia de la toxina de esta bacteria nos hace posible la diferenciación y se puede hacer con sólo observar dicha proteína ya que por medio de microscopía electrónica puede verse, pero se han reportado cepas de esta especie en las cuales se ha perdido esta toxina por medio de algún fenómeno mecánico y no es posible observarla, lo cual la hace indistinguible de las cepas de *B. cereus*, basándose solo en la observación del cristal, por lo cual puede recurrirse a métodos genómicos para llevar a cabo una identificación por medio de la PCR en la que se amplifica un fragmento del gen que codifica esta toxina insecticida de *B. thuringiensis* y así tener una mayor posibilidad de diferenciar estas dos especies (González *et al.*, 1981; Kronstadt *et al.*, 1983).

La presencia de hemolisinas en el caso específico de *B. cereus* es muy importante ya que la toxina HBL pertenece a este grupo, por lo cual es primordial determinar esta capacidad en las cepas de *B. cereus* analizadas, aún cuando se sabe que no es la única toxina con poder hemolítico que produce esta bacteria, si no que también produce otras hemolisinas que provocan enfermedades no gastrointestinales, tales como meningitis, neumonía, abscesos, pleuritis infecciones locales relacionadas con quemaduras, en oídos, en ojos, en heridas de cirugía e incluso como productor de gangrena entre otras (Drobniewski, 1993).

Cabe mencionar que las 3 cepas de *B. mycoides* y la cepa testigo de *B. thuringiensis* analizadas junto con las cepas de *B. cereus* también llevaron a cabo

la hemólisis de eritrocitos y aunque no se ha presentado ningún brote de gastroenteritis o bien de alguna otra infección provocada por estas dos especies si se tienen reportes de que hay cepas de estas bacterias que poseen la información genética para producir la toxina HBL (Prüß *et al*, 1999).

Se identificó también la capacidad que tienen las cepas de crecer a bajas temperaturas para así clasificarlas como cepas psicrótroficas y se encontró que las 49 cepas de *B. cereus* analizadas fueron capaces de hacerlo, esta característica es muy importante en nuestro trabajo, ya que las hortalizas y los germinados para su distribución y venta son almacenados en refrigeración pero no son desinfectados previamente, con lo cual la bacteria puede crecer y producir sus enterotoxinas, haciendo así que el alimento pueda llegar a ser toxico para el individuo que lo consume (Finlay *et al*, 2000).

Para la detección de la toxina emética el ensayo que se realizó fue el de cultivo celular ya que esta toxina como se mencionó en la introducción más que el producto de un gen es el resultado de procesos enzimáticos, por lo que no es posible detectarla mas que en cultivo celular o bien con animales de experimentación, como es el caso de monos en los que se les administra la toxina y presentan los síntomas característicos de la enfermedad (Häggblom *et al*, 2002).

El ensayo se realizó a dos diferentes temperaturas de incubación de la bacteria a 15°C y a 30°C, ya que se ha encontrado que estas temperaturas de se produce una cantidad de toxinas mucho mayor que a la temperatura óptima de crecimiento de *B. cereus* (Finlay *et al*, 2000). También se llevo a cabo incubando a la bacteria en caldo BHI suplementado con arroz, ya que la mayor parte de los brotes que se han reportado han sucedido con el arroz como alimento contaminante y no se ha descubierto hasta el momento que sustancias son las que promueven la producción de la toxina, pero se cree que este cereal se las provee para que se sintetice (Huges *et al* 1988).. En el caso de las cepas

analizadas en este estudio se obtuvo que sólo una cepa dio positiva para este ensayo, por lo que se cree que no es que no sean capaces de producirla si no que las condiciones no fueron las favorables para que se produjera la toxina, además el origen de todas las cepas aisladas es de hortalizas y germinados y no existen reportes de que haya habido brotes de síndrome emético debido a haber consumido estos alimentos ya que se ha encontrado que las cepas aisladas a partir de brotes y a partir de los alimentos no poseen características semejantes lo cual indica que si existen diferencias significativas entre unas y otras cepas (Guinebretière *et al*, 2002). Además se ha reportado que sólo un grupo muy reducido de *B. cereus* produce el cerulido (Agata *et al*, 1996; Mikami, 1994).

Por otro lado la mayor parte de los brotes de enfermedad emética relacionados con esta toxina, han sido en su mayoría en países orientales como Japón y China así como en el Reino Unido lo cual hace posible la explicación de que una sola cepa posea la capacidad de producir dicha toxina, teniendo en consideración que la mayoría de las cepas que la producen provienen de dichos países, lo cual concuerda con lo reportado por Ghelardi y cols (2002).

Un dato importante acerca de la cepa que dio positiva para la producción de la toxina, es el de que es una bacteria incapaz de hidrolizar el almidón y esta característica se presenta en todas las cepas que han sido responsables de los brotes eméticos reportados (Drobniewski, 1993) .

9. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Este estudio muestra que las hortalizas cilantro, perejil, lechuga orejona, papaloquelite, espinaca y apio, y los germinados de soya, alfalfa, trigo y lenteja pueden contener como parte de su flora a *B. cereus*.

La diferenciación entre las cepas de *B. cereus* y *B. mycoides* se puede llevar a cabo de modo relativamente sencillo y sin necesidad de llegar hasta un nivel bioquímico.

El presente trabajo demostró que las cepas de *B. cereus* analizadas poseen la cualidad de crecer a temperaturas de 7°C e incluso cepas de *B. mycoides* lo pueden llevar a cabo.

Por otro lado en el ensayo realizado para demostrar la presencia de hemolisinas se obtuvo que todas las cepas de *B. cereus* incluso las de *B. mycoides* fueron capaces de llevar a cabo β -hemólisis en eritrocitos de carnero.

Una cepa de *B. cereus* dio positiva para la prueba de vacuolización en la línea celular HEp-2 y esta es incapaz de hidrolizar el almidón, lo cual concuerda con datos reportados por otros autores.

10. REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Abriouel, H.; Maqueda, M.; Gálvez, A.; Martínez-Bueno, M. & Valdivia, E. (2002). Inhibition of bacterial growth, enterotoxin production, and spore outgrowth in strains of *Bacillus cereus* by bacteriocin AS-48. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1473-1477.
- Agata, N., Mori, M., Otha, M., Suwan, S.; Ohtani, I. & M. Isobe. (1994). A novel dodecapeptide, cerulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEP-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**:31-34.
- Agata, N., Otha, M., Arakawa, Y. & Mori, M. (1995). The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxigenic protein. *Microbiology.* **141**:983-988.
- Andersson, M. A.; Mikkola, R.; Helin, J.; Andersson, M. C. & Salkinoja-Salonen, M. (1998). A novel sensitive bioassay for detection of *Bacillus cereus* emetic toxin and related depsipeptide ionophores. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1338-1343.
- Baker, J. M. & Griffiths, M. W. (1993). Predictive modeling of psychrotrophic *Bacillus cereus*. *J. Food Prot.* **56**:684-688.
- Beecher, D. J. & Wong, A. C. L. (1997). Tripartite hemolysin BL From *Bacillus cereus*. Hemolytic analysis of component interaction and model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. *J. Biol. Chem.* **272**:233-239.
- Benedict, R. C., Partridge, T., Weels, D. & Buchanan, R. L. (1993). *Bacillus cereus*: Aerobic growth kinetics. *J. Food Prot.* **56**:211-214.
- Bennet, R. & Harmon, S. M. (1989). *Bacillus cereus* Food Poisoning. p. 83-89. **EN**: Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases. Principles and Practice. Balow, A., Hausler, W. J., Ohasis, M. J. & Turano, A. (eds) Vol. 1 Springer-Verlag.
- Bourque, S. N., Valero, J. R., Mercier, J., Lavoie, M. C. & Levesque, R. C. (1993). Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:523-527.

- Brock, T. D. & Mandigan, T. D. (1991). *Biology of Microorganisms*. 6th ed. Prentice Hall Englewood Cliffs. pp 550-559.
- Broks, G. F., Jawetz, E., Butel, J. S., Melnick, J. L. & Alderberg, E. A. (1996). *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Alderberg*. 15^{ava} ed. el Manual Moderno. p. 205-208.
- Choma, C. & Granum, P. E. (2002). The enterotoxin (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. *FEMS Microbiol. Lett.* **217**:115-119.
- Christiansson, A.; Naidu, A. S.; Nilsson, I.; Wadström, T. & Petterson, H. E. (1989). Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in milk at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:2595-2600.
- Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (CIEMA). (1985). *Ecología microbiana de los alimentos. Volumen II. Productos Alimenticios*. Acribia, España. p. 613-651.
- Drobniowski, F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**:324-338
- Finlay, W. J. J.; Logan, N. A. & Sutherland, A. D. (2000). *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**:385-389.
- Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Barsotti, C. Baggiani, A. & Senesi, S. (2002). Identification and characterisation of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. *FEMS Microbiol. Lett.* **208**:129-134.
- Gilbert, R. J. & Taylor, A. J. (1975). *Bacillus cereus* in food poisoning. p. 197-213. **EN**: *Microbiology agriculture, fisheries, and food*. Skimer, F. A. & Carr, J. G. London Academic Press.
- González; J. M., Dulmage, H. T. & Carlton, B. C. (1981). Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*. **5**:351-365.

- Guinebretière, M.-H., Brousolle, V. & Nguyen-The, C. (2002). Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. J. Clin. Microbiol. **40**:3053-3056.
- Granum, P. E., Anderson, A., Gayther, C., te Giffel, M. C., Larsen, H., Lund, T. & O'Sullivan, K. (1996). Evidence for a further enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol. Lett. **141**:145-149.
- Granum, P. E. & Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol. Lett. **157**:223-228.
- Häggblom, M. M.; Apetroaie, C.; Andersson, M. A. & Salkinoja-Salonen, M. (2002). Quantitative analysis of cerulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. Appl. Environ. Microbiol. **68**:2479-2483.
- Hansen, M. B., Hølby, P. E., Jensen, G. B. & Hendriksen, N. B. (2003). The *Bacillus cereus* bce T enterotoxin sequence reappraised FEMS Microbiol. Lett. **223**:21-24.
- Hauge, S. (1955). Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli. J. Appl. Bacteriol. **18**:592-595.
- Helgason, E.; Caugant, D. A.; Lecadet, M. M.; Chen, Y.; Mahillon, J.; Lövgren, A.; Hegna, I.; Kvaloy, K. & Kolstø, A. B. (1998). Genetic diversity of *Bacillus cereus*/*Bacillus thuringiensis* isolates from natural sources. Curr. Microbiol. **37**:80-87.
- Hsieh, Y. M., Sheu, S. I., Chen, Y. L. & Tsen, H. Y. (1999). Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *Bacillus cereus* strains from foods and food-borne outbreaks. J. Appl. Microbiol. **87**:481-490.
- Hughes, S., Bartholomew, B., Hardy, J.C. & Kramer, J.M. (1988). Potential application of a HEP-2 cell assay in the investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food poisoning. FEMS Microbiol. Lett. **52**:7-12
- Jaquette, C. B. & Beuchat, L. R. (1998). Survival and growth of psychrotrophic *Bacillus cereus* in dry and reconstituted infant rice cereal. J. Food Prot. **61**:1629-1635

- Jay, J. M. (1992). Microbiología moderna de los alimentos. Ed. Acribia 3ª ed. p.280 y 590-600.
- Jensen, R. (1977). Semillas y germinados. Serie de la naturaleza en la salud 3. 3ª ed. Yugoslavia Matías Romero. p. 9-70.
- Johnson, K. M. (1984). *Bacillus cereus* Foodborne Illness—An update. J. Food. Prot. **47**:145-153.
- Kronstadt, J. W., Schenepf, H. E., Whiteley, H. R. (1983). Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. J. Bacteriol. **154**:419-428.
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K. P., Prüß, T., Kaplan, T., Wiebner-Gunkel, Stewart, G. S. A. B. & Scherer, S. (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. Int. J. Syst. Bacteriol. **48**:1373-1382.
- Lotte, P. S. & Granum, P. E. (2001). Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis* FEMS Microbiol. Lett. **197**:223-228.
- Lund, T. & Granum, P. E. (1997a). Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. Microbiology. **143**:3329-3339.
- Lund, T. & Granum, P. E. (1997b). Characterization of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. FEMS Microbiol. Lett. **141**:151-156.
- Lund, T. De Buyser, M-L. & Granum, P. E. (2000). A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. Mol. Microbiol. Lett. **38**:254-261.
- Mäntynen, V. & Lindström, K. (1998). A rapid PCR-based DNA test for enterotoxigenic *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol. **64**:1634-1639.
- Makino, S. I., Iinuma-Okada, Maruyama, T., Ezaki, T., Sasakawa, C. & Yoshikawa, M. (1993). Direct detection of *Bacillus anthracis* DNA in animals by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. **312**:547-551
- Mikami, T.; Horikawa, T.; Murakami, T.; Matsumoto, T.; Yamakawa, A.; Murayama, S.; Katagiri, S.; Shinagawa, K. & Suzuki, M. (1994). An improved method for

- detecting cytostatic toxin (emetic toxin) of *Bacillus cereus* and its application to food samples. FEMS Microbiol. Lett. **119**:53-58.
- Nakamura, L. K. (1998) *Bacillus pseudomycoides* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **48**:1031-1035.
- Nishikawa, Y., Kramer, J. M., Hanaoka, M. & Yasukawa, A. (1996). Evaluation of serotyping, biotyping, plasmid banding pattern analysis, and HEp-2 vacuolation factor assay in the epidemiological investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food poisoning. Int. J. Food Microbiol. **31**:149-159.
- Ombui, J. N.; Schimieger, H.; Kagiko, M. M.; Arimi, S. M. (1997). *Bacillus cereus* may produce two or more diarrheal enterotoxins. FEMS Microbiol. Lett. **149**:245-248.
- Organización Panamericana de la Salud. (1982). Oficina Sanitaria Panamericana, Control sanitario de los alimentos. Discusión Técnica de la XXVIII Reunión del Consejo Directivo de la Organización Panamericana de la Salud. Publicación Científica No. 421. p 10-30. Organización Mundial de la Salud. Washington, D. C.
- Portnoy, B. L., Goepfert, J. M. & Harmon, S. M. (1976). An outbreak of *Bacillus cereus* poisoning resulting from contaminated vegetable sprouts. Am. J. Epidemiol. **103**:589-594.
- Prüß, B. M., Dietrich, R., Nibler, B., Matlbauer, E. & Scherer, S. (1999). The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. Appl. Environ. Microbiol. **65**:5436-5442.
- Raevuori, M., Kiutano, T. & Kiskanen, A. (1977). Comparative studies of *Bacillus cereus* strains isolated from various foods and food poisoning outbreaks. Acta. Vet. Scan. **18**:397-407.
- Reed, G. H. (1994). Foodborne illness (Part 4). *Bacillus cereus* Gastroenteritis. Dairy Food and Environmental Sanitation. **4**:87.
- Schaechter, M., Medoff, G. & Eisenstein, B. I. (1993). Mechanisms of microbial disease. 2nd ed. Williams and Williams ed. p.878-879.

- Schoeni, J. L., Wong, A. C. L. (1999). Heterogeneity observed in the components of haemolysin BL, an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* **53**:159-167.
- Shinagawa, K. (1990). Analytical methods for *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *Int. J. Food Microbiol.* **10**:125-142.
- Simone, A., Bouwer, H., Hertzberger & Mossel, D. A. A. (1982). Quantitative Isolation and Identification of *Bacillus cereus*. p. 255-260. **EN**: The society for applied bacteriology technical isolation and identification methods for food poisoning organisms. Corry, J. L.; Roberts, D. & Skinner, F. A. (eds). Academic Press London.
- Stanley, M. H., Goepfert, J. M. & Reginald, W. B. (1992). *Bacillus cereus*. p. 593-604. **EN**: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Compiled by the APHA Technical Microbiological Methods for foods. Vanderzant, C. & Splittstoesser, D. F. American Public Health Association.
- Sutherland, J. P., Aherne, A. & Beaumont, A. L. (1996). Preparation and validation of growth model for *Bacillus cereus* the effects of temperature, pH, sodium chloride and carbon dioxide. *Int. J. Food Microbiol.* **30**:359-372.
- Tumball, P. C. B., Kramer, J. M. & Melling, J. (1990). *Bacillus*. p.187-210. **EN**: Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity. Parker, M. T. and Duerden, B. I. (eds). 8th ed. Vol 2. Edwards Arnold.
- Valero, M. Fernández, P. & Salmerón M. C. (2003). Influence of pH and temperature on growth of *Bacillus cereus* in vegetable substrate. *Int. J. Food Microbiol.* **82**:71-79.
- Vázquez, S. C.; Quiñones, R. E. I. & Moreno, T. C. (1998). Bacilos Gram positivos Esporulados. **EN**: Bacteriología Médica. Lugo, F. G. Ediciones Cuellar.
- Yokoyama, K.; Ito, M. & Agata, N. (1999). Pathological effect of cerulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus*, is reversible in mice. *FEMS Immunol Med. Microbiol.* **24**:115-120.

Zwietering, M. H.; de Wit, J. C. & Notermans, S. (1996). Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurized milk at the point of consumption. Int. J. Food Microbiol. 30:55-70.

11. APENDICE

GELOSA NUTRITIVA

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Extracto de carne	3.0
Peptona	5.0
Agar	15.0

PREPARACION:

Disolver los ingredientes por calentamiento en un litro de agua destilada. Esterilizar a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Enfriar a 50°C y distribuir en tubos inclinados.

AGAR MANITOL YEMA DE HUEVO

Fórmula en gramos por 900 mL de agua destilada

Extracto de carne	1.0
Peptona	5.0
d-Manitol	10.0
Cloruro de Sodio	10.0
Rojo de Fenol	0.025
Agar	15.0

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

PREPARACION:

Disolver los ingredientes en 900 mL de agua destilada y ajustar el pH a 7.1 ± 0.2 , esterilizar a 121°C (15 libras de presión), durante 20 minutos, enfriar a ± 1 °C y agregar 100 mL de la solución B y un mililitro de la solución C. mezclar y distribuir en cajas de petri estériles. Las placas pueden ser almacenadas durante 7 días a 4°C.

SOLUCION B

Preparar una emulsión de yema de huevo estéril y de esa adicionar 100 mL por cada 900 mL de medio base.

SOLUCION C

Sulfato de Polimixina B: a una ampolla que tenga 500,000 U.I. o 50 mg por vial adicionar en condiciones asépticas 5 mL de agua destilada estéril y de esta solución tomar un mililitro por cada litro de agar base.

AGUA PEPTONADA

(Diluyente)

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Peptona	1.0
Agua destilada	1000 mL

PREPARACION:

Disolver los ingredientes y esterilizar a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Peptona de caseína	10.0
Cloruro de Sodio	10.0
Rojo de Fenol	0.025
pH final 7.4 ± 0.2	

PREPARACION:

Disolver los ingredientes, agregar de 5 a 10 gramos del carbohidrato que se desee utilizar.

Para investigar la formación de gas, emplear campanas de Durham. Esterilizar a $116 - 118^{\circ}\text{C}$ (no más de 12 libras de presión) durante 15 minutos.

LECHE TORNASOLADA

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Leche descremada en polvo	100.0
---------------------------	-------

Tornasol (litmus)	0.75
-------------------	------

pH final 6.08 ± 0.2 ,

PREPARACION:

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Distribuir en tubos y esterilizar a 121°C (15 libras de presión), durante 15 minutos.

REDUCCIÓN DE NITRATOS A NITRITOS

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Extracto de carne	3.0
Peptona	5.0
Nitrato de Potasio	1.0

PREPARACION:

Disolver los ingredientes por calentamiento en un litro de agua destilada, hasta que la mezcla tenga una apariencia cristalina ajustar el pH a 7.0 ± 0.1 .

Distribuir en proporciones de 5 mL en tubos de 13 X 100 con tapón de rosca.

Esterilizar a 121°C (15 libras de presión), durante 15 minutos.

VOGES-PROSKAUER Y ROJO DE METILO

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Mezcla de peptonas	7.0
Dextrosa	5.0
Fosfato de Potasio	5.0
pH final 7.0 ± 0.2	

PREPARACION:

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada, mezclar bien si es necesario calentar un poco hasta disolverlos, distribuir y esterilizar entre 118-121°C (no más de 15 libras de presión), durante 15 minutos.

HIDRÓLISIS DEL ALMIDON

Fórmula en gramos por un litro de agua destilada

Extracto de carne	3.0
Peptona	5.0
Almidón de maíz	10.0
Agar	15.0

PREPARACION:

Suspender homogéneamente el almidón en 100 mL de agua destilada hasta eliminar cualquier grumo. Disolver por otra parte los demás ingredientes en 900 mL de agua destilada con calentamiento y agitación continua. Ajustar el pH a 7.2 ± 0.1 . Mezclar la suspensión de almidón al medio base y agitar hasta completa homogeneización. Esterilizar a 115°C (15 libras de presión), durante 15 minutos.

COLORANTE DE GIEMSA

Colorante de Giemsa	1.0 g
Glicerol a 38°C	54 mL
Metanol absoluto	84.0 mL

PREPARACION:

Mezclar los ingredientes hasta disolución del colorante.

Filtrar y conservar en frasco ámbar.

MEDIO PARA CULTIVO CELULAR.

Medio mínimo esencial con glutamina	10 mL
Suero fetal de bovino	5 mL
Sol. de penicilina-estreptomicina 10,000 U/ μ g/mL	1 mL
Regulador de pH HEPES 1M	1.0 mL
Bicarbonato de sodio al 7.5%	0.5 mL
Agua tridestilada y desionizada estéril c.b.p.	100.0 mL

Añadir la mezcla de antibióticos luego de haber realizado una prueba de esterilidad durante 48 h.

SOLUCIÓN DE PUCKS 1X (DISGREGACIÓN CELULAR)

NaCl	8.0 g
KCl	0.40 g
NaHCO ₃	0.35 g
EDTA	0.366 g
Agua desionizada estéril	1000 mL

PREPARACION:

Mezclar los ingredientes en el orden que aparecen en 500 mL de agua desionizada y estéril, hasta disolución.

Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 µm y conservar en refrigeración.

CALDO BHI-ARROZ

Caldo BHI	1000 mL
Arroz	30 g

PREPARACION:

Mezclar y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 120°C. Una vez frío envasar, en condiciones de esterilidad, en tubos de ensaye en cantidades de 10 mL por cada tubo.

TRATAMIENTO DE MATERIAL PARA CULTIVO CELULAR

MATERIAL DE VIDRIERÍA

Primer día: Extrán al 10%

Segundo día: Hipoclorito de sodio al 10%

Tercer día: Acido clorhídrico al 2%

Cuarto día: Agua destilada

MATERIAL DE PLÁSTICO Y BAQUELITA

Primer día: Extrán al 10%

Segundo día: Agua destilada.