



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE UNA CEPA BACTERIANA  
ASOCIADA A *Magnolia dealbata* Zucc. POR SU CAPACIDAD  
PARA PRODUCIR UN ANTIBACTERIANO”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**ANA MARÍA MANTEROLA MORALES**

DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL

DRA. ELIA ROLDÁN REYES

DIRECTOR

ASESOR INTERNO



2011



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

*“Cuando quieres algo, todo el universo conspira para que realices tu deseo.”*

**Paulo Coelho**

# Agradecimientos

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual directa o indirectamente participaron varias personas, a las que les debo en gran parte mi continuo desarrollo en el aspecto personal y académico.

A mis padres, Sonia e Ismael, por el constante respaldo y dirección, por todo su amor y por contagiarme de sus mayores fortalezas.

A mis hermanos de sangre, Emma y Pablo, que también han sido mis mejores amigos y buenos consejeros.

A mi director de tesis, Dr. Sergio Sánchez Esquivel, por dejarme formar parte de su grupo de trabajo, brindarme su apoyo incondicional y fomentar en mí el entusiasmo por la investigación científica. Encontré en él a un gran amigo y un invaluable ejemplo a seguir.

A mi asesora, Dra. Elia Roldán Reyes, por su enseñanza, buenos consejos y por brindarme su amistad.

A mis hermanos de corazón e inseparables amigos, Daniel, Mike, Ofelia, Sam, Kary, Paty, Ady, Grace, Karla, Luis y Andy, por los mejores recuerdos.

Al grupo de trabajo del Dr. Sergio Sánchez, por ser excelentes amigos y compañeros de Laboratorio: Betty, Adán, Silvia, Brenda, Yolis, Mariana, Tere, Alba, Diana, Víctor, Mauricio, Ceci y Allan... también por las tertulias anti-estrés!

A la Dra. Beatriz Ruiz Villafán, Esp. en Biot. Marco Antonio Ortiz Jiménez y al Dr. Israel García Cano por su gran contribución al presente trabajo.

A todos mis maestros que aportaron a mi formación.

A esta hermosa Universidad, UNAM, porque aquí he vivido la mejor etapa de mi vida.

Ana M.

# ÍNDICE

---

<b>I.</b>	Resumen.....	<b>1</b>
<b>II.</b>	Introducción.....	<b>2</b>
<b>III.</b>	Marco Teórico.....	<b>4</b>
<b>IV.</b>	Justificación.....	<b>18</b>
<b>V.</b>	Hipótesis y objetivos	
<b>V. I.</b>	Hipótesis.....	<b>19</b>
<b>V.I.I.</b>	Objetivo General.....	<b>19</b>
<b>V.I.I.I</b>	Objetivos Particulares.....	<b>19</b>
<b>VI.</b>	Materiales y métodos.....	<b>20</b>
<b>VII.</b>	Resultados y discusión.....	<b>39</b>
<b>VIII.</b>	Conclusiones.....	<b>71</b>
<b>IX.</b>	Anexo I.....	<b>72</b>
<b>X.</b>	Anexo II.....	<b>75</b>
<b>XI.</b>	Referencias.....	<b>79</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
I. Estructura química de honokiol y magnolol.....	12
II. Estructura secundaria del ARNr 16S.....	17
III. Ixhuacán de Los Reyes, Veracruz.....	21
IV. Mapa del sitio de colecta.....	21
V. Esquema de la prueba de antibiosis por estría cruzada.....	23
VI. Tarjeta reactivo del equipo Vitek 2.....	28
VII. Equipo Vitek 2 (Biomérieux).....	28
VIII. Ciclo de amplificación en Termociclador.....	30
IX. Mapa y puntos de referencia en la secuencia, pGEM-T Easy Vector.....	31
X. Modelo de antibiosis.....	39
XI. Patrones de inhibición observados.....	40
XII. Efecto inhibitorio de la cepa 1B frente a otros microorganismos.....	42
XIII. Fotografía de las tinciones de Gram, vistas al microscopio óptico.....	43
XIV. Micrográficas utilizando el Microscopio Electrónico de Barrido.....	44
XV. Fotografía de los resultados de la galería API 50 CH.....	46
XVI. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra el ADN genómico de las cepas bacterianas 1B y 2B.....	48
XVII. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra los productos de PCR. Banda de $\approx$ 1500 pb, correspondiente al ADNr 16S bacteriano.....	49
XVIII. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Extracción de ADN plasmídico de colonias de <i>E. coli DH5<math>\alpha</math></i> transformadas.....	50
XIX. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de la digestión de plásmidos recombinantes con enzima Eco RI.....	51
XX. Secuencia del ADNr 16S (1535 pb) de la cepa bacteriana 1B.....	52
XXI. Secuencia del ADNr 16S (1547 pb) de la cepa bacteriana 2B.....	53
XXII. Alineamiento del gen 16S bacteriano en Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) de la cepa bacteriana 1B.....	54
XXIII. Alineamiento del gen 16S bacteriano en Ribosomal Database Project (RDP) de la cepa bacteriana 1B.....	54
XXIV. Alineamiento del gen 16S bacteriano en Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) de la cepa bacteriana 2B.....	55

<b>XXV.</b>	Alineamiento del gen 16S bacteriano en Ribosomal Database Project (RDP) de la cepa bacteriana 2B.....	<b>55</b>
<b>XXVI.</b>	Cultivos líquidos y sólidos de las cepas de <i>S. marcescens</i> en medio PGA (Peptona Glicerol Agar) para la biosíntesis del pigmento rojo.....	<b>58</b>
<b>XXVII.</b>	Cinética de crecimiento de <i>S. marcescens</i> y <i>B. weihenstephanensis</i> .....	<b>59</b>
<b>XXVIII.</b>	Pruebas positivas de proteasas, bacteriocinas, surfactante y DNasa.....	<b>62</b>
<b>XXIX.</b>	Perfil electroforético.....	<b>64</b>
<b>XXX.</b>	Zimograma, gelatina 0.1%.....	<b>65</b>
<b>XXXI.</b>	Zimograma, <i>M. lysodeikticus</i> 0.2%.....	<b>66</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>I.</b>	Composición de la galería API 50CH.....	<b>26</b>
<b>II.</b>	Mezcla de reacción, PCR.....	<b>30</b>
<b>III.</b>	Mezcla de la reacción, ligación.....	<b>32</b>
<b>IV.</b>	Mezcla de reacción, restricción con EcoRI.....	<b>33</b>
<b>V.</b>	Resultados de las pruebas API 50 CH, medio CHB/E.....	<b>47</b>
<b>VI.</b>	Composición de las muestras cargadas a cada gel SDS-PAGE.....	<b>63</b>
<b>VII.</b>	Promedio de los halos de inhibición en ensayos de difusión en agar empleando las fracciones cargadas a cada gel SDS-PAGE.....	<b>68</b>





## Resumen

Los microorganismos viven en ambientes naturales, donde su crecimiento es afectado tanto por las interacciones con otras poblaciones como por las características físicas y químicas de su entorno. Consecuencia de esas interacciones, se originan productos naturales que pueden ser producidos a partir del metabolismo primario o secundario de los microorganismos, los metabolitos secundarios con actividades biológicas variadas juegan un papel importante en su sobrevivencia. Se estudió la actividad antimicrobiana de microorganismos asociados a diversas estructuras de *Magnolia dealbata* Zucc. muestreadas en la región central del estado de Veracruz, México. Se aislaron 52 hongos y 55 cepas bacterianas, de las cuales trece mostraron actividad para inhibir el crecimiento de otros microorganismos. El presente estudio abundó en la identificación de dos cepas bacterianas, una de ellas productora de un efecto inhibitorio frente a bacterias Gram negativas y positivas (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*); y un microorganismo de crecimiento masivo que se identificó más tarde como *B. weihenstephanensis*. El análisis de la secuencia nucleotídica del gen 16S identificó a la cepa productora de dicho efecto antibacteriano como una especie no pigmentada de *Serratia marcescens*. Los experimentos realizados muestran que el efecto bactericida por parte de la misma reside sólo cuando se encuentra en contacto con el microorganismo sensible. Se realizaron pruebas de los metabolitos producidos por *S. marcescens* que han sido reportados por otros autores y las pruebas fueron positivas a presencia de proteasas, DNasa, bacteriocinas, actividad lítica y biosurfactante. Los resultados de experimentos empleando zimografías SDS-PAGE muestran que la actividad proteolítica está dada por moléculas asociadas a membrana y citosol con tamaños aproximados a 60 kDa y que la actividad lítica, evidenciada por la acción de dos proteínas de pesos moleculares aproximados a 32 y 38 kDa, posiblemente sea la responsable del efecto antibacteriano encontrado en este estudio.

Los microorganismos, también denominados microbios, son seres vivos diminutos que individualmente suelen ser demasiado pequeños para ser observados a simple vista. El grupo incluye a bacterias, hongos, protozoarios y algas microscópicas (Tortora et al., 2007).

Los microorganismos pueden ser considerados en términos generales en base a dos criterios que son antagónicos. Uno corresponde a la producción de compuestos biológicamente activos que actúan a favor del bienestar de la población y otro completamente distinto que corresponde a los efectos perjudiciales que ocasionan, directamente asociados a la producción de enfermedades, tanto en el hombre como en los animales, y que también se pueden extender al deterioro producido sobre alimentos y materiales diversos.

El uso de antimicrobianos es parte del principio de un gran investigador de la microbiología, Paul Ehrlich, quien tuvo una idea que para ese momento fue toda una revolución. Él hablaba de una “bala mágica”; su concepción tan particular era una situación similar a lo que hace una bala, pero capaz de matar a microorganismos dentro de un organismo sin causarle daño. Este concepto nació a principios del siglo XX, cuando apenas se había conocido la existencia de los microorganismos. Indudablemente Ehrlich inició y desarrolló el camino de los agentes quimioterapéuticos (Romero, 2007).

En 1928, Alexander Fleming comenzó la era de los medicamentos antimicrobianos cuando descubrió en una placa de Petri sembrada con *Staphylococcus aureus*, que un compuesto producido por un moho mataba a las bacterias. El microorganismo fue identificado como *Penicillium notatum*, el cual produjo un agente activo al que se le denominó penicilina (Demain & Sanchez, 2009).

Más tarde, la penicilina fue aislada como un polvo de color amarillo y utilizada como un potente compuesto antibacteriano durante la Segunda Guerra Mundial. Empleando el método de Fleming, otras sustancias de origen natural, tales como cloranfenicol y estreptomicina, fueron aislados posteriormente (*Demain & Sanchez, 2009*).

Los microorganismos viven en ambientes naturales, donde su crecimiento es afectado tanto por las interacciones con otras poblaciones como por las características físicas y químicas de su entorno. Consecuencia de esas interacciones, se producen productos naturales con aplicaciones industriales que pueden ser producidos a partir del metabolismo primario o secundario de los organismos vivos (plantas, animales o microorganismos). Los metabolitos secundarios, con actividades biológicas variadas, juegan un papel importante en su sobrevivencia en el medio ambiente en que habitan (*Manzi y Mayz, 2003*).

En las últimas 2 décadas, la investigación en la academia y la industria ha hecho uso de la biología molecular, la genética y la genómica comparativa, lo que ha llevado al desarrollo de tecnologías clave para el descubrimiento de nuevos agentes antibacterianos. El objetivo primordial de todos los métodos en uso hoy en día es descubrir compuestos químicos nuevos con novedosos mecanismos de acción frente a patógenos resistentes a los antimicrobianos (*Pathania & Brown, 2008*).

Uno de los objetivos de los microbiólogos es comprender los procesos que ocurren en los sistemas microbianos y, a través de éste conocimiento, diseñar métodos mediante los cuales su efecto benéfico pueda ser aumentado y el perjudicial reducido.

El descubrimiento y desarrollo de la penicilina como un fármaco útil en la práctica clínica en las décadas de los años 30 y 40's abrió la puerta a la utilización de microorganismos como fuente de moléculas naturales, que en el mejor de los casos podían ser usados directamente como fármacos, o constituir puntos de partida para el desarrollo de derivados sintéticos o semi-sintéticos con potencial para llegar a fase clínica. Es así como los microbios han hecho una contribución notable a la salud de los humanos y a su bienestar a través de la historia, pues además de producir metabolitos primarios como son las vitaminas, aminoácidos y nucleótidos, son capaces de hacer metabolitos secundarios. Estos metabolitos son compuestos de bajo peso molecular que son sintetizados generalmente en la fase tardía del crecimiento y aun cuando parecen no ser necesarios para el desarrollo de los mismos, les confieren ventajas de supervivencia en su hábitat (*Madigan et al., 2009; Demain & Sánchez, 2009*).

Las posibles interacciones (antagónicas, sinérgicas, etc.) entre los microorganismos y otros sistemas vivientes a través de sus metabolitos secundarios es enorme, y las mismas constituyen una fuente inagotable para la obtención de nuevos metabolitos activos. El estudio de estas interacciones ha posibilitado que en la actualidad se conozca un gran número de metabolitos secundarios de origen microbiano y de naturaleza diferente a los antibióticos, que presentan un variado espectro de actividades biológicas, entre los que se incluyen: inhibidores enzimáticos, agentes farmacológicos e inmunológicamente activos, toxinas, pesticidas, herbicidas, antiparasitarios, hormonas, factores de crecimiento, ionóforos, antioxidantes, biosurfactantes y radioprotectores, que han servido de sustento a la industria agrícola, farmacológica y biotecnológica (*Brizuela et al., 1998; Manzi & Mayz, 2003*).

Debido a las mejoras técnicas en los programas de detección y aislamiento, el número de compuestos naturales descubiertos excede 1 millón, del 50-60% son producidos por plantas (alcaloides, flavonoides, terpenoides, esteroides, carbohidratos, etc.) y un 5% tienen origen microbiano. A la fecha han sido aislados unos 22, 500 compuestos con actividad biológica a partir de los sistemas microbianos; de entre ellos, un 45% son producidos por actinomicetos, un 38% por hongos y un 17% por bacterias unicelulares. De los 25 fármacos mejor vendidos en el año de 1997, 42% fueron productos naturales y sus derivados, de éstos, un 67% fueron antibióticos (*Demain & Sánchez, 2009*).

En los últimos 60 años, el desarrollo de drogas antibacterianas ha sido enfocado generalmente a dos principales estrategias: (i) el descubrimiento de compuestos a partir de fuentes naturales (en particular bacterias del suelo del grupo de los actinomicetos y hongos) y (ii) el desarrollo de moléculas antimicrobianas sintéticas. La mayoría de los antibióticos de uso frecuente hoy en día fueron descubiertos a mediados del siglo pasado, incluyendo a los  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, aminocumarinas, tetraciclinas, ionóforos, glicopéptidos y sus derivados semisintéticos. Estos productos químicos naturales que representan un bloque importante en la mayoría de antibióticos usados hoy en día en la clínica y agricultura, forman parte de la moderna quimioterapia anti-infecciosa (*Taylor & Wright, 2008*).

Los microorganismos productores de compuestos con actividad biológica han sido aislados de diferentes fuentes naturales incluyendo la tierra, el agua, el aire y las plantas (*Demain & Sánchez, 2009*). Además de la microbiota que poseen, las plantas por sí solas han proporcionado una fuente de inspiración para la síntesis de medicamentos nuevos, ya que poseen una capacidad casi ilimitada para sintetizar compuestos aromáticos, la mayoría de los cuales son fenoles. Muchos de ellos son metabolitos secundarios, de los cuales al menos 12, 000 han sido aislados. En muchos casos, estas sustancias funcionan como un mecanismo de defensa de la misma planta en contra de la depredación de microorganismos, insectos y herbívoros. Algunos, como los

terpenoides, proveen a las plantas de aromas; otros (quinonas y taninos) son responsables de la pigmentación de la planta. Muchos compuestos son responsables del sabor de las plantas (por ejemplo, el terpenoide capsaicina de los chiles), y algunas de las mismas hierbas y especias son usadas por los seres humanos para la producción de alimentos y compuestos medicinales útiles (Murphy, 1999).

Todas las especies vegetales soportan el crecimiento de una diversidad importante de microorganismos, especialmente bacterias y hongos, asociada a la filósfera, la cual conforma lo que conocemos como microflora epífita. Estos microorganismos epífitos se desarrollan en un ambiente muy hostil, básicamente a expensas de los pocos nutrientes que exuda la planta. Su supervivencia depende en buena parte de su adaptación a condiciones ambientales extremas tales como amplias fluctuaciones en la disponibilidad de agua, estrés osmótico, cambios de temperatura y exposición a radiación UV. Existe una gran cantidad de poblaciones microbianas asociadas a estos nichos, debido a que el hábitat aéreo creado a partir de la filósfera proporciona una serie de nichos microbianos relativamente complejos, los cuales frecuentemente superan el área de colonización de la superficie del suelo (Medina et al., 2009).

En cuanto a los microorganismos endófitos, existen reportes científicos en los que mencionan que la presencia de éstos en la raíz de plantas como la caña de azúcar y el arroz, entre otras, promueven el crecimiento, debido a que participan en la asimilación y solubilización de nutrientes (incluidos nitrógeno y fósforo), y también por producir reguladores de crecimiento de las plantas (auxinas, citocininas y etileno). Por otra parte, el hecho de que organismos endófitos colonicen nichos ecológicos similares a los buscados por los microorganismos fitopatógenos los convierte en agentes potenciales para el control biológico, pues la inhibición del desarrollo de enfermedades ocurre a través de la activación de mecanismos de defensa intrínsecos de la planta (resistencia inducible sistémica) promovidos por la presencia del endófito, así como por la producción de una variedad de sustancias químicas que controlan al patógeno,

incrementando con esto la protección y la capacidad de sobrevivencia de la planta. Es claro que el grado de predominancia de estos mecanismos tiene consecuencias para la ecología evolutiva de las relaciones huésped-endófito-patógeno (Martínez et al., 2010).

Además de la capacidad natural que poseen las plantas para generar metabolitos secundarios, existen ciertos microorganismos endófitos que pueden producir los compuestos químicos que elabora su hospedero e incorporar la síntesis de éste como parte de su metabolismo. Tal es el caso de *Taxomyces andreanae*, hongo endófito del árbol *Taxus brevifolia* (tejo del Pacífico), árbol de lento crecimiento encontrado en suelos húmedos cerca de corrientes y lagos en ciertas regiones del Pacífico noroeste. En estudios hechos sobre cultivos viejos de *T. andreanae* se comprobó por espectrometría de masas, inmunoquímica, métodos cromatográficos y técnicas radioquímicas la presencia de taxol y taxanos (Stierle et al., 1993).

El taxol ha mostrado actividad antitumoral frente a padecimientos de cáncer de ovario y mama. Como se mencionó antes, Stierle y colaboradores (1993) comprobaron que al igual que el árbol *Taxus brevifolia*, su hongo endófito *Taxomyces andreanae* produce taxol y derivados como parte natural de su metabolismo (Demain & Sanchez, 2009). Esto es importante, ya que la fuente primaria de este compuesto es el interior de la corteza (floema- cambium) de *T. brevifolia* y sólo del 0.01 al 0.03% del peso seco del floema es taxol, sin embargo, se requieren hasta 2g de taxol purificado para un régimen completo de tratamiento antitumoral. El tema del suministro se complica aún más por la escasez del árbol de tejo. 11 especies del género *Taxus* sintetizan taxol, en ambientes naturales los árboles son a menudo pequeños y situados en zonas remotas (Stierle et al., 1993).

La búsqueda de microbios asociados al tejo que sean capaces de producir taxol está justificada por el hecho de que microorganismos asociados a plantas, pueden producir compuestos que elaboran las mismas, como las giberelinas. Las rutas de la biosíntesis de las giberelinas en hongos y plantas superiores son idénticas (Stierle et al., 1993).

Un factor fundamental para el renovado interés de los antimicrobianos de plantas en los últimos 20 años, ha sido el rápido ritmo de las especies en peligro de extinción. Hay una disciplina científica conocida como etnobotánica o etnofarmacología, cuyo objetivo es utilizar la impresionante gama de conocimientos reunidos por los pueblos indígenas acerca de productos animales y vegetales que han sido usados para mantener la salud (Murphy, 1999).

Productos naturales con aplicación industrial pueden ser formados a partir del metabolismo primario o secundario de los organismos vivientes (plantas, animales o microorganismos). El papel de los microorganismos en la producción de antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas ha sido dramático. Sin embargo, el desarrollo de resistencia hacia los mismos por parte de los microorganismos patógenos, se ha convertido en un gran problema de salud a nivel mundial. Por tal motivo cada día son necesarios nuevos antimicrobianos para reemplazar a los actuales en el combate contra los microorganismos dañinos para el hombre. Los microbios patógenos causan unos 17 millones de muertes al año e innumerables enfermedades que afectan el crecimiento económico, desarrollo y la prosperidad de nuestra sociedad a nivel mundial (Taylor & Wright, 2008).

La búsqueda de microorganismos con capacidad para generar biomoléculas antibacterianas de interés industrial consiste en evaluar individualmente las sustancias excretadas por el microorganismo en el medio. Diferentes métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos, pero estos no son igualmente sensibles o no se basan en los mismos principios, permitiendo que los resultados sean influenciados por el método seleccionado, los microorganismos usados y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado (Ramírez y Castaño, 2009).

Los métodos para evaluar la actividad antibacteriana están clasificados, en tres grupos principales: Métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía, un cuarto método es el análisis conductimétrico, el cual detecta el crecimiento microbiano



como un cambio en la conductividad eléctrica o impedancia del medio de cultivo. En general se propone usar los métodos de difusión (en papel o en pozo) para estudiar compuestos polares, y los métodos de dilución para sustancias polares y no polares. La concentración de bacterias usada para el estudio de susceptibilidad en el laboratorio ha sido estandarizado en  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias (ufc)/ml, lo cual equivale a un patrón de 0.5 en la escala de Mac Farland. Es recomendable tomar el inóculo de cultivos en la fase exponencial de crecimiento y siempre tomar 4 o 5 colonias de un cultivo puro para evitar seleccionar variantes atípicas (*Ramírez y Castaño, 2009*).

Los medios de cultivo más utilizados en dichas técnicas son el agar Mueller Hinton y agar tripticasa soya, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras. Algunos investigadores utilizan el Agar Nutritivo (*Ramírez y Castaño, 2009*).

## Familia Magnoliaceae

El nombre de la familia fue dado en honor a Pierre Magnol, un profesor de botánica y medicina en Montpellier, Francia (1638-1715). Esta familia engloba alrededor de 220 especies de árboles caducifolios o perennifolios y arbustos clasificados en 7 géneros, nativos de Asia y América, con largas y ostentosas flores que contienen las partes reproductivas femeninas y masculinas. Las especies de esta familia son muy bien conocidas por su importancia en la horticultura y las de algunos géneros por su uso en la medicina tradicional, las especies son originarias en su mayoría de las regiones templadas del Hemisferio Norte, extendiéndose hasta las zonas tropicales de Asia y América. Aproximadamente el 80% de estas especies están distribuidas en zonas templadas y tropicales del sureste de Asia, desde el este de los Himalayas hasta Japón y hacia la parte sur del Archipiélago Malayo hasta Nueva Guinea y Nueva Bretaña. El 20% restante se encuentra en América, desde el templado sureste del norte de América hasta Brasil en la América tropical. Todas las especies de América pertenecen a tres géneros: *Magnolia*, *Talauma* y *Liriodendron*, que además se encuentran en Asia y presentan distribuciones discontinuas e independientes. Registros fósiles indican que la familia estuvo antiguamente mucho más distribuida en el Hemisferio Norte, en Groenlandia y Europa (*Watanabe et al., 2002*).

El género *Magnolia* contiene varias especies de importancia médica debido a que es fuente de diversos compuestos biológicamente activos. Existen numerosos estudios relacionados con la presencia de metabolitos secundarios, en particular de *M. obovata*, *M. biondii* y *M. officinalis*, abundando en los componentes químicos de ésta última, ya que es una de las plantas medicinales importantes en la medicina tradicional China y Japonesa (*Sarker & Maruyama, 2002*).

Varias especies de este género, algunas provenientes del lejano este de Asia, han sido usadas tradicionalmente para tratar varias enfermedades. Debido a su versatilidad de aplicaciones (antifúngicos, antimicrobianos e insecticidas) y a que se concentran en corteza y hojas de la *Magnolia*, recientemente se les ha incorporado de manera satisfactoria a los fármacos comerciales. Algunas otras especies producen maderas valiosas y muchas otras se cultivan con fines ornamentales por la belleza de sus flores (López y Sánchez, 1998).

### **Compuestos activos de especies del género *Magnolia***

En distintas especies del género *Magnolia* se han desarrollado varios estudios dando como resultado el aislamiento de componentes bioactivos, particularmente compuestos bifenólicos como el honokiol y magnolol (*Figura 1*). Existen diversas formas en las que el honokiol puede tener un beneficio terapéutico, incluyendo su capacidad para comportarse como un relajante muscular, tener efectos anti-inflamatorios, antimicrobianos y actividad antioxidante. En la actualidad, ha quedado demostrado con múltiples estudios que el honokiol posee actividad como anticancerígeno (Leeman, 2002). Por otro lado, se sabe que el magnolol posee actividad antitumoral, efecto anti-inflamatorio y analgésico (Sarker & Maruyama, 2002).

La corteza de *Magnolia officinalis* contiene tres grupos de compuestos biológicamente activos, alcaloides, aceites esenciales y bifenoles (Sarker & Maruyama, 2002). La determinación cuantitativa por métodos analíticos diferentes, muestran que el contenido de honokiol y magnolol en la corteza del tallo es de 2- 11% y de 0.3- 4.6% respectivamente. Se ha observado que la corteza de la raíz contiene más honokiol y magnolol que la corteza del tallo (Sarker & Maruyama, 2002).

*Magnolia schiedeana* y *M. dealbata*, son dos especies endémicas de México, habitantes del bosque mesófilo de montaña, con problemas de extinción, según la NOM-059-ECOL-2001. Son escasos los estudios afines para estas dos especies, que nos lleven a un aprovechamiento fitosanitario de las mismas. Estudios previos han analizado la actividad biológica de extractos crudos (de etanol y acetato de etilo) en modelos bacterianos. Los resultados obtenidos abren la posibilidad de que los extractos de polifolículo y semilla, puedan ser empleados como fuentes de sustancias bioactivas para el control de especies fitopatógenas (Kotani *et al.*, 2005).

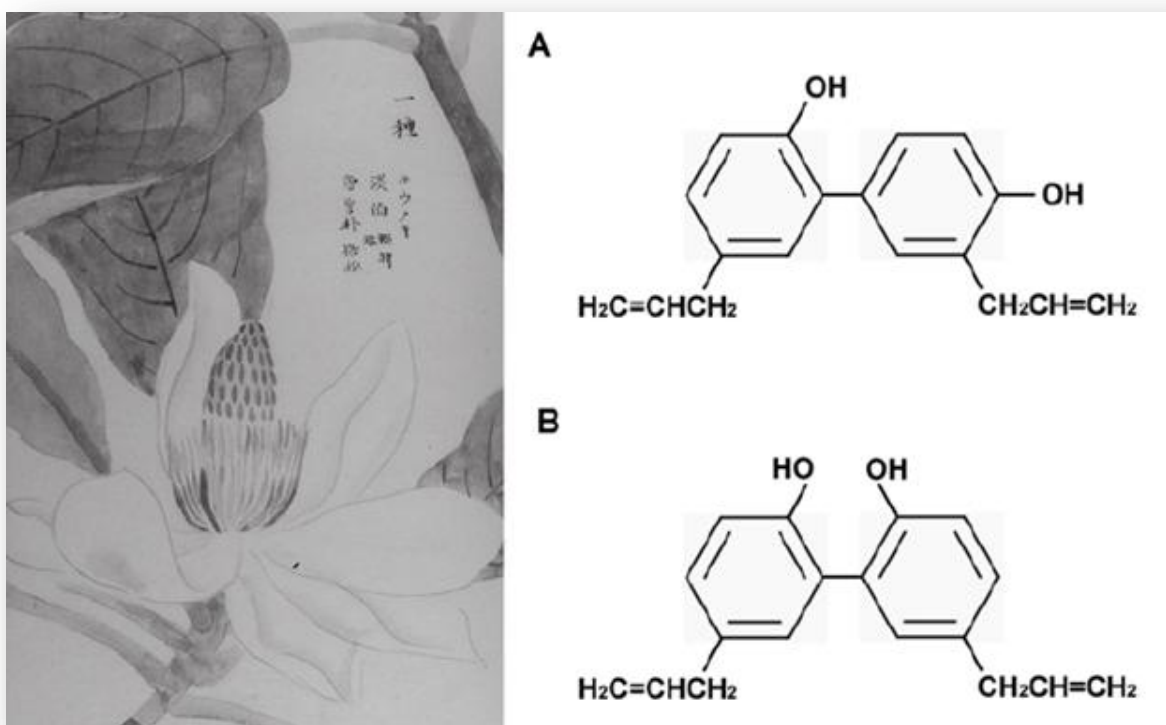


Figura 1. Pintura de *Magnolia obovata*, tomada de un viejo libro japonés de plantas medicinales, pintada cerca de 100 años atrás. Estructura química de honokiol (A) y magnolol (B) (Jui-Lung *et al.*, 2010; Sarker & Maruyama, 2002).

Martínez *et al.* (2006) evaluaron extractos de *M. dealbata* Zucc. en los cuales demostraron una respuesta ansiolítica, potencia hipnótica, efecto anti-convulsionante y toxicidad.

***Magnolia dealbata* Zucc.**

Esta planta es un elemento propio de los bosques de niebla y endémico de México, las poblaciones se localizan en climas templados entre los 1500 y 1800 metros sobre el nivel del mar (msnm). Los individuos en la naturaleza se restringen solamente a 6 poblaciones, en estados del centro y este de México (Oaxaca, Querétaro, Veracruz, Hidalgo y San Luis Potosí), las cuales se componen de unos cuantos individuos, con excepción de la población de Coyopola en Veracruz. *Magnolia dealbata* es el único representante de la sección Rytidospermum del género en México, tiene afinidades con *M. macrophylla* del Norte de América (USA). Su carácter único ha sido confirmado por estudios moleculares que la separan de manera concreta del resto de las especies nativas de México (Velazco et al., 2008).

*Magnolia dealbata* Zucc. ha sido estudiada taxonómicamente, en aspectos de ecología y distribución, la conservación y estado del hábitat han sido tratados de manera específica por diversos autores. Esta especie está situada en diversas categorías de riesgo en la clasificación nacional e internacional. Actualmente, la legislación mexicana la considera en peligro de extinción en la NOM-059-SEMARNAT-2001 (DOF, 2002) y se encuentra en la categoría E de la IUCN Red Data Book (1980) y en la categoría EN del IUCN Red Data Book (1994). Los factores causales del peligro en el que se encuentra esta especie son la destrucción del hábitat, la producción maderera y la pobre regeneración de su hábitat (Velazco et al., 2008).

*Magnolia dealbata* fue usada en la industria maderera y ha sido usada con propósitos ornamentales, además de su uso en la medicina tradicional mexicana, la corteza y las hojas son usadas para tratar problemas cardiacos, como tranquilizante, anti-convulsionante (Martínez et al., 2006) y antiepiléptico. Existen varios estudios que apoyan la hipótesis de que *M. dealbata* Zucc. posee actividad a nivel del SNC.

En cultivos *in vitro* de *Magnolia dealbata* Zucc. se ha observado la producción de honokiol y magnolol (Domínguez et al., 2009).

La identificación en Microbiología consiste en la asignación de un microorganismo a un taxón según una clasificación establecida.

Un esquema de clasificación proporciona una lista de características y un método de comparación para ayudar a la identificación de un organismo. La mayor parte de los procariontes no poseen características morfológicas distintivas ni siquiera una gran variación en el tamaño y la forma. En consecuencia, los microbiólogos han desarrollado varios métodos para evaluar las reacciones metabólicas y otras características para identificar a los procariontes (*Tortora et al., 2007*).

En microbiología, las características fenotípicas comprenden aspectos morfológicos, metabólicos, fisiológicos, etc. Estos parámetros suelen ser suficientes para la identificación de un microorganismo. Sin embargo, existen casos en los que especies pertenecientes a un mismo taxón son genéticamente diferentes y difíciles de clasificar mediante métodos fenotípicos. Gracias a los avances en las técnicas de biología molecular, actualmente es posible identificar microorganismos por sus características genotípicas. Los métodos más importantes utilizados para este fin incluyen el contenido de G+C, la hibridación ADN-ADN, los patrones de enzimas de restricción, el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), la electroforesis en gel de campo pulsátil (PFGE), diversas técnicas que estudian el polimorfismo de fragmentos amplificados y la secuenciación de ADN del ARN ribosomal (ARNr). Esta última es la mejor manera de comparar las secuencias de ADN de dos o más microorganismos (*Liébana, 2004*).

## Identificación y Taxonomía bacteriana

Para determinar las verdaderas relaciones evolutivas entre organismos, es esencial elegir las moléculas adecuadas para los estudios de secuenciación. Esto es importante por varios motivos. Primero, la molécula debe ser universalmente distribuida en el grupo elegido para ser estudiado. Segundo, deben ser funcionalmente homólogos en cada organismo; las comparaciones filogenéticas deben realizarse con moléculas de idéntica función. Tercero, resulta crucial poder alinear apropiadamente las dos moléculas a fin de identificar regiones tanto con homología como con variación de secuencia. Finalmente, la secuencia de la molécula elegida debería cambiar con una velocidad de cambio molécula lenta; demasiado cambio tiende a enturbiar el registro evolutivo (*Madigan et al., 2009*).

Se han evaluado muchas moléculas como cronómetros moleculares y con ellas se han realizado estudios de comparación de secuencias a fin de generar árboles filogenéticos. Estas moléculas incluyen a varios citocromos, proteínas de hierro y azufre tales como las ferredoxinas, y genes de otras proteínas y de los ARNs ribosómicos. Sin embargo, los genes que codifican los ARNs ribosómicos, componentes clave del sistema de traducción; la ATPasa, complejo enzimático de membrana que puede sintetizar e hidrolizar ATP; y la RecA, proteína requerida para la recombinación genética, son los que han proporcionado la información genética más significativa sobre los microorganismos. Todas estas moléculas probablemente eran esenciales incluso para las células más primitivas y así, la variación de secuencia en los genes que las codifican, permite profundizar en el registro evolutivo. Actualmente los estudios se centran en el estudio del cronómetro molecular más ampliamente utilizado, el ARN ribosómico (*Madigan et al., 2009*).

Debido a la probable antigüedad de la maquinaria sintetizadora de proteínas, y por varias otras razones, los ARNs ribosómicos son moléculas excelentes para discernir las relaciones evolutivas entre los seres vivos. Los ARNs ribosómicos son funcionalmente constantes, están universalmente distribuidos y su secuencia esta

moderadamente bien conservada a través de amplias distancias filogenéticas. Hay tres moléculas de RNA ribosómico, que en procariotas tienen tamaños de 5S, 16S y 23S (“S” indica el coeficiente de sedimentación “Svedberg”). Los ARNr bacterianos grandes 16S y 23S (con aproximadamente 1500 y 2900 nucleótidos, respectivamente) contienen varias regiones de secuencia altamente conservada que resulta útil para obtener alineamientos de secuencia apropiados. Dado que el ARN 16S es más manejable experimentalmente que el 23S, se ha utilizado preferentemente para desarrollar la filogenia y taxonomía en procariotas. El ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1,500 pb, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S). Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el ARNr 16S se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla (*Figura II*). En eucariotas el ARNr 18S es la macromolécula equivalente. Dado que los ARNr 16 y 18S proceden de las subunidades pequeñas de los ribosomas, el acrónimo ARNr SSU (del inglés, *small subunit*) se utiliza para ambos. Los ARNr SSU se encuentran altamente conservados, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contiene además variaciones que se concentran en zonas específicas (*Liébana, 2004*). Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese (Universidad de Illinois) a principios de la década de los 70’s. Los estudios de Woese originaron la división de los procariotas en dos grupos o reinos: *Eubacteria* y *Archaeobacteria*, cuya divergencia es tan profunda como la encontrada entre ellos y los eucariotas. Además, permitieron establecer las divisiones mayoritarias y subdivisiones dentro de ambos reinos. Posteriormente, Woese introdujo el término dominio para sustituir al reino como categoría taxonómica de rango superior, y distribuyó a los organismos celulares en tres dominios: *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*, el último de los cuales engloba a todos los seres eucariotas. Desde entonces, el análisis de los ARNr 16S se ha utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana (*Madigan et al., 2009*).



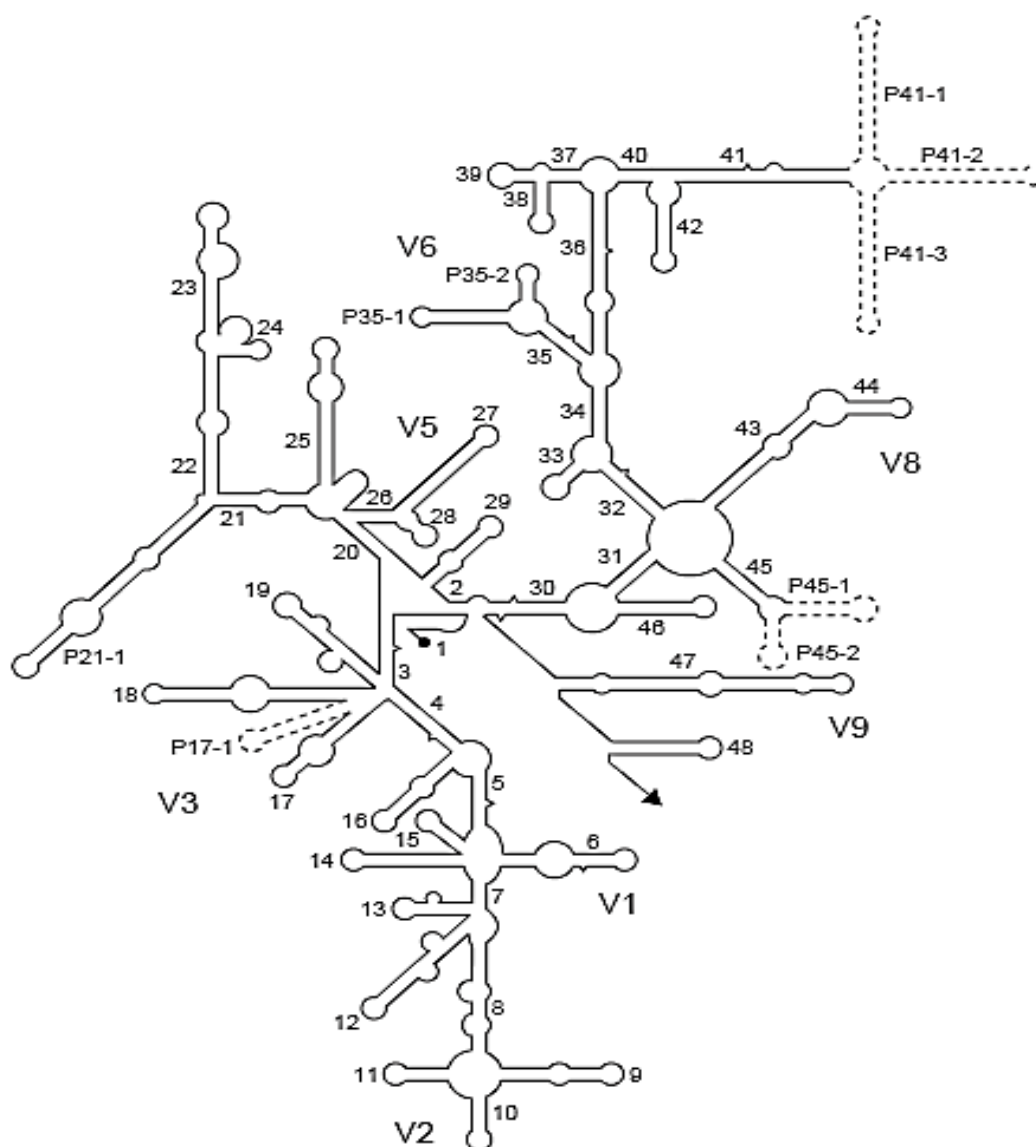


Figura II. Estructura secundaria del ARNr 16S. Las hélices comunes a todos los seres vivos, denominadas hélices universales, se numeran de la 1 a la 48, en orden de aparición a partir del extremo 5'. Las hélices específicas de procariontos se indican con Pa-b, donde a es el número de la hélice universal precedente y b el número de serie. Las regiones relativamente conservadas se presentan en negrita. Las regiones variables, en líneas finas, se designan V1-V9, teniendo en cuenta que V4 es exclusiva de eucariotas. Las regiones que se muestran en líneas discontinuas sólo están presentes en un número limitado de estructuras (Rodicio y Mendoza, 2004).

Dadas las condiciones restringidas de las poblaciones naturales y el bajo número de individuos presentes en ellas, la especie mexicana endémica *Magnolia dealbata* Zucc. está situada en diversas categorías de riesgo en la clasificación nacional e internacional. Esta especie, utilizada en la medicina tradicional mexicana y estudiada desde el punto de vista taxonómico, ecológico, de distribución, conservación y estado del hábitat, ha sido tratada de manera específica por varios autores, así como el análisis de sus extractos. Sin embargo, no hay antecedente alguno del estudio de su microbiota y por tal motivo, éste trabajo pretende dar una aproximación de las especies microbianas asociadas a esta planta medicinal, con potencial para producir compuestos con actividad antibacteriana; y en el mejor de los casos, establecer un antecedente para el aprovechamiento del mismo. Es importante resaltar que la identificación y caracterización de microorganismos aislados de ambientes vegetales, constituyen un potencial para investigaciones aplicadas a la producción de compuestos antibacterianos.

### **Hipótesis**

Alguno de los microorganismos asociados a *Magnolia dealbata* Zucc. mostrará actividad antimicrobiana.

### **Objetivo general**

Aislar microorganismos asociados a distintas estructuras de la especie *Magnolia dealbata* Zucc. por su capacidad para producir compuestos con actividad antibacteriana e identificar alguna(s) cepa(s) de interés.

### **Objetivos particulares**

- Aislar poblaciones microbianas asociadas a la raíz, corteza de tallo, hoja y fruto de *Magnolia dealbata* Zucc.
- Evaluar el potencial de los microorganismos aislados para producir compuestos con actividad antimicrobiana.
- Identificar a las cepas bacterianas de interés, mediante la secuencia de sus genes ADNr 16S y pruebas bioquímicas adicionales.
- Determinar la naturaleza del compuesto antibacteriano.

**Sitio de colecta**

El sitio de colecta se encuentra localizado en las coordenadas siguientes  $19^{\circ} 21' 05.9''$  N y  $97^{\circ} 03' 30.8''$  W (*Figura IV*), entre las localidades de Ixhuacán de los Reyes y Coatepec, en el estado de Veracruz, Méx. a una altura aproximada de 1591 msnm.

Ixhuacán de los Reyes tiene una extensión de  $114.33 \text{ Km}^2$ , se encuentra ubicado en la zona central del estado de Veracruz (*Figura III*), sobre las estribaciones de la Sierra Madre Oriental a una altura aproximada de 1800 msnm, posee un clima templado-regular con una temperatura promedio de  $22.5^{\circ} \text{ C}$ , la precipitación pluvial media anual es de 1,807.3 milímetros. Los ecosistemas que coexisten en el municipio son de tipo perennifolia con especies de palo barranca, álamo, alamillo, ceiba, palo de baqueta, encino blanco, rojo y negro, donde se desarrolla una fauna compuesta por poblaciones de conejos, tlacuaches, ardillas, armadillos, zorras y mapaches. Esta localidad limita al Norte con Xico; al Este con Teocelo y Cosautlán de Carbajal; al Oeste con Ayahualulco y al Sur con el Estado de Puebla (*Arias, 1992*).

Coatepec se encuentra en la zona centro del estado de Veracruz, cercano al Cofre de Perote a una altura de 1200 msnm. Limita al Norte con los municipios de Xalapa, Acajete y Tlalnahuayocan; al Sur con Teocelo, Tlaltetela y Jalcomulco; al Este con Emiliano Zapata y al Oeste con Perote y Xico.



Figura III. Mapa de la República Mexicana. En rojo el estado de Veracruz y en amarillo Ixhuacán de los reyes (Centro Estatal de Estudios Municipales).

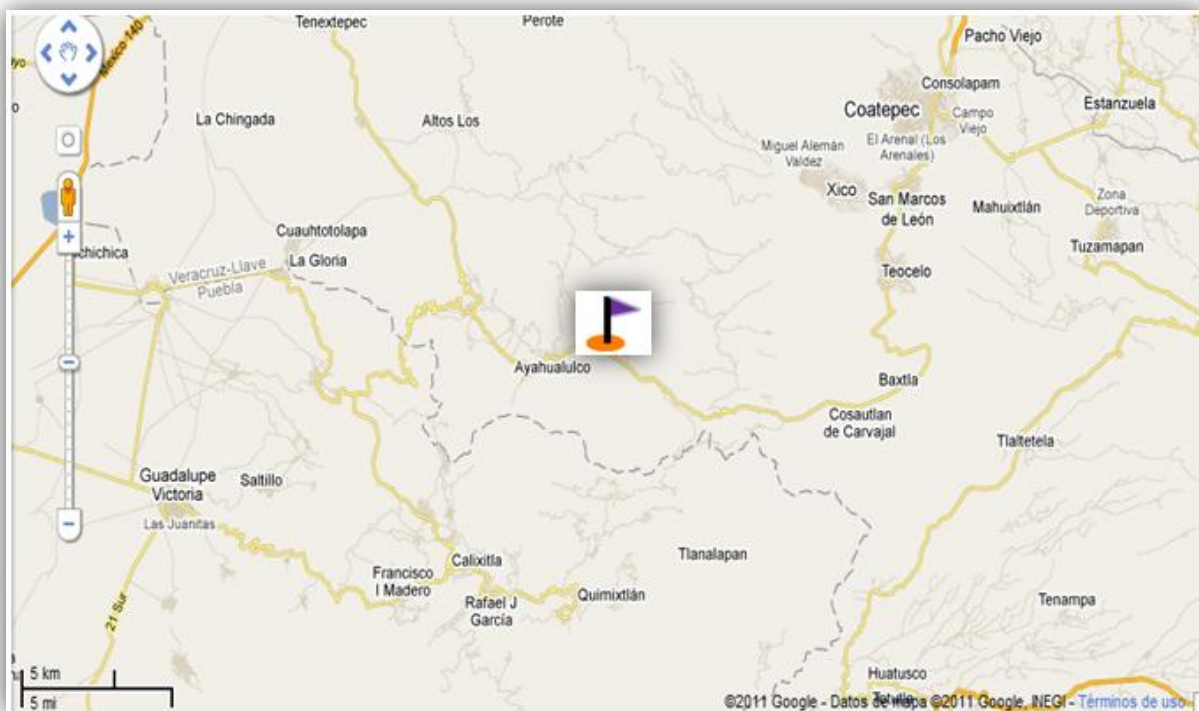


Figura IV. Mapa del sitio de colecta señalando la región de Ixhuacán de Los Reyes. Localidad ubicada en la región central del estado de Veracruz (Google maps. 2011).

### Trabajo de campo y laboratorio

El presente trabajo de campo y laboratorio (inmediato a la colecta) fue realizado por la estudiante de maestría Silvia Margarita Guzmán Trampe en Septiembre del 2009.

Se ubicaron dos ejemplares de la especie *Magnolia dealbata* Zucc. (~3 ½ y ~12 m) entre las localidades antes mencionadas y se tomaron muestras de ramas, hojas, frutos, raíz y corteza del tallo. Las muestras fueron suspendidas en agua estéril y transportadas en ambiente frío. 24 h posteriores a la colecta, las muestras fueron procesadas de la siguiente manera:

- De las hojas, fruto y corteza de tallo, previamente lavadas con jabón y enjuagadas con agua destilada estéril, se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 3 cm de largo. Los fragmentos de hoja se obtuvieron realizando cortes paralelos a la superficie foliar con el fin de exponer el tejido parenquimatoso. En el caso de las muestras lavadas de rama y raíz, éstas fueron cortadas verticalmente por la mitad para dejar expuesto el tejido vascular.
- Los cortes se depositaron en cajas petri con medio Agar Nutritivo (NA, Anexo I) y medio Czapeck-Cloranfenicol 25 µg/ml (Anexo I), para favorecer el crecimiento bacteriano y fungal respectivamente. Las muestras se incubaron 24 h a 29°C para la búsqueda de las bacterias y 7 días para el caso de los hongos, al cabo de los cuales se observó el crecimiento de los microorganismos. El fruto, rama y corteza de tallo, se sembraron del lado opuesto al tejido comúnmente expuesto.
- Transcurridas 24 h, se observó el crecimiento bacteriano y se tomó muestra de aquellas colonias macroscópicamente diferentes entre sí, que lograron crecer lo más cercano al material biológico con el que se inoculó.
- Se realizó una separación parcial y visual de las cepas de hongos y bacterias. A las cepas bacterianas se les realizó tinción de Gram y se observó su morfología al microscopio óptico.

## Pruebas de susceptibilidad microbiana

Con el fin de determinar si las cepas aisladas eran capaces de inhibir el crecimiento de otros microorganismos, se llevaron a cabo pruebas de antibiosis. Para ello se estrió una línea de la cepa microbiana a evaluar, asemejando el diámetro de una caja con medio Agar Nutritivo (NA, Anexo I), se incubó durante 24 h a 29°C, para obtener un buen crecimiento y en su caso una buena producción y difusión del compuesto con actividad antibacteriana.

Transcurrido el tiempo de incubación, se inocularon por estría cruzada 5 microorganismos sensibles (Figura V). Se utilizó una bacteria Gram negativa: *Escherichia coli*, tres Gram positivas: *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus epidermidis* y un eucarionte: la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, previamente cultivada en medio YMA (Yeast Malt Agar, Anexo I). Las cajas se incubaron nuevamente, bajo las condiciones iniciales. Esto favoreció el crecimiento de los microorganismos sensibles y la observación de halos de inhibición, según el caso.



Figura V. Esquema de la prueba de antibiosis por estría cruzada. En rojo se muestra el inóculo del microorganismo a evaluar.

Se analizaron los diferentes patrones de inhibición y se eligieron dos bacterias para su posterior identificación. Una de ellas productora de un compuesto de amplio espectro, así como una que atrajo el interés por su forma de crecimiento masivo.

Se realizó una identificación preliminar del microorganismo mediante la evaluación y observación de características como la morfología colonial y celular, tinción de Gram, tiempo y condiciones óptimas de crecimiento en medio sólido y líquido; así como la secuencia que codifica para la subunidad ribosomal 16S (ADNr 16S). También se emplearon pruebas bioquímicas convencionales, como el sistema API (*Analytical Profile Index*) 50CH.

### **Tinción de Gram**

La tinción de Gram (*Anexo I*), es una tinción diferencial que nos permite distinguir entre dos tipos diferentes de composición de pared bacteriana. En este caso, nos sirvió como una primera aproximación a la identificación de los microorganismos de estudio. Primero se realizó un frotis tomando una pequeña colonia con el asa bacteriológica y se colocó en un portaobjetos sobre una gota de agua, la muestra se fijó con calor. Una vez fijada se aplicó el siguiente método estándar: 1) adición de colorante cristal violeta, durante un minuto. 2) adición del mordiente Lugol, durante tres minutos. 3) adición del agente decolorante Alcohol-Acetona 70: 30, durante 20-30 segundos y 4) adición del colorante de contraste Safranina, durante un minuto. Entre cada uno de los pasos se enjuagó con agua corriente. Una vez hechas las preparaciones se observaron al microscopio óptico de campo claro usando los objetivos 10, 40 y 100X. De acuerdo a la coloración se clasificó en bacteria Gram-positiva (violeta) o Gram-negativa (roja).

Los cultivos líquidos fueron realizados en matraces Erlenmeyer de 250 ml, con 50 ml de medio de cultivo y 0.2% de inóculo. Se incubaron a 29°C en agitación constante, 180 RPM.



### Pruebas API (*Analytical Profile Index*)

En una caracterización de microorganismos, es deseable realizar diversas pruebas bioquímicas que nos permitan discernir el grupo microbiano al que pertenece. Como alternativa de identificación al ADNr 16S, se emplearon sistemas de multipuebas comerciales como API 50 CH. Éste es un sistema estandarizado compuesto por 50 ensayos bioquímicos (*Tabla I*) destinados al estudio del metabolismo de los hidratos de carbono en los microorganismos, evidenciado por un cambio de coloración de un indicador en el medio.

Se empleó API 50 CHB/E Medium para la identificación de los *Bacillus* y microorganismos próximos de las *Enterobacteriaceae* y las *Vibrionaceae* (*Biomérieux*).

La lectura de las galerías se realizó a las 24 y 48 h, interpretado por el vire del indicador rojo de fenol en el medio. Positivo (+), negativo (-) y dudoso (?); se anotaron en la hoja de resultados.

Los resultados se introdujeron a un programa informático en línea que sustenta *Biomérieux*. Api web es un complemento esencial para la identificación manual, contiene toda las bases de datos API® regularmente actualizadas, permite además la interpretación de un gran número de perfiles a través de sus 600 especies de bacterias y levaduras contenidas en su base de datos.

Tabla I. Composición de la galería API 50CH (Manual API, Biomérieux).

Tubo	Ensayo	Componentes activo	CANT (mg/ cúp.)
0		TESTIGO	-
1	GLY	GLIcerol	1.64
2	ERY	ERItritol	1.44
3	DARA	D-ARAbinosa	1.4
4	LARA	L-ARAbinosa	1.4
5	RIB	D-RIBosa	1.4
6	DXYL	D-XILosa	1.4
7	LXYL	L-XILosa	1.4
8	ADO	D-ADONitol	1.36
9	MDX	Metil- $\beta$ D-Xilopiranosida	1.28
10	GAL	D-GALactosa	1.4
11	GLU	D-GLUcosa	1.56
12	FRU	D-FRUctosa	1.4
13	MNE	D-MamNosA	1.4
14	SBE	L-SorBosA	1.4
15	RHA	L-RHAMnosa	1.36
16	DUL	DULcitol	1.36
17	INO	INOSitol	1.4
18	MAN	D-MANitol	1.36
19	SOR	D-SORbitol	1.36
20	MDM	Metil- $\alpha$ D-Manopiranosida	1.28
21	MDG	Metil- $\alpha$ D-Glucopiranosida	1.28
22	NAG	N-AcetilGlucosamina	1.28
23	AMY	AMIGdalina	1.08
24	ARB	ARButina	1.08
25	ESC	ESCulina	1.16
		citrato férrico	0.152
26	SAL	SALicina	1.04
27	CEL	D-CELObiosa	1.32
28	MAL	D-MALtosa	1.4
29	LAC	D-LACTosa (origen bovino)	1.4
30	MEL	D-MELibiosa	1.32
31	SAC	D-SACarosa	1.32
32	TRE	D-TREhalosa	1.32
33	INU	INULina	1.28
34	MLZ	D-MeLeZitosa	1.32
35	RAF	D-RAFinosa	1.56
36	AMD	AlmiDón	1.28
37	GLYG	GLIcóGeno	1.28
38	XLT	XiLiTol	1.4
39	GEN	GENtiobiosa	0.5
40	TUR	D-TURanosa	1.32
41	LYX	D-LIXosa	1.4
42	TAG	D-TAGatosa	1.4
43	DFUC	D-FUCosa	1.28
44	LFUC	L-FUCosa	1.28
45	DARL	D-ARAbitoL	1.4
46	LARL	L-ARAbitoL	1.4
47	GNT	GlucNaTo potásico	1.84
48	2KG	2-CetoGluconato potásico	2.12
49	5KG	5-CetoGluconato potásico	1.8

## Vitek 2

Este es un sistema microbiológico automatizado, cuyo fin es identificar bacterias y levaduras, además de hacer pruebas de susceptibilidad bacteriana. El sistema consiste en un lector-incubadora, estuches de pruebas desechables (tarjetas), una unidad de relleno y sellado, además de una estación de trabajo.

Con ayuda de un asa bacteriológica se transfirió un número suficiente de colonias de un cultivo puro de 24 h de crecimiento a 3 ml de solución salina estéril (acuosa 0.50% de NaCl, pH de 4.5 a 7.0) contenida en tubo de ensayo de plástico (12 x 75 mm). La suspensión se ajustó, empleando un DensiChek™, de acuerdo a la tabla de turbidez para la inoculación de tarjetas, 0.50 – 0.63 en la escala de Mc-Farland. Se programaron las tarjetas y se introdujeron al equipo para su análisis (*Figura VII*). Una vez que se prepara y estandariza el inóculo, la unidad de relleno y sellado prepara las tarjetas para la incubación, el contacto entre la tarjeta y el inóculo se da a través de un tubo fino de transferencia. El sistema lleva a cabo todas las tareas necesarias para completar la identificación: dilución del inóculo, llenado de la tarjeta, sellado y transferencia a la incubadora, monitoreo de los cambios metabólicos, transferencia de los resultados a la estación de trabajo y descarte de las tarjetas de prueba.

La tarjeta (*Figura VI*) contiene 64 pozos en miniatura que a su vez contienen, ya sea un sustrato químico para productos de identificación o varias concentraciones de antibióticos en productos de susceptibilidad; tienen un código de barras de fábrica y cuentan con un tubo de transferencia insertado. Cada pozo del sistema es examinado por escáner de 10 a 14 veces cada 15 minutos, lo cual permite hacer un análisis cinético preciso.

Existen 4 tarjetas de reactivos: a) GN - Fermentación de bacterias Gram-negativas y bacilos no fermentadores; b) GP - Cocos Gram-positivos y bacilos no formadores de esporas; c) YST - Levaduras y organismos similares; d) BCL - Bacilos Gram-positivos formadores de esporas. En este estudio se emplearon tarjetas tipo GN, GP.

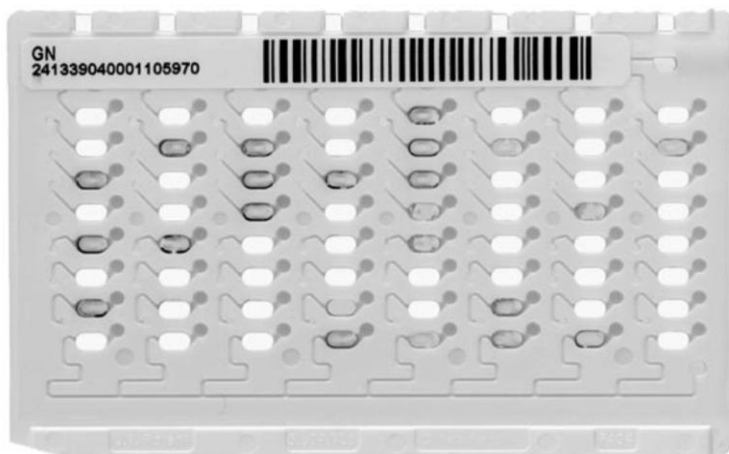


Figura VI. Tarjeta reactivo del equipo Vitek 2.



Figura VII. Equipo Vitek 2, cartuchos introducidos al equipo para el análisis de las muestras (Biomérieux).

### **Extracción de ADN genómico**

Con el fin de llevar a cabo la identificación molecular de las cepas bacterianas de interés, fue necesario el aislamiento de ADN genómico total. La extracción de ADN genómico se realizó mediante el protocolo Mini-Prep (*Wilson, 1987; Anexo II*). Una vez obtenido el pellet seco de ADN, se adicionó 100 µl de agua milli-Q estéril y se dejó hidratar 2 h previo a la electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (*Anexo II*), elaborado como lo señala *Ausubel et al., 1991; Wilson, 1987*.

### **Reacción en cadena de la ADN polimerasa**

La caracterización molecular, puede realizarse utilizando diferentes tipos de pruebas. La más empleada es la secuenciación de ADNr 16S. Para hacer dicha secuenciación se decidió amplificar el gen 16S bacteriano utilizando la técnica de PCR. Las regiones conservadas del ADNr 16S, facilitan el diseño de oligonucleótidos iniciadores (20 nt, aproximadamente). Se emplearon cebadores universales para amplificar la región del gen ADNr 16S de bacterias. En un ambiente frío se preparó la mezcla de reacción (*Tabla II*) y finalmente los tubos fueron colocados en un Termociclador GeneAmp PCR System 2400. Se empleó de forma preliminar el ciclo de amplificación diseñado para una cepa de *Streptomyces* (*Figura VIII*), bacteria Gram-positiva con alto contenido de GC en su genoma. Para lograr una mayor eficiencia de la enzima Taq polimerasa (*Applied Biosystem*), se hizo un “Hotstart” de 5 min antes de iniciar el primer ciclo.

Tabla II. Mezcla de reacción para la PCR.

Reactivo	$\mu\text{L}$
DNA (100 ng/ $\mu\text{L}$ )	2
Buffer 10X	5
dNTPs (1.25mM)	8
Oligo Forward (20pmol/ $\mu\text{L}$ )	1
Oligo reverse (20pmol/ $\mu\text{L}$ )	1
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2.5
Taq polimerasa (500 u)	1
H <sub>2</sub> O ultrapure	29.5
Volumen final	50

**(Fw):** Prepared Jan 2006, 446.96  $\mu\text{g}$ , 11021.2  $\mu\text{g}/\mu\text{mole}$ , CCGAATTCGTGACAA  
CAGAGTTTGATCCTGGCTCA (36pb), 15.81 OD, 40.63 nmole, Invitrogen.

**(Rev):** Prepared Jan 2006, 270.75  $\mu\text{g}$ , 10149.6  $\mu\text{g}/\mu\text{mole}$ , CCCGGGATCCAAGCTTAA  
GGAGGTGATCCAGCC (33pb), Invitrogen.

**Taq DNA Polymerase** (recombinant) BioTecMol: 5 u/ $\mu\text{L}$ , 100 u, Store at -20°C.

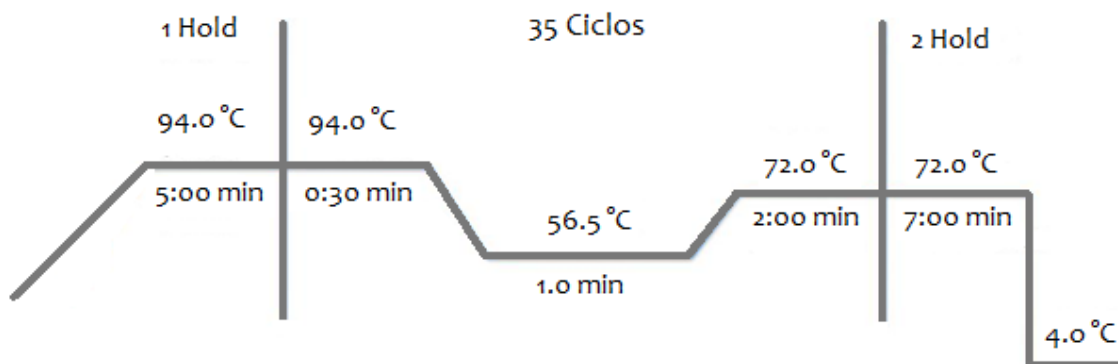


Figura VIII. Ciclo de amplificación en Termociclador. Se inició con un Hotstart de 5 min a 94°C, seguido por 35 ciclos de amplificación, se dio una extensión final de 72°C por 7 min y se deja que la temperatura descienda hasta 4°C.

### Purificación del producto de PCR

Para obtener una secuencia completa del gen amplificado, se pensó en clonar dicho gen en un plásmido para productos de PCR. Por ello, el primer paso fue la purificación del fragmento (Anexo II). Después de la PCR se corrió un gel de agarosa al 0.8% para observar la presencia y tamaño del amplicón esperado. Una vez observado, se cortó la banda y se purificó empleando dos métodos, columna de fibra de vidrio y por kit de QIAGEN. Se corrió otro gel de agarosa (0.8%) para corroborar la presencia de la banda purificada.

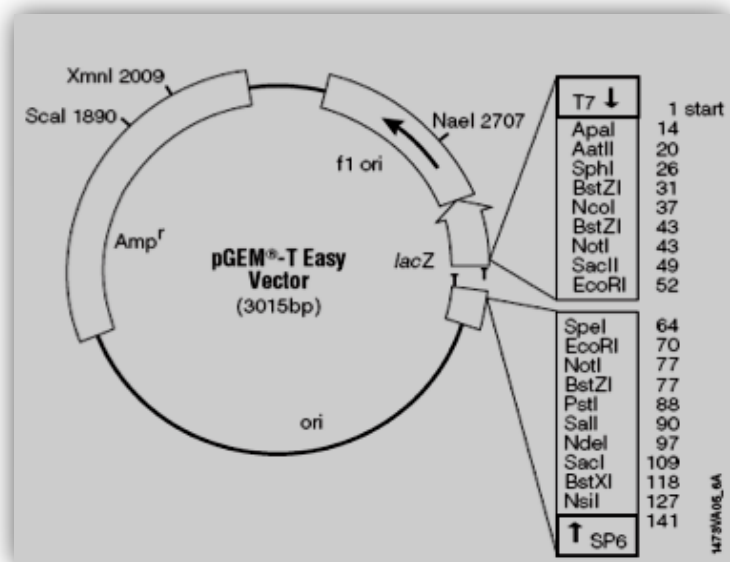


Figura IX. Mapa y puntos de referencia en la secuencia, pGEM-T Easy Vector.

### Ligación con plásmido para productos de PCR: pGEM-T easy

El fragmento de ADN amplificado por la PCR se introdujo a un vector, pGEM T-easy (Figura IX), utilizando ADN ligasa T4 (Tabla III). Éste vector es un sistema empleado para clonar productos de PCR y, entre otras cosas, es usual para la secuenciación de los fragmentos clonados. Es un vector de bajo peso molecular (3,015 pb) y de alto número

de copias. Su replicación en *E. coli*, otorga resistencia a ampicilina, lo cual permitió la selección de colonias con el inserto gracias a la interrupción del gen que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa.

Tabla III. Mezcla para la ligación.

Reactivo	Reacción estándar ( $\mu$ l)	Control Positivo ( $\mu$ l)
Buffer de ligación rápida 2X, T4 DNA ligase	5.0	5.0
Vector pGEM-T Easy (50ng)	1.0	1.0
Producto de PCR	X	--
Control inserto ADN	--	2.0
Ligasa T4 ADN	1.0	1.0
Agua desionizada/ volumen final	10.0	10.0

### Electroporación

La construcción del plásmido pGEM-T Easy con el gen 16S fue transformado por electroporación a células electrocompetentes de la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  (Anexo II). La electroporación es un método que consiste en la introducción de material genético extracelular a una célula competente por el debilitamiento de su pared celular. Las células competentes DH5 $\alpha$  fueron transformadas mediante un choque eléctrico (1.25 kV, 4 milisegundos), se agregó medio LB más glucosa 100 mM para estabilizar a las células después del choque y se incubó en agitación a 37°C. Transcurrida 1 h se sembraron dichas células en cajas con medio LB suplementadas con los siguientes reactivos en las concentraciones requeridas: ampicilina 150  $\mu$ g/ml; X-Gal (5-Bromo-4-chloro-Indoly- $\beta$ -D-Galactoside) 40  $\mu$ g/ml e IPTG (Isopropyl-beta-thio galactopyranoside) 60  $\mu$ l por 250 ml de medio. Después del crecimiento bacteriano, las colonias que contenían el inserto se seleccionaron macroscópicamente, por la diferencia de color que produce la degradación del X-Gal. Se realizó un mini-prep empleando el Boiling Method o bien el de lisis alcalina (Ausubel et al. 1991). Se corrieron geles de agarosa (0.8%) para verificar el aislamiento de los plásmidos.



## Digestión y secuenciación

Se empleó la enzima de restricción Eco RI para verificar la construcción por digestión (Tabla IV). Se centrifugó la mezcla durante 30 segundos a 13, 200 RPM. Se incubó 1 h a 37°C para favorecer la actividad enzimática. El resultado de dicha digestión fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y de esta forma fueron identificadas dos bandas, una perteneciente al ADNr 16S  $\approx$  1500 pb y otra al plásmido pGEM T-easy  $\approx$  3000 pb.

Tabla IV. Mezcla de reacción para la restricción con Eco RI.

Reactivo	$\mu$ l
Sustrato DNA (pGEM-T Easy + ADN 16S)	4.0
Enzima de restricción (Eco RI)	1.0
Agua libre de nucleasas	4.0
10X Buffer	1.0
Volumen final	10.0

Los plásmidos recombinantes fueron ajustados a una concentración de 150  $\mu$ g/ml y se secuenciaron utilizando como cebadores al promotor T7 y el terminador SP6. Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron alineadas utilizando el programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), que permite el alineamiento de secuencias de tipo local, es capaz de comparar una secuencia problema con una base de datos. El algoritmo encuentra las secuencias que tienen mayor parecido a la secuencia problema e incluso es capaz de realizar pruebas estadísticas que proveen de un parámetro para juzgar los resultados obtenidos.

También se alinearon las secuencias en la base de datos del proyecto ribosómico (RDP) el cual proporciona a los investigadores de bacterias y *Archaea* alineaciones de la pequeña subunidad del ARNr y herramientas para su análisis.

Una vez que se hubo identificado al microorganismo, se realizaron experimentos que nos dirigieran a conocer la naturaleza compuesto responsable del efecto antibacteriano.

De acuerdo a la literatura, los compuestos producidos por la bacteria de estudio resultan ser diversos, en base a esto se decidió realizar pruebas de los presuntos generadores de dicho efecto antibacteriano.

### **Prueba de proteasas**

La función de una proteasa es romper el enlace peptídico CO-NH por la introducción de agua en la molécula. Para detectar la producción de proteasas se empleó caseína como sustrato, ésta es la proteína que se encuentra presente en la leche y sus derivados. El medio está compuesto de Agar Nutritivo suplementado con caseína al 2%. Similar a otras proteínas, la proteína de la leche es una suspensión coloidal que proporciona al medio su color y opacidad porque desvía los rayos luminosos más que transmitirlos.

Seguido de la inoculación e incubación de las placas a 29°C, los organismos secretores de proteasas exhiben una zona de proteólisis, que es demostrada por un área clara alrededor del crecimiento de la bacteria. La falta de opacidad alrededor del crecimiento bacteriano refleja la actividad proteolítica y se considera una prueba positiva. En ausencia de la actividad de proteasas, el medio que rodea al crecimiento del organismo permanece opaco (*Cappuccino & Sherman, 2008*).

### **Hidrólisis de lípidos**

La degradación de lípidos como triglicéridos es logrado por lipasas, enzimas hidrolíticas extracelulares que rompen los enlaces éster en la molécula por la adición de agua para construir bloques de glicerol (un alcohol) y ácidos grasos (*Cappuccino & Sherman, 2008*).

En esta prueba el medio de Agar Nutritivo fue complementado con el triglicérido trioleína como sustrato lipídico. Trioleína forma una emulsión cuando se dispersa en el agar, produciendo un medio opaco que es necesario para la observación de la actividad exoenzimática.

Seguido de la inoculación e incubación de las placas de agar a 29°C, los organismos que excretan lipasas muestran una zona de lipólisis, que es denotada por un área clara alrededor del crecimiento de la bacteria. La pérdida de la opacidad es resultado de la acción hidrolítica y representa una reacción positiva.

### **Prueba de DNasa**

Se realizó la prueba de DNasa empleando DNase Test Agar, el cual contiene triptona que proporciona nutrientes para el crecimiento. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico. El alto nivel de ácido desoxirribonucleico molecular hace posible la detección de la desoxirribonucleasa (DNasa) que despolimeriza el ADN. Después de la incubación del medio con la cepa de prueba, la placa se inundó con ácido clorhídrico, que causa la precipitación del ADN polimerizado y hace al medio opaco. Los organismos que degradan el ADN producen una zona transparente alrededor del área de crecimiento (Cappuccino & Sherman, 2008).

### **Prueba de bacteriocinas**

Las bacteriocinas son derivadas del metabolismo, principalmente de algunas bacterias ácido lácticas (BAL), con función antimicrobiana. Son de naturaleza peptídica y afectan a bacterias relacionadas con las que las producen. Se ha comprobado que pueden actuar sobre bacterias patógenas, especialmente en Gram-positivas y en algunas Gram-negativas. Las bacteriocinas han sido encontradas en casi todas las especies bacterianas ácido lácticas examinadas hasta la fecha, y aún dentro de una especie podrían ser producidas diferentes tipos de bacteriocinas (López *et al.*, 2008).

Se realizó la prueba de bacteriocinas por difusión en agar. Las cajas se prepararon usando 20 ml de agar (0.6%) nutritivo en el fondo y 15 ml de agar (1%) nutritivo más el del microorganismo sensible 0.1% embebido (*Bacillus weihenstephanensis*, *B. subtilis*, *E. coli*, *M. luteus*) y haciendo pozos de 0.8 cm de diámetro aproximadamente en forma equidistante. Cuando solidificó el agar se agregó 100 µl del sobrenadante a cada uno de

los pozos. Las cajas se dejaron difundir una noche a 4°C para permitir la difusión de la muestra y luego durante 24 h a temperatura óptima del microorganismo correspondiente para evaluar los halos de crecimiento formados.

### **Prueba de surfactante**

Los biosurfactantes son compuestos producidos por microorganismos y presentan una alta actividad de superficie y propiedades emulsificantes, además de tener baja toxicidad y ser biodegradables. Estas propiedades los hacen útiles en varios procesos biotecnológicos, entre los cuales están su aplicación en la biorremediación de ambientes contaminados. En esta prueba se empleó medio basal salino y se adicionó CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio), azul de metileno y agar al 1.5%. Después de incubar, se observaron halos translúcidos.

### **Evaluación de la actividad lítica en SDS-PAGE**

Con la finalidad de conocer la naturaleza de la actividad antibacteriana que presentó el microorganismo, identificado previamente, se realizaron diferentes experimentos en SDS-PAGE, los cuales incluyen geles de actividad con diferentes sustratos (zimogramas).

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS), es la técnica más usada para el análisis de proteínas. El SDS es un agente de solubilización muy eficaz para una amplia gama de proteínas, incluyendo proteínas de membrana (González, 2010).

La zimografía es una técnica electroforética que permite observar actividad lítica debido a la copolimerización de la poliacrilamida con diversos sustratos. Después de realizar la corrida electroforética de las muestras, el gel se lava y se incuba con un buffer apropiado que favorece la actividad de dichas proteínas. El resultado de este tipo de geles, es que, en la zona donde se ubica la actividad se observa, según sea el caso, degradación del sustrato. Esta degradación se revela tiñendo el gel con

colorantes que tengan afinidad por proteínas y/o células viables, observando una zona traslúcida donde hubo actividad.

### **Obtención de las fracciones**

Se empleó biomasa de cultivos de 24 h (50 ml de caldo nutritivo), una vez lavada con solución salina isotónica se resuspendió en buffer Tris-HCl pH 8 y se ajustó a 2.5 de densidad óptica (D.O.<sub>600 nm</sub>) (Muestra 1). 5 ml de la muestra fueron sometidos a sonicación bajo las siguientes condiciones: 20 pulsos de 20 seg a 30 Hz con 20 seg de descanso (*Thermo-Fisher Scientific F550 550 Sonic Dismembrator*). Posteriormente la mezcla se centrifugó por 25 min a 17,000 RPM a 4°C. De ésta manera se obtuvieron residuos celulares y la fase citosólica (Muestra 2, 3 y 4), este último se resuspendió en buffer de extracción (Anexo I), se sometió a ebullición durante 5 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó durante 40 min a 14,000 RPM a 4°C, se retiró el sobrenadante y se repitió el proceso de centrifugado. Finalmente se recuperó todo el sobrenadante y la muestra fue pasada a través de una membrana de tamaño de corte de 10 kDa con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de SDS posible, se colectaron ambas fases, mayor y menor a 10 kDa (Muestra 6 y 8).

Por otro lado, se ajustó 5 ml de células intactas en buffer de extracción a 2.5 de D.O.<sub>600 nm</sub> y fueron tratadas de la misma manera que los botones de las células rotas por sonicación, se obtuvieron y colectaron ambas fases, mayor y menor a 10 kDa (Muestra 5 y 7).

Para la cuantificación de proteína total, se utilizó el método descrito por Bradford, empleando albúmina de suero bovino (BSA) como proteína estándar (Bradford, 1976).

Las 8 muestras obtenidas fueron cargadas en SDS-PAGE y zimogramas renaturalizantes al 12%, utilizando como sustratos gelatina al 0.1% para determinar la actividad proteolítica y *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 (*Sigma*) al 0.2% para la actividad lítica. La electroforesis se realizó a 100 V constante, durante 1.5 h en una

cámara *Mini-Protean III* (Bio-Rad). Tras la corrida se sacó el gel de las placas de vidrio y fue colocado en un recipiente, se hicieron tres lavados (5 min) con agua destilada en agitación suave y se realizaron los siguientes procedimientos para cada gel.

*Gel 1:* SDS-PAGE, perfil electroforético. El gel fue teñido con solución azul de Coomassie (0.1%) durante 30 min, posteriormente se lavó con agua destilada y se adicionó solución desteñidora (*Anexo I*) hasta que las bandas se pudieron apreciar con claridad.

*Gel 2:* Zimograma utilizando como sustrato gelatina. Gel de poliacrilamida copolimerizado con gelatina soluble 0.1%, empleado para la identificación de actividad proteolítica. Una vez realizados los lavados pertinentes, el gel se incubó 12 h con buffer de renaturalización a 37°C. Posteriormente al gel se le adicionó solución azul de metileno (*Anexo I*) durante 2 h, se empleó solución desteñidora (*Anexo I*) para la completa visualización de las bandas con actividad proteolítica (zonas claras).

*Gel 3:* Zimograma utilizando como sustrato células. Se realizaron SDS-PAGE con *M. lysodeikticus* para la evaluación de la actividad lítica. Después de la electroforesis, el gel se trató con solución renaturalizante (*Anexo I*) toda la noche en agitación a 37°C. Se enjuagó y se tiñó con solución de azul de metileno (*Anexo I*) por 30 min en agitación suave, se recuperó el colorante y se desteñó con agua destilada, tantas veces como fue necesario hasta que se observaron zonas claras.

Las imágenes de los geles fueron analizadas para el cálculo de los pesos moleculares relativos con el software *Quantity One 4.2.1* (Bio-Rad Ca, USA).

A la par, se evaluó la actividad antibacteriana de las muestras frente a los microorganismos sensibles (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y el microorganismo identificado como *B. weihenstephanensis*) por difusión en agar.

A partir de las secciones colectadas de *Magnolia dealbata* Zucc. se realizó el aislamiento de los microorganismos asociados. De dicho aislamiento se obtuvieron 107 microorganismos, 55 bacterias y 52 hongos. Las tinciones de Gram de las bacterias evidenciaron 17 tinciones positivas y 38 tinciones negativas.

Durante el proceso de aislamiento, atrajo la atención un microorganismo asociado a la corteza del tallo, ya que crecía de forma masiva en toda la superficie de la caja Petri, lo que dificultó el aislamiento de algunos otros microorganismos asociados a esta estructura que se encontraban en la misma caja. Este microorganismo, que denominamos 2B, crece de forma rizoide, presenta un margen filamentoso y crecimiento ligeramente elevado en Agar Nutritivo (NA), al cabo de 48 h cubrió por completo el medio sólido, impidiendo el crecimiento de otras bacterias.

Las pruebas de antibiosis de las 55 bacterias aisladas se realizaron por estría cruzada empleando 5 microorganismos sensibles (Figura X). Al llevar a cabo éste experimento se observaron 14 patrones de inhibición (Figura XI).

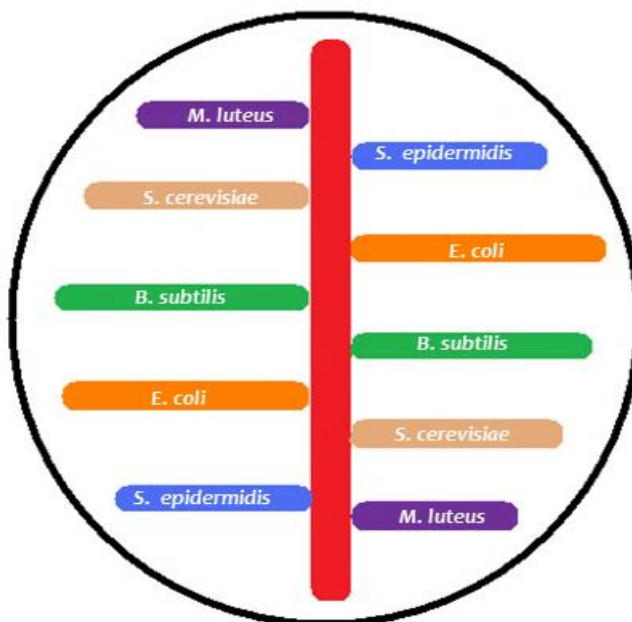


Figura X. Modelo de antibiosis.

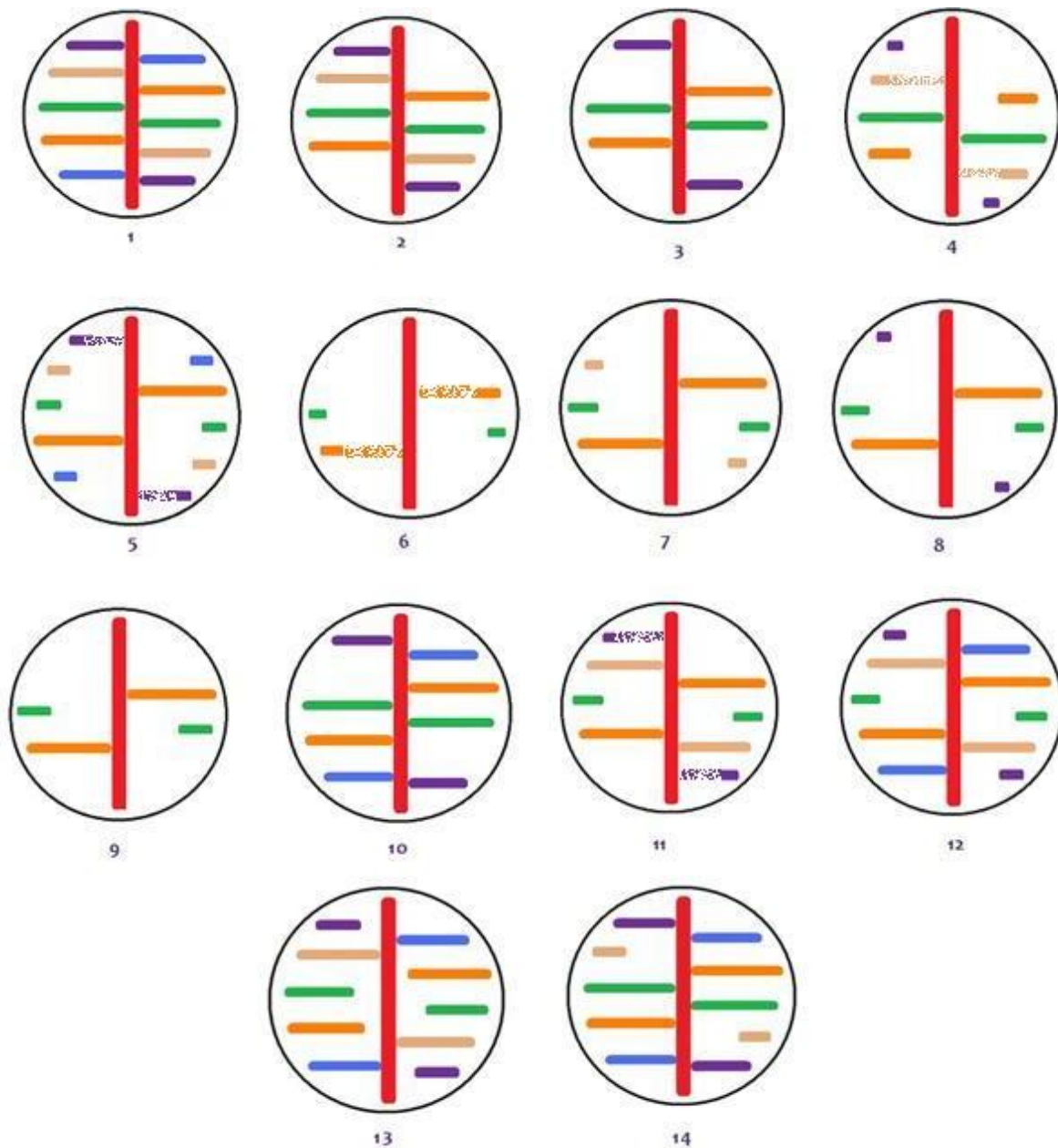


Figura XI. Diagrama de los 14 patrones de inhibición observados, la estría roja central representa el crecimiento de la cepa bacteriana aislada a probar, las cinco líneas de colores horizontales representan la estría de los microorganismos sensibles en el siguiente orden: *Micrococcus luteus* (Morado), *Saccharomyces cerevisiae* (Café), *Bacillus subtilis* (Verde), *Escherichia coli* (Naranja) y *Staphylococcus epidermidis* (Azul). Las líneas aerografiadas representan el ligero crecimiento de la bacteria sensible.



Como resultado de éste estudio se encontró que 42 cepas bacterianas aisladas mostraron el patrón número uno (*Figura XI, 1*), en donde no se observó inhibición, por lo que no parecieron producir algún compuesto con actividad antimicrobiana o al menos los cinco microorganismos empleados no son susceptibles a él, sin descartar la posibilidad de que no sean las condiciones óptimas de producción.

Trece cepas bacterianas mostraron tener potencial para inhibir el crecimiento de uno, dos, tres, cuatro e incluso a los cinco microorganismos sensibles empleados; algunas con grandes halos de inhibición, tal es el caso de la bacteria que presentó el patrón número 6 (*Figura XI, 2-14*). Por otra parte, los hongos aislados y evaluados en las condiciones de este estudio, no mostraron efecto inhibitorio; actualmente están siendo valorados por otros colegas, por lo que no serán mencionados los resultados referentes a esta parte del estudio.

La cepa bacteriana que denominamos 1B además de presentar el patrón número trece de inhibición, teniendo efecto antibacteriano frente a *M. luteus*, *B. subtilis* y *E. coli*, adicionalmente produjo un efecto bactericida contra el microorganismo 2B, mencionado anteriormente, que muestra crecimiento masivo (*Figura XII*). En base a estas observaciones los microorganismos 1B y 2B atrajeron nuestro interés, de tal forma que, dentro de los objetivos establecidos en éste proyecto, se decidió identificar y caracterizar a ambas cepas bacterianas.

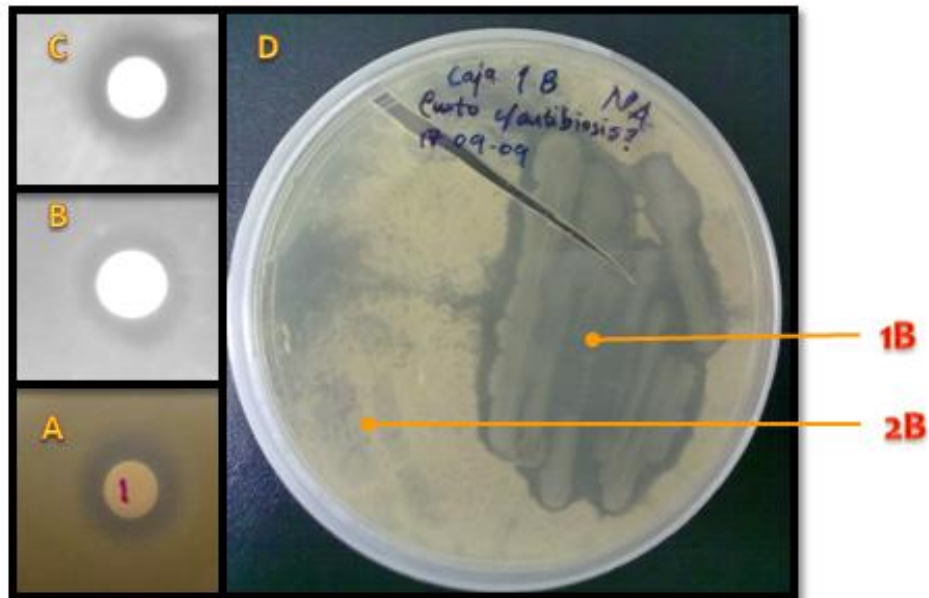


Figura XII. Efecto inhibitorio de la cepa 1B frente a otros microorganismos. A: *M. luteus*; B: *B. subtilis*; C: *E. coli* y D: 2B.

La identificación de ambos microorganismos se inició mediante la evaluación y análisis de sus características; se observó que la bacteria 1B es un cocobacilo Gram negativo muy pequeño para ser bien apreciado por microscopía óptica (Figura XIII, A), las colonias en medio sólido (Agar Nutritivo) se aprecian de color blanco y de forma redonda, con una ligera elevación y bordes enteros.

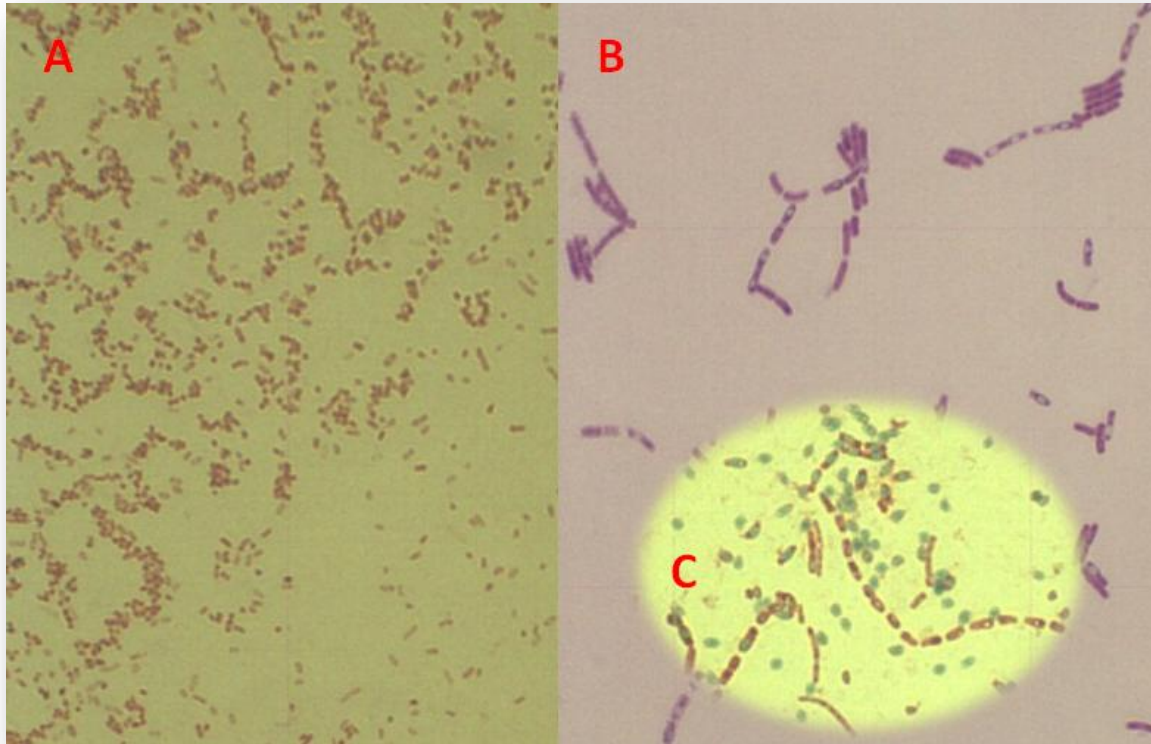


Figura XIII. Fotografía de las tinciones de Gram vistas al microscopio óptico (100X). A) Bacteria 1B, productora del compuesto antibacteriano; B) Cepa bacteriana de crecimiento masivo (2B); C) Tinción de esporas con verde de malaquita de la bacteria 2B.

En cuanto a las observaciones realizadas a la bacteria 2B, ésta crece de forma filamentosa, las colonias no son distinguibles y sólo existen crecimientos aislados en fases muy tempranas de crecimiento, dicho crecimiento presenta una ligera elevación y bordes filamentosos. Esta bacteria es Gram positiva (Figura XIII, B) y se agrupa como estreptobacilo, se observaron estructuras refringentes que parecían ser endosporas. Para corroborar esto, se realizó una tinción selectiva de esporas con verde de malaquita, en el frotis teñido las endosporas se observaron de color verde dentro de células rosadas (Figura XIII, C). Las endosporas son formadas por bacilos Gram positivos aerobios pertenecientes al género *Bacillus* y otros géneros relacionados, y por los Gram positivos anaerobios del género *Clostridium*. Dado que los clostridios aerotolerantes

rara vez forman esporas (Koneman *et al.*, 2008) y además presentan una estructura muy característica, inferimos en las primeras observaciones que el microorganismo 2B era un posible miembro del género *Bacillus*.

Las micrografías al Microscopio Electrónico de Barrido (Figura XIV), muestran que la cepa 1B, productora del compuesto antibacteriano, es en efecto un cocobacilo muy pequeño que no excede 1  $\mu\text{m}$  de largo y menos de 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura XIV, A). Las mismas también permitieron visualizar que cada célula de la bacteria 2B mide aproximadamente 2.5  $\mu\text{m}$  de largo por 1.5  $\mu\text{m}$  de ancho, además de poseer un ligera cubierta translúcida que se debió al proceso deshidratación, previo a las observaciones (Figura XIV, B).

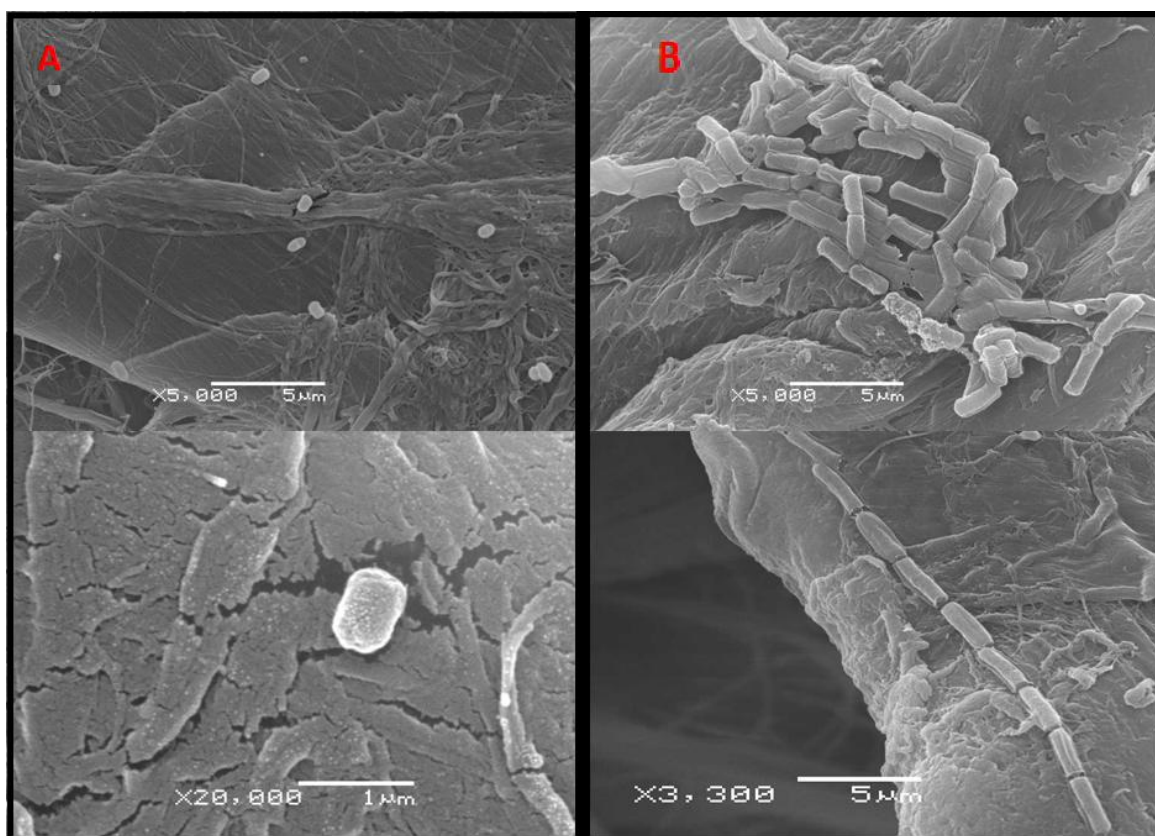


Figura XIV. Micrografías utilizando el Microscopio Electrónico de Barrido. A) Bacteria 1B; B) Bacteria 2B. Las figuras de abajo, respectivamente, muestran una morfología más detallada.

### Pruebas API

Una vez seleccionadas las cepas 1B y 2B, para los estudios de tipificación subsecuentes, se procedió a realizar pruebas bioquímicas. Las pruebas comerciales API nos permitieron llevar a cabo el análisis de la utilización de 50 fuentes de carbono al mismo tiempo. Como se mencionó en materiales y métodos, se inocularon las dos cepas seleccionadas en las galerías API 50 CH y los resultados definitivos (*Figura XV*) fueron leídos a las 24 h y 48 h (*Tabla V*).

Los resultados de las pruebas realizadas a la cepa 1B fueron cargados al programa en línea, sin embargo, requería de pruebas adicionales para poder discernir entre otras posibles identificaciones, como los evaluados mediante la galería API 20E. A través de este experimento no se logró la aproximación a la identificación de la bacteria 1B, por lo que se empleó el equipo Vitek 2, cuyos resultados se muestran más adelante.

El programa Apiweb identificó a la bacteria 2B como un posible *Bacillus thuringiensis*. El taxón más significativo presenta 97% de identidad con *B. cereus*.

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta, que durante su ciclo de vida presenta dos fases principales: crecimiento vegetativo y esporulación. Es considerada una bacteria ubicua, ya que se ha aislado de todas partes del mundo y de muy diversos sistemas, como suelo, agua, hojas de plantas, insectos, etc. (*Soberón y Bravo, 2009*). Este microorganismo presenta un cuerpo paraesporal conocido como *cristal* durante su fase de esporulación. Los cristales paraesporales son detectables al microscopio óptico de contraste de fases y pueden estar constituidos por la agregación de una o varias proteínas.



Se descartó que el microorganismo 2B fuera un posible *Bacillus thuringiensis*, debido a que el cuerpo paraesporal no forma parte de su estructura durante la fase de esporulación.



Figura XV. Fotografía de los resultados de la galería API 50 CH para la bacteria 2B incubada durante 48 h.

Tabla V. Resultados de las pruebas API 50 CH, medio CHB/E.

Tubo	Ensayo	Componentes activo	CANT (mg/ cúp.)	Cepa 1B	Cepa 2B
0		TESTIGO	-	-	-
1	GLY	GLIcerol	1.64	+	-
2	ERY	ERItrol	1.44	-	-
3	DARA	D-ARAbinosa	1.4	-	-
4	LARA	L-ARAbinosa	1.4	+	-
5	RIB	D-RIBosa	1.4	+	-
6	DXYL	D-XILosa	1.4	+	-
7	LXYL	L-XILosa	1.4	-	-
8	ADO	D-ADONitol	1.36	+	-
9	MDX	Metil- $\beta$ D-Xilopiranosida	1.28	-	-
10	GAL	D-GALactosa	1.4	+	-
11	GLU	D-GLUcosa	1.56	-	+
12	FRU	D-FRUctosa	1.4	-	+
13	MNE	D-MamNosA	1.4	-	-
14	SBE	L-SorBosA	1.4	-	-
15	RHA	L-RHAMnosa	1.36	-	-
16	DUL	DULcitol	1.36	-	-
17	INO	INOsitol	1.4	+	-
18	MAN	D-MANitol	1.36	+	-
19	SOR	D-SORbitol	1.36	+	-
20	MDM	Metil- $\alpha$ D-Manopiranosida	1.28	-	-
21	MDG	Metil- $\alpha$ D-Glucopiranosida	1.28	-	-
22	NAG	N-AcetilGlucosamina	1.28	-	+
23	AMY	AMIdalina	1.08	-	-
24	ARB	ARButina	1.08	-	+
25	ESC	ESCulina	1.16	+	+
		citrato férrico	0.152		
26	SAL	SALicina	1.04	-	+
27	CEL	D-CELobiosa	1.32	-	-
28	MAL	D-MALtosa	1.4	+	+
29	LAC	D-LACtosa (origen bovino)	1.4	-	-
30	MEL	D-MELibiosa	1.32	+	-
31	SAC	D-SACarosa	1.32	-	+
32	TRE	D-TREhalosa	1.32	-	+
33	INU	INULina	1.28	-	-
34	MLZ	D-MeLeZitosa	1.32	-	-
35	RAF	D-RAFinosa	1.56	-	-
36	AMD	AlmiDón	1.28	-	+
37	GLYG	GLIcóGeno	1.28	-	+
38	XLT	XiLiTol	1.4	+	-
39	GEN	GENtiobiosa	0.5	-	-
40	TUR	D-TURanosa	1.32	-	-
41	LYX	D-LIXosa	1.4	+	-
42	TAG	D-TAGatosa	1.4	-	-
43	DFUC	D-FUCosa	1.28	+	-
44	LFUC	L-FUCosa	1.28	-	-
45	DARL	D-ARabitoL	1.4	-	-
46	LARL	L-ARabitoL	1.4	-	-
47	GNT	GlucNaTo potásico	1.84	-	-
48	2KG	2-CetoGluconato potásico	2.12	-	-
49	5KG	5-CetoGluconato potásico	1.8	-	-

## Vitek 2

Debido a que el sistema APIweb requería pruebas adicionales para poder identificar al microorganismo 1B, se recurrió a las pruebas de identificación bacteriana que realiza de forma automatizada el equipo Vitek 2, el cual identificó con un excelente nivel de confianza (99%) a la cepa 1B como *Serratia marcescens*.

## ADNr 16S

Paralelo a los ensayos bioquímicos, se emplearon técnicas moleculares que nos dirigieran a la identificación genotípica de ambas bacterias mediante el gen 16S. El primer paso fue la extracción del ADN genómico y su posterior análisis por electroforesis en gel de agarosa 0.8%. La figura XVI, muestra el gel de agarosa posterior a la electroforesis, en el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular *GeneRuler 1 Kb DNA Ladder*, en los cuatro carriles siguientes se observa el ADN genómico de las cepas bacterianas 1B (Carriles 2 y 3) y 2B (Carriles 4 y 5).

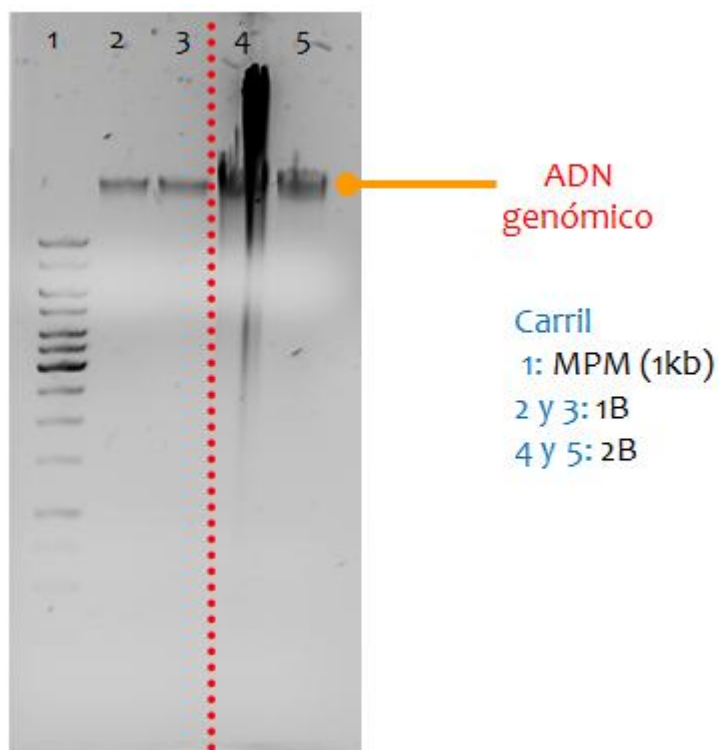


Figura XVI. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra el ADN genómico de las cepas bacterianas de 1B y 2B.



Después de corroborar la buena condición y pureza del ADN genómico en el gel de agarosa, se ajustó a una concentración de 100 ng/μl, para así iniciar los ciclos de reacción en el termociclador. El análisis de los fragmentos amplificados se realizó en geles de agarosa al 0.8% (Figura XVII), en él se observó una banda de ≈ 1500 pb, correspondientes al gen de interés (ADNr 16S bacteriano).

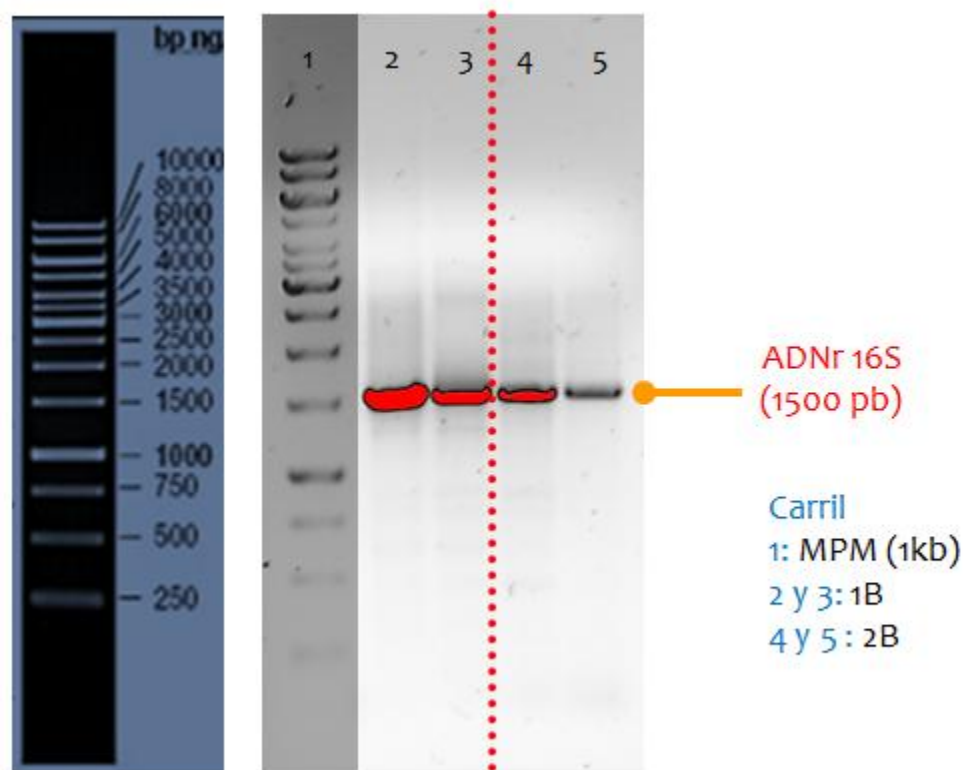


Figura XVII. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra los productos de PCR. Banda de ≈ 1500 pb, correspondiente al ADNr 16S bacteriano.

Cuando se observó más de una banda en el gel de los productos de PCR, se realizó la purificación de los fragmentos amplificados. El fragmento de ADN amplificado por la PCR y purificado se clonó en el vector, pGEM T-easy utilizando la ligasa T4. La construcción se transformó en *Escherichia coli* DH5α, lo que permitió la selección al azar de 28 colonias, por su resistencia a ampicilina.

De las colonias seleccionadas se realizaron extracciones de ADN plasmídico, para su análisis por electroforesis en gel de agarosa (Figura XVIII), en el cual se aprecian bandas correspondientes a las diferentes conformaciones del plásmido, algunos superenrollamientos y bandas que podrían corresponder a la construcción cuyo peso aproximado es de 4500 pb. El presente gel no muestra que el gen se haya insertado en el plásmido, por tal motivo fue necesario el posterior análisis de restricción.

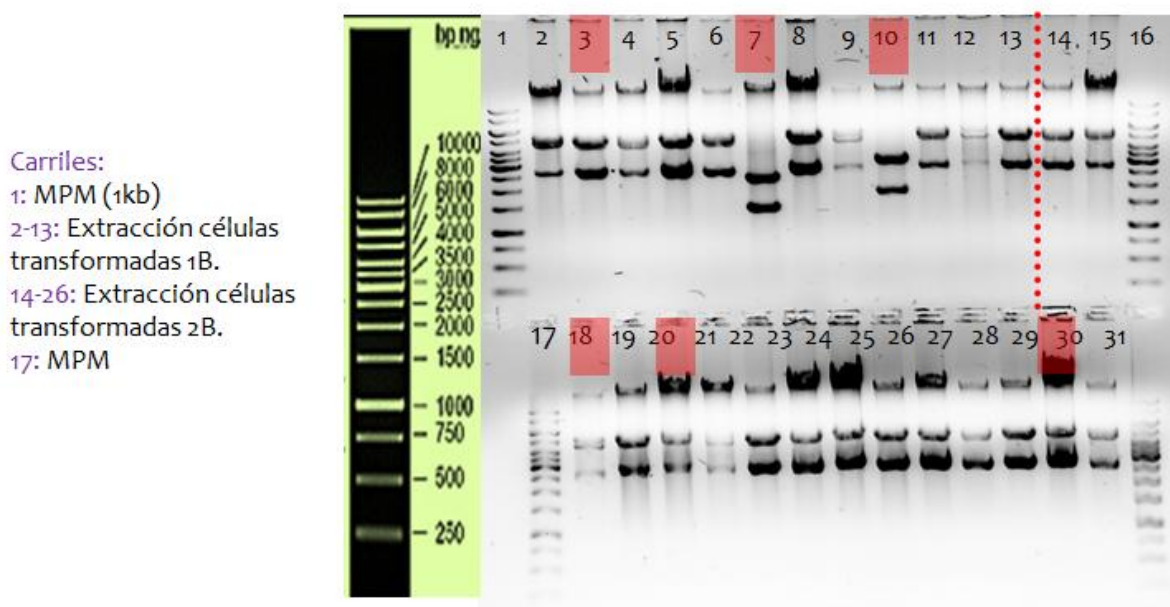


Figura XVIII. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Extracción de ADN plasmídico de colonias de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas.

Con el fin de verificar la presencia del ADN 16S, los plásmidos seleccionados fueron sometidos a restricción con la enzima *Eco* RI (5000 u) ya que con ésta, es posible liberar el ADN insertado (Figura XIX). En el caso de la bacteria 1B, se observa la banda correspondiente al peso del plásmido y dos bandas cuya suma es el peso aproximado al gen de interés (1500 pb). En la digestión del plásmido con el inserto ADN 16S de la bacteria 2B (Figura XIX, carril 2) se aprecia la banda correspondiente al peso del plásmido pGEM T-easy (3000 pb) y la del gen 16S de aproximadamente 1500 pb.

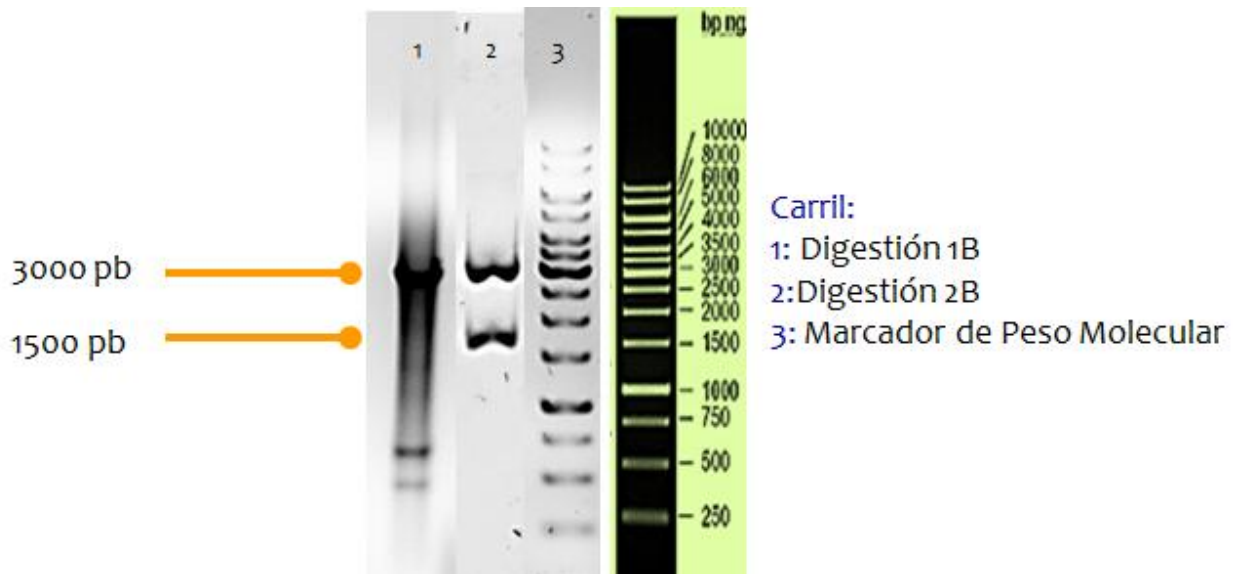


Figura XIX. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de la digestión de plásmidos recombinantes con enzima Eco RI.

La digestión realizada corroboró que los fragmentos de interés se insertaron en el plásmido de forma correcta y de esta manera fueron secuenciados utilizando oligos T7 (Forward) y SP6 (Reverse).

Las secuencias obtenidas de las cepas 1B y 2B se muestran en la Figura XX y XXI respectivamente, en ellas se observa el alineamiento de tipo local (BLAST) con la secuencia de máxima identidad de la base de datos.

- Cepa 1B: Mostró 97% de cobertura y 99% de máxima identidad de 1535 pb comparadas con la cepa bacteriana *Serratia marcescens* RJT del banco de genes, con referencia EU233275.1 (Figura XX y XXII).
- Cepa 2B: Mostró 97% de cobertura y 99% de máxima identidad de 1547 pb comparadas con la cepa bacteriana *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 del banco de genes, con referencia CP000903.1 (Figura XXI y XXIV).

```

Score = 2747 bits (3046), Expect = 0.0
Identities = 1531/1535 (99%), Gaps = 1/1535 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 18      AGAGTTTGAICCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGGAGAGCTTGCTCTCTGGGTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGICTGG
Sbjct 1      AGAGTTTGAICCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAAAGAGAGCTTGCTCTCTGGGTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGICTGG

Query 138     GAAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAG
Sbjct 121     GAAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAG

Query 258     CTAGTAGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATAT
Sbjct 241     CTAGTAGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATAT

Query 378     TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGACGACCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGACACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAACCTAATACGTTCAATGACGTTA
Sbjct 361     TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGACGACCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGACACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAACCTAATACGTTCAATGACGTTA

Query 498     CTCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGAGGGCGTTTGTAAAGTCAGATGTGA
Sbjct 481     CTCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGAGGGCGTTTGTAAAGTCAGATGTGA

Query 618     AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGTAGAATTNCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGC
Sbjct 601     AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGTAGAATT-CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGC

Query 738     GAAGGCGGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGCGATTGGAGGTTGTGCCCTTGAG
Sbjct 720     GAAGGCGGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGCGATTGGAGGTTGTGCCCTTGAG

Query 858     GCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGATG
Sbjct 840     GCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGATG

Query 978     CAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTGAGTCTGTTGTGAAATGTT
Sbjct 960     CAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTGAGTCTGTTGTGAAATGTT

Query 1098    GGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAAGTCATCATG
Sbjct 1080    GGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAAGTCATCATG

Query 1218    GCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACT
Sbjct 1200    GCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACT

Query 1218    GCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACT
Sbjct 1200    GCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACT

Query 1338    CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTA
Sbjct 1320    CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTA

Query 1458    ACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACCTTTGTGATTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAAACCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTT 1552
Sbjct 1440    ACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACCTTTGTGATTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAAACCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTT 1534
    
```

Figura XX. Secuencia alineada del ADNr 16S (1535 pb) de la cepa bacteriana 1B (Query) con *Serratia marcescens* RJT (Sbjct) del banco de genes, referencia EU233275.1.



```

Score = 2708 bits (3002), Expect = 0.0
Identities = 1532/1545 (99%), Gaps = 6/1545 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 18      AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT
Sbjct 28861     AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT

Query 138     AACCTACCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAATATTTTGAAGTGCATAGTTCAAATTTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTATGGATGGACCCGCT
Sbjct 28981     AACCTACCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAATATTTTGAAGTGCATAGTTCAAATTTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTATGGATGGACCCGCT

Query 258     CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACCGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
Sbjct 29101     CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACCGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA

Query 378     GGGAAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACCGCGTGAAGTGCATGAAAGCTTTCGGGTCGTAATACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCATGTTGAATAAGCTGGCACC
Sbjct 29221     GGGAAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACCGCGTGAAGTGCATGAAAGCTTTCGGGTCGTAATACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCATGTTGAATAAGCTGGCACC

Query 498     TTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGTGGCAGCGTATCCGGAATTAATGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGT
Sbjct 29341     TTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGTGGCAGCGTATCCGGAATTAATGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGT

Query 618     CTGATGTGAAAGCCCGCTCAACCGTGGAGGGTCAT-GGAAACTGGGAGACTTGAAGTGCAGAAAGAGGAAAGTGGAAATCCA-GTGTAGCGGTGAAATGN-TAGAGATATGGAGAAAC
Sbjct 29461     CTGATGTGAAAGCCCGCTCAACCGTGGAGGGTCATGGAAACTGGGAGACTTGAAGTGCAGAAAGAGGAAAGTGGAAATCCAATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGAAAC

Query 735     CCAGTGGCGAAGGCGACTT-CITGGTCTGTA-CIGACACTGAGGCGCGAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGNAAAGTGTAGA
Sbjct 29581     CCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAACIGACACTGAGGCGCGAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGNAAAGTGTAGA

Query 853     GGGTTTCCGCCCTTGTAGTGTGAAGTTAACCGCATTAAAGCACTCCGCGTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATGACGGGGGCGCCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
Sbjct 29700     GGGTTTCCGCCCTTGTAGTGTGAAGTTAACCGCATTAAAGCACTCCGCGTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATGACGGGGGCGCCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT

Query 973     TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTACATCCTCTGAAAACCTAGAGATAGAGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGACCTCGTGTG
Sbjct 29820     TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTACATCCTCTGAAAACCTAGAGATAGAGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGACCTCGTGTG

Query 1093    GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATTTTGTAGTGCATCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTC
Sbjct 29940     GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATTTTGTAGTGCATCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTC

Query 1153    AGTTGGGCACCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAAATGGACGGTACAAAGAGCT
Sbjct 30000     AGTTGGGCACCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAAATGGACGGTACAAAGAGCT

Query 1273    GCAAGACCGGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAAACCGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGTAGTAAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATA
Sbjct 30120     GCAAGACCGGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAAACCGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGTAGTAAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATA

Query 1393    CGTTCGCCGGCCTTGTACACACCGCCGTACACCCAGAGAGTTGTAACACCGAAGTGGTGGGGTAAACCTTTATGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTC
Sbjct 30240     CGTTCGCCGGCCTTGTACACACCGCCGTACACCCAGAGAGTTGTAACACCGAAGTGGTGGGGTAAACCTTTATGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTC

Query 1513    GTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT 1557
Sbjct 30360    GTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT 30404

```

Figura XXI. Secuencia alineada del ADNr 16S (1547 pb) de la cepa bacteriana 2B (Query) con *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 (Sbjct) del banco de genes, referencia CP00903.1.

Las secuencias fueron alineadas en la base de datos del proyecto ribosómico (RDP). Nuevamente las cepas fueron identificadas como *S. marcescens* y *B. weihenstephanensis* (Figura XXIII y XXV).

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">EU233275.1</a>	Serratia marcescens strain RJT 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	2747	2747	97%	0.0	99%
<a href="#">EF208030.1</a>	Serratia marcescens strain A3 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	2746	2746	97%	0.0	99%
<a href="#">EF194094.1</a>	Serratia marcescens strain H3010 16S ribosomal RNA gene, partial se	2746	2746	97%	0.0	99%
<a href="#">F853424.1</a>	Serratia marcescens strain MH6 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	2742	2742	98%	0.0	99%
<a href="#">FN293172.1</a>	Serratia marcescens partial 16S rRNA gene, isolate GMX1	2742	2742	97%	0.0	99%
<a href="#">GU188473.1</a>	Serratia marcescens strain SYBC08 16S ribosomal RNA gene, partial s	2735	2735	97%	0.0	99%
<a href="#">HMS90892.1</a>	Serratia marcescens strain YH 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	2733	2733	97%	0.0	99%
<a href="#">NR_036886.1</a>	Serratia marcescens subsp. sakuensis strain KRED 16S ribosomal RNA	2733	2733	97%	0.0	99%
<a href="#">FJ479790.1</a>	Serratia marcescens strain ZJB-09104 16S ribosomal RNA gene, parti	2729	2729	97%	0.0	99%
<a href="#">GU799548.1</a>	Serratia marcescens strain SCQ1 16S ribosomal RNA gene, partial sec	2713	2713	97%	0.0	99%
<a href="#">GU826156.1</a>	Serratia marcescens strain H14 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	2713	2713	96%	0.0	99%
<a href="#">EU221361.1</a>	Serratia marcescens strain J2P3 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	2709	2709	97%	0.0	99%
<a href="#">EF208031.1</a>	Serratia marcescens strain L1 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	2709	2709	97%	0.0	99%
<a href="#">AB117954.1</a>	Serratia marcescens gene for 16S rRNA, strain: HokM	2709	2709	97%	0.0	99%
<a href="#">FM163467.1</a>	Serratia marcescens subsp. marcescens partial 16S rRNA gene, strain	2706	2706	97%	0.0	99%
<a href="#">GU124498.1</a>	Serratia sp. endosymbiont of Nilaparvata lugens clone M280 16S ribos	2700	2700	95%	0.0	99%
<a href="#">FM163485.2</a>	Serratia marcescens partial 16S rRNA gene, strain BC16	2697	2697	97%	0.0	99%
<a href="#">DQ068791.1</a>	Uncultured bacterium clone f4h7 16S ribosomal RNA gene, partial seq	2697	2697	96%	0.0	99%
<a href="#">FM178865.2</a>	Serratia sp. ptz-16s partial 16S rRNA gene, clone ptz-16s	2693	2693	99%	0.0	98%
<a href="#">HMS90891.1</a>	Serratia marcescens strain SYBCT02 16S ribosomal RNA gene, partial	2691	2691	95%	0.0	99%
<a href="#">GU120658.1</a>	Serratia sp. F3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2691	2691	96%	0.0	99%
<a href="#">AM403719.1</a>	Serratia sp. EP28 16S rRNA gene	2691	2691	95%	0.0	99%
<a href="#">AM396490.1</a>	Serratia sp. ES-1 partial 16S rRNA gene, isolate ES-1	2691	2691	95%	0.0	99%
<a href="#">DQ068892.1</a>	Uncultured bacterium clone s2h10a 16S ribosomal RNA gene, partial s	2691	2691	95%	0.0	99%
<a href="#">FM179314.1</a>	Serratia marcescens partial 16S rRNA gene	2690	2690	97%	0.0	98%
<a href="#">DQ629026.1</a>	Serratia sp. KMR-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2690	2690	96%	0.0	99%
<a href="#">DQ068802.1</a>	Uncultured bacterium clone f5h32 16S ribosomal RNA gene, partial se	2690	2690	96%	0.0	99%

Figura XXII. Alineamiento del gen 16S bacteriano en Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) de la cepa bacteriana 1B.

```

Lineage:
Results for Query Sequence: unknown, 1460 unique oligos

no rank Root (20) (match sequences)
  domain Bacteria (20)
    phylum "Proteobacteria" (20)
      class Gammaproteobacteria (20)
        order "Enterobacteriales" (20)
          family Enterobacteriaceae (20)
            genus Serratia (20)
              S000119198 not_calculated 0.995 1334 Serratia marcescens subsp. marcescens; N9; AF494202
              S000462481 not_calculated 0.993 1262 uncultured gamma proteobacterium; LKC3_125.59; AY510235
              S000534880 not_calculated 0.991 1280 Serratia marcescens subsp. marcescens; GT596; AY732377
              S000859121 not_calculated 0.995 1304 Serratia sp. FLGB02; EF195336
              S000859122 not_calculated 0.995 1306 Serratia sp. FLGB11; EF195337
              S000859123 not_calculated 0.993 1305 Serratia sp. FLGB16; EF195338
              S000859124 not_calculated 0.995 1312 Serratia sp. FLGB17; EF195339
              S000859125 not_calculated 0.995 1304 Serratia sp. FLGB20; EF195340
              S000859128 not_calculated 0.992 1312 Serratia sp. PRGB09; EF195343
              S000859132 not_calculated 0.992 1309 Serratia sp. PSGB07; EF195347
              S000859133 not_calculated 0.992 1311 Serratia sp. PSGB15; EF195348
              S000859134 not_calculated 0.995 1299 Serratia sp. PSGB18; EF195349
              S000859135 not_calculated 0.995 1306 Serratia sp. PSGB12; EF195350
              S001098211 not_calculated 0.991 1366 bacterium BR115; EU603509
              S001263857 not_calculated 0.991 1308 Serratia sp. RFNB14; FJ266324
              S001351588 not_calculated 0.991 1254 Serratia sp. GS-2-08; FJ816024
              S001794328 not_calculated 0.991 1402 Serratia sp. endosymbiont of Nilaparvata lugens; M280; GU124498
              S002223809 not_calculated 0.995 1322 Serratia sp. OTII-7; GQ468400
              S002223810 not_calculated 0.994 1290 Serratia sp. PKRS-2; GQ468401
              S002238615 not_calculated 0.991 1366 uncultured bacterium; POME_T70_B31; HM440317
    
```

Figura XXIII. Alineamiento del gen 16S bacteriano en Ribosomal Database Project (RDP) de la cepa bacteriana 1B.



Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
CP000903.1	Bacillus weihenstephanensis KBAB4, complete genome	2708	3.787e+04	97%	0.0	99%
AY572476.1	Bacillus sp. R39S 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2690	2690	97%	0.0	98%
AY853168.1	Bacillus sp. 4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2688	2688	98%	0.0	98%
CP001176.1	Bacillus cereus B4264, complete genome	2686	3.741e+04	97%	0.0	98%
AY572481.1	Bacillus sp. R32S 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2686	2686	97%	0.0	98%
EF093131.1	Bacillus sp. VTT E-052910 16S ribosomal RNA gene, complete sequen	2684	2684	97%	0.0	99%
NR_024697.1	Bacillus weihenstephanensis strain DSM11821 16S ribosomal RNA, par	2684	2684	97%	0.0	99%
AM747230.1	Bacillus weihenstephanensis partial 16S rRNA gene and ITS1, strain V	2681	2681	96%	0.0	99%
AM747229.1	Bacillus mycoides partial 16S rRNA gene and ITS1, strain CIP 103472	2681	2681	96%	0.0	99%
DQ345791.1	Bacillus weihenstephanensis strain MC67 16S ribosomal RNA gene, pa	2681	2681	97%	0.0	99%
AB247137.1	Bacillus cereus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:PDa-1	2681	2681	97%	0.0	98%
AY138273.1	Bacillus cereus strain G9667 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2679	2679	97%	0.0	98%
AY138272.1	Bacillus cereus strain 2000031486 16S ribosomal RNA gene, partial se	2679	2679	97%	0.0	98%
GU26173.1	Bacillus cereus 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2677	2677	97%	0.0	98%
CP000227.1	Bacillus cereus Q1, complete genome	2677	3.466e+04	97%	0.0	98%
CP001186.1	Bacillus cereus G9842, complete genome	2677	3.465e+04	97%	0.0	98%
CP001177.1	Bacillus cereus AH187, complete genome	2677	3.731e+04	97%	0.0	98%
EU915687.1	Bacillus cereus strain HY-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2677	2677	97%	0.0	98%
FM173664.1	Pseudomonas sp. CL3.1 partial 16S rRNA gene, isolate CL3.13	2677	2677	97%	0.0	98%
AM747228.1	Bacillus mycoides partial 16S rRNA gene and ITS1, strain SDA NFMO4	2677	2677	96%	0.0	99%
AY572483.1	Bacillus sp. R37S 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2675	2675	97%	0.0	98%
AB355699.1	Bacillus cereus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: S24	2673	2673	97%	0.0	98%
AY138290.1	Bacillus thuringiensis strain 2000031482 16S ribosomal RNA gene, par	2673	2673	97%	0.0	98%
AY138289.1	Bacillus thuringiensis strain 2000031485 16S ribosomal RNA gene, par	2673	2673	97%	0.0	98%
AY138288.1	Bacillus thuringiensis strain 2000031494 16S ribosomal RNA gene, par	2673	2673	97%	0.0	98%
AY138287.1	Bacillus thuringiensis strain 2000031496 16S ribosomal RNA gene, par	2673	2673	97%	0.0	98%
AY138286.1	Bacillus thuringiensis strain 2000031508 16S ribosomal RNA gene, par	2673	2673	97%	0.0	98%

Figura XXIV. Alineamiento del gen 16S bacteriano en Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) de la cepa bacteriana 2B.

Query Sequence: M2, 1351 unique oligos

Match hit format:  
short ID, orientation, similarity score, S\_ab score, unique common oligomers and sequence full name. More help is available.

Lineage:

- no rank Root (0/20/615916) (selected/match/total RDP sequences)
- domain Bacteria (0/20/606188)
- phylum "Firmicutes" (0/20/206763)
- class "Bacilli" (0/20/108790)
- order Bacillales (0/20/72962)
- family Bacillaceae (0/20/13359)
- genus Bacillus (0/20/9848)

S000016288	not_calculated	0.937	1446	Bacillus weihenstephanensis (T); DSM11821; AB021199
S000463191	not_calculated	0.930	1466	Bacillus sp. R39S; AY572476
S000711905	not_calculated	0.933	1489	Bacillus weihenstephanensis; MC67; DQ345791
S000902193	not_calculated	0.937	1446	Bacillus sp. VTT E-052910; EF093131
S000925674	not_calculated	0.932	1447	Bacillus mycoides; SDA NFMO448; AM747228
S000925675	not_calculated	0.936	1447	Bacillus mycoides; CIP 103472; AM747229
S000925676	not_calculated	0.936	1447	Bacillus weihenstephanensis; WSBC 10204; AM747230
S000979462	not_calculated	0.936	1458	Bacillus weihenstephanensis KBAB4; CP000903
S000979464	not_calculated	0.945	1458	Bacillus weihenstephanensis KBAB4; CP000903
S000979466	not_calculated	0.945	1458	Bacillus weihenstephanensis KBAB4; CP000903
S000979468	not_calculated	0.945	1458	Bacillus weihenstephanensis KBAB4; CP000903
S000979470	not_calculated	0.940	1457	Bacillus weihenstephanensis KBAB4; CP000903
S000979472	not_calculated	0.945	1458	Bacillus weihenstephanensis KBAB4; CP000903
S000979474	not_calculated	0.940	1457	Bacillus weihenstephanensis KBAB4; CP000903
S000979476	not_calculated	0.944	1453	Bacillus weihenstephanensis KBAB4; CP000903

Figura XXV. Alineamiento del gen 16S bacteriano en Ribosomal Database Project (RDP) de la cepa bacteriana 2B.

### ***Serratia marcescens***

Las especies de *Serratia* son singulares entre las enterobacterias por producir tres enzimas hidrolíticas: lipasa, gelatinasa y DNasa. *S. marcescens* es el miembro más importante del género, se observa como pequeños bastoncillos, algunas veces casi esféricos, de 0.5 por 0.5 a 1  $\mu\text{m}$ , incidentalmente solas y ocasionalmente en cadenas de 5 o 6 elementos. Son móviles con cuatro flagelos peritricos y llegan a presentar de ocho a diez cuando crecen de 20° a 25°C. La temperatura de crecimiento óptima para *S. marcescens* es de 30-37°C, y la requerida para obtener una buena pigmentación es de 27-30°C (Buchanan & Gibbons, 1974; Hejazi & Falkiner, 1997).

En medio sólido con agar, forma colonias circulares, delgadas, granulares, blancas que se convierten en rojo. En medio líquido crece generando turbidez, pudiendo formar un anillo rojo en la superficie o una ligera película y un sedimento gris. El hábitat de esta bacteria puede ser agua, suelo, aire, plantas, animales y alimentos, pues se encuentra ampliamente distribuida en el medio ambiente. Ocasionalmente se encuentran en las muestras patológicas (Buchanan & Gibbons, 1974).

Aislados ambientales de éste bacilo Gram negativo característicamente producen un pigmento rojo llamado prodigiosina, que en tiempos tempranos de crecimiento era a menudo confundida con sangre fresca. La habilidad para formar prodigiosina es característica de *Serratia marcescens*, la función de este pigmento rojo sigue siendo desconocida porque los aislados clínicos son raramente pigmentados (Buchanan & Gibbons, 1974; Hejazi, 1997).

En años anteriores a 1966, eran más frecuentes los reportes de aislamiento de *Serratia marcescens* en muestras clínicas. Caracterizaciones bioquímicas y serotípicas han mostrado que la mayoría de las cepas de *S. marcescens* no exhiben el pigmento rojo incluso bajo las conocidas condiciones óptimas de producción (Clayton & Graevenitz, 1966).



Para corroborar que la cepa *Serratia marcescens* que aislamos no era capaz de producir el pigmento rojo, se creció en medio PGA (Peptona Glicerol Agar, Anexo I) el cual es usado en estudios para la biosíntesis de prodigiosina (Ding & Williams, 1983) empleando como control positivo a una *S. marcescens* productora del pigmento rojo.

Como se puede observar en la figura XXVI, *Serratia marcescens* (2B) no produce el pigmento cuando es crecida en el medio óptimo para la biosíntesis de prodigiosina. Sin embargo, los estudios realizados por Ding y colaboradores en 1983 muestran que la mayoría de cepas clínicas de *S. marcescens*, que en un 98% no son pigmentadas, pueden sintetizar un pigmento si se suministra con MBC (4-methoxy-2, 2'-bipyrrole-5-carboxyaldehyde) y MAP (2-methyl-3-amylypyrrole), precursores inmediatos de la prodigiosina. Estudios complementarios a estos experimentos, determinarían la clase a la que pertenece *S. marcescens* (2B) de acuerdo al estudio de Ding. La clase 1, formada por aquellas que no muestran respuesta a la presencia de alguno de los precursores; la clase 2 no responden a la presencia de MAP, pero son formadoras de un pigmento gris o rosa en respuesta a la presencia de MBC; clase 3, aquellas que no responden a MAP pero forman un color azul en respuesta a MBC y finalmente las capaces de sintetizar prodigiosina en presencia de MAP y MBC (Ding & Williams, 1983).

Algunos autores sugieren que el fracaso de las cepas para formar prodigiosina se debe a un bloqueo en la biosíntesis de la misma en una fase muy temprana, antes de la formación de los compuestos que más tarde responderán a MAP y MBC para formar el pigmento rojo (Ding & Williams, 1983).

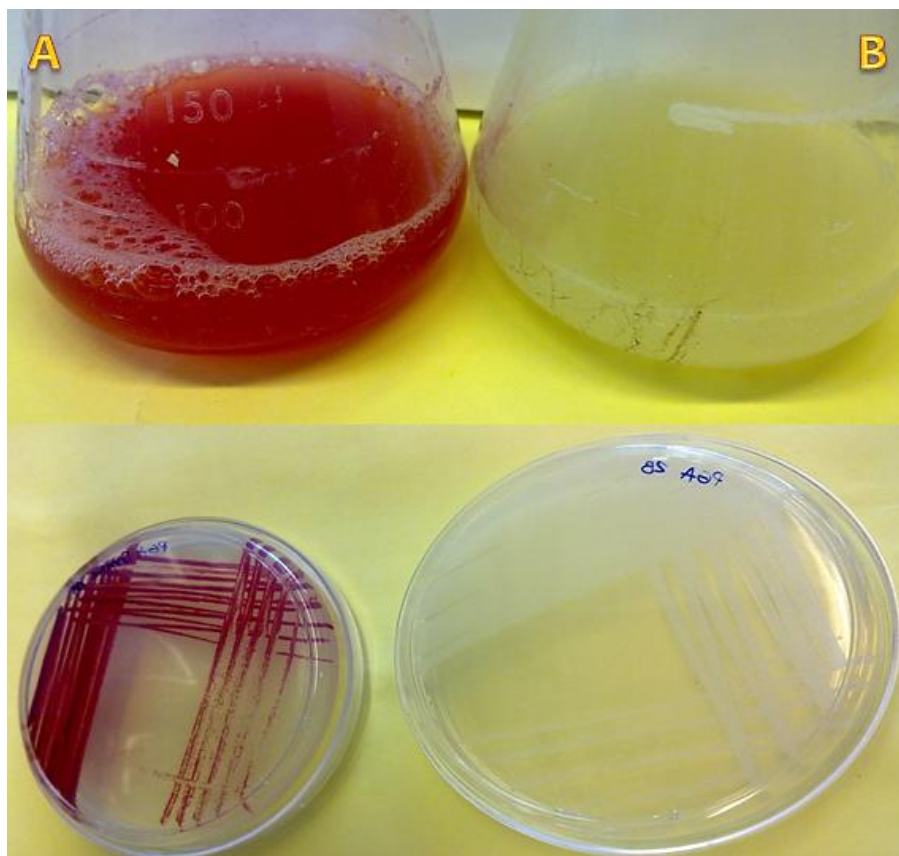


Figura XXVI. Cultivos líquidos y sólidos de las cepas de *Serratia marcescens* en medio PGA (Peptona Glicerol Agar) para la biosíntesis del pigmento rojo. A: Cepa control positivo de producción; B: Cepa 1B.

### Naturaleza del compuesto

Con el fin de determinar si el efecto bactericida de la cepa de *Serratia marcescens* (1B) sobre *Bacillus weihenstephanensis* (2B) se debía al pH final del cultivo o a una diferencia en las velocidades de crecimiento, se hicieron fermentaciones de ambos microorganismos midiendo pH y crecimiento (Figura XXVII). El pH de ambos cultivos se mantuvo en  $8.5 \pm 0.2$  y las velocidades de crecimiento también fueron muy semejantes entre sí, por lo que concluimos que ninguno de los dos aspectos influyó en la producción del halo de inhibición en contra de la cepa identificada como *B. weihenstephanensis*.

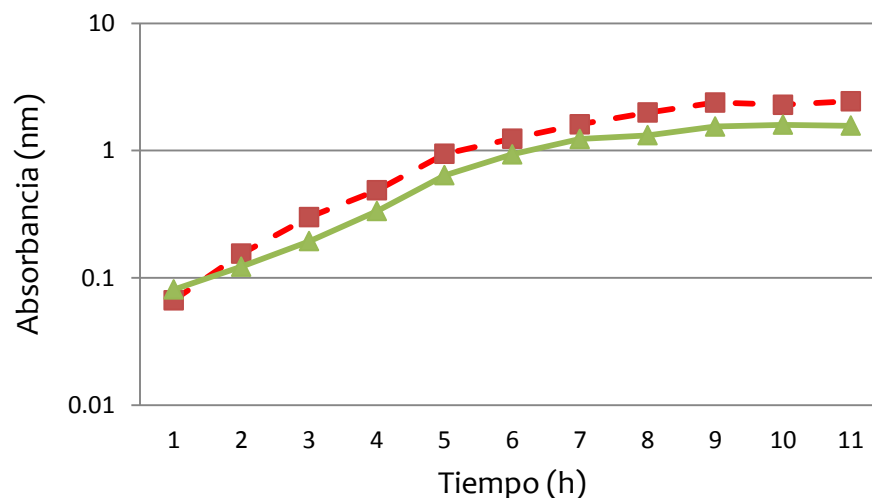


Figura XXVII. Cinética de crecimiento de *Serratia marcescens* (Rojo) y *Bacillus weihenstephanensis* (Verde). Ambos microorganismos fueron cultivados en caldo nutritivo a 29°C y 180 RPM de agitación. Las respectivas velocidades de crecimiento son:  $V_{S. marcescens} = 0.41 \text{ 1/h}$  y  $V_{B. weihenstephanensis} = 0.46 \text{ 1/h}$ .

### Producción del compuesto

La máxima producción del compuesto prodigiosina está dada a los 3 o 4 días de incubación, suponiendo que esta especie pudiera producir algún compuesto de naturaleza similar, podría tardarse el mismo tiempo que una cepa de *Serratia marcescens* evidenciada claramente por la pigmentación. Para evaluar el tiempo de mayor producción del o los compuestos con capacidad inhibitoria, se realizaron cinéticas de producción a diferentes tiempos (12, 24, 48, 72 y 96 h).

En estas cinéticas se evaluó el sobrenadante del medio de cultivo, filtrado a través de una membrada de 0.22  $\mu\text{m}$ , para eliminar células. Este filtrado, por un lado, fue probado directamente sobre sensidiscos (30  $\mu\text{l}$ ) en cajas Petri con el microorganismo sensible embebido; por otro lado, 1 ml del filtrado fue concentrado 10 veces y probado

de la misma forma sobre sensidiscos. Después de 24 h de incubación con los microorganismos sensibles, ambos efectos antibacterianos fueron nulos.

Sorprendentemente se observó que el efecto bactericida sólo está presente cuando existe contacto entre células de *Serratia marcescens* y un microorganismo sensible.

Para determinar si el o los compuestos inhibitorios eran intracelulares, partiendo de la idea de que podrían ser expulsados como respuesta a la presencia de otro microorganismo en el medio. Las células de 50 ml de cultivo (24, 48, 72 y 96 h) fueron rotas por sonicación, los sobrenadantes obtenidos (después de ser filtrados a través de una membrana de 0.22 µm) se probaron sobre sensidiscos colocados en cajas Petri con los microorganismos sensibles embebidos. De igual forma, se probó si había actividad inhibitoria empleando el concentrado (10 veces) de la fracción intracelular (obtenida por sonicación) sin embargo, los resultados permanecieron negativos.

De acuerdo a la literatura, *Serratia marcescens* es productora de diferentes compuestos como: proteasas, nucleasas, lipasas, quitinasas, bacteriocinas y surfactantes (Hejazi & Falkiner, 1997).

Como parte de la exploración del efecto antibacteriano, se emplearon diferentes metodologías para determinar la presencia de los compuestos antes mencionados (Hejazi & Falkiner, 1997).

A pesar de que las DNAsas y proteasas no tienen la capacidad para actuar como un agente antibacteriano, se evaluó la presencia de las mismas, debido a que es una característica muy distintiva del género *Serratia*. Las Dnasas son enzimas que catalizan la hidrólisis del ADN; la bacteria *S. marcescens* aislada en este estudio es positiva a DNasa (Figura XXVIII, E). Las proteasas también denominadas peptidasas, son enzimas importantes y extraordinarias desde el punto de vista biológico, su función es fragmentar proteínas por la hidrólisis de los enlaces peptídicos (Voet & Voet, 2006);

ésta prueba fue positiva, empleando caseína como sustrato (*Figura XXVIII, A*) a las 24, 48, 72 y 96 h de crecimiento, mostrando el mayor halo de hidrólisis a las 48 h.

Los triglicéridos son hidrolizados hasta ácidos grasos y glicerol por la acción de las enzimas lipasas; la presencia de estas enzimas fue evaluada empleando trioleína como sustrato. En contraste con la prueba de proteasas, no se encontró actividad de lipasa.

Las bacteriocinas son péptidos que poseen acción antimicrobiana sintetizadas por diferentes cepas bacterianas, algunas bacterias Gram positivas, como las bacterias lácticas y Gram negativas, como *Shigella flexneri*. Las bacteriocinas son un grupo heterogéneo, constituido mayoritariamente por péptidos de pequeño tamaño, cuya función es capacitar a las bacterias que las producen para sobrevivir frente a sus competidores. Actúan formando poros en la membrana citoplasmática y eliminando el potencial de membrana, lo que provoca la salida rápida de metabolitos de pequeño tamaño, como aminoácidos y nucleótidos, interrumpiendo los procesos de biosíntesis de la célula. En cuanto a la valoración de bacteriocinas, se encontró actividad para todas las cepas sensibles (*Figura XXVIII, B y C*), aunque los ensayos mostraron resultados muy irregulares, ya que ni los duplicados coincidieron, de tal forma que no pudieron analizarse los datos de forma adecuada. Una explicación es que el péptido podría no estar en la concentración suficiente para producir el efecto antibacteriano con la misma magnitud y frecuencia, a pesar de que se cargó el mismo volumen de sobrenadante por muestra.

Los biosurfactantes son moléculas con actividad superficial, producidas por células vivas. Son metabolitos secundarios excretados por microorganismos cuando crecen en medios con sustratos oleosos. Su presencia en medios acuosos modifica la tensión superficial y emulsifica los sustratos hidrófobos, se han clasificado de acuerdo a las moléculas que los estructuran (*Torres y Sánchez, 2001*). La prueba de producción de surfactante por *Serratia marcescens* (1B) fue positiva (*Figura XXVIII, D*), ya que al crecer en Caldo Nutritivo en presencia de CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) 0.2% y azul de metileno, se observó una zona traslúcida alrededor de las colonias bacterianas.

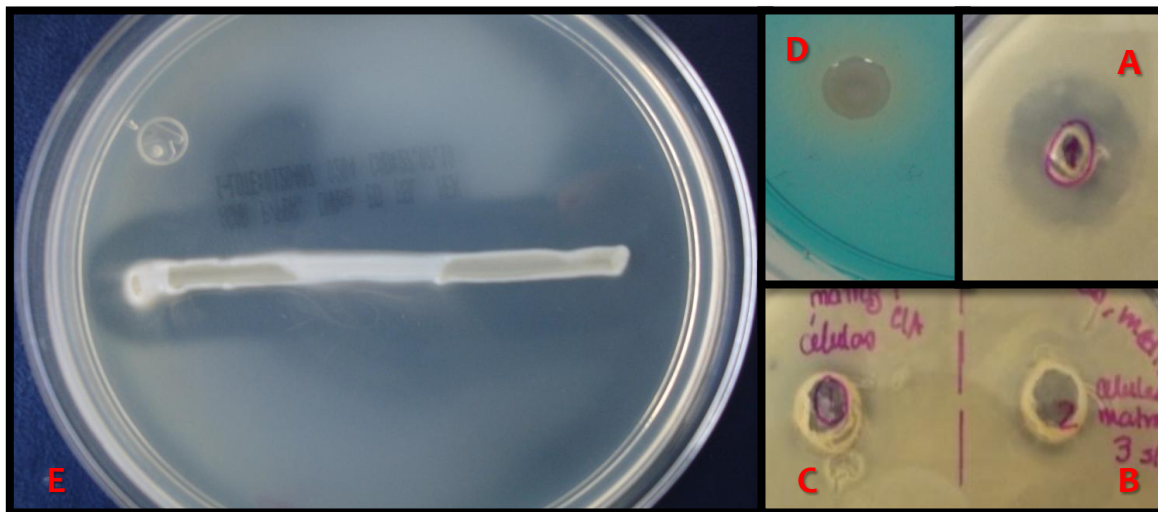


Figura XXVIII: Pruebas positivas de *Serratia marcescens*.  
(A) Proteasas; (B y C) Bacteriocinas; (D) Surfactante y (E) DNasa.

Un vez que se comprobó la producción del surfactante por parte de *Serratia marcescens*, de acuerdo a los ensayos, se determinó que éste no podría ser el causal del efecto antibacteriano. De ser así, el biosurfactante estaría en el medio de cultivo y estas fracciones mostrarían actividad, tal y como fue expuesto en experimentos previos. Resulta más prudente pensar que dicho efecto está mediado por la acción de bacteriocinas, este hecho podría explicar la ausencia de actividad en el sobrenadante, ya que el péptido no estaría en la concentración suficiente para generar un halo de inhibición. Además, se debe considerar, que la actividad también se podría ver disminuida debido a la presencia de proteasas.

#### Evaluación de la actividad lítica de *Serratia marcescens*

Con el fin de determinar si la actividad inhibitoria de *Serratia marcescens* (1B) se debía a lisis por la acción de péptidos presentes, se realizaron zimografías en SDS-PAGE. Para ello, se obtuvieron fracciones celulares de *S. marcescens*, las cuales fueron cargadas en geles SDS-PAGE, seguidos de su posterior separación por carga y tinción. En la tabla VI se muestran los carriles de las figuras que exponen geles de poliacrilamida.

Tabla VI. Composición de las muestras cargadas a cada gel.

Carril	Muestra	Proteína total (Bradford) mg/ml
1	Células intactas + B. Tris HCl pH8	---
2	Células rotas por sonicación + B. Tris HCl pH8	---
3	Citosol 1	0.1077
4	Citosol 2	0.094
5	Proteínas adheridas a membrana de células intactas, tratadas con B. de extracción (>10 kDa)	0.08
6	Proteínas adheridas a membrana de células rotas por sonicación, tratadas con B. de extracción (>10 kDa)	0.07
7	Proteínas adheridas a membrana de células intactas, tratadas con B. de extracción (<10 kDa).	0.08
8	Proteínas adheridas a membrana de células rotas por sonicación, tratadas con B. de extracción (<10 kDa).	0.04
9	Marcador de bajo peso molecular (BioRAD).	---

En la *figura XXIX* se muestra el gel correspondiente al perfil electroforético de las proteínas del citosol y de las asociadas a membrana, donde se observa que varias de las muestras tienen patrones de bandeo semejantes, tal es el caso del perfil de proteínas asociadas a células intactas y células rotas por sonicación (*Carril 1 y 2*); la concentración de proteína en estos carriles es alta, por lo que no se observan bandas definidas, salvo unas de aproximadamente 30 y 45 kDa.

## Perfil Electroforético

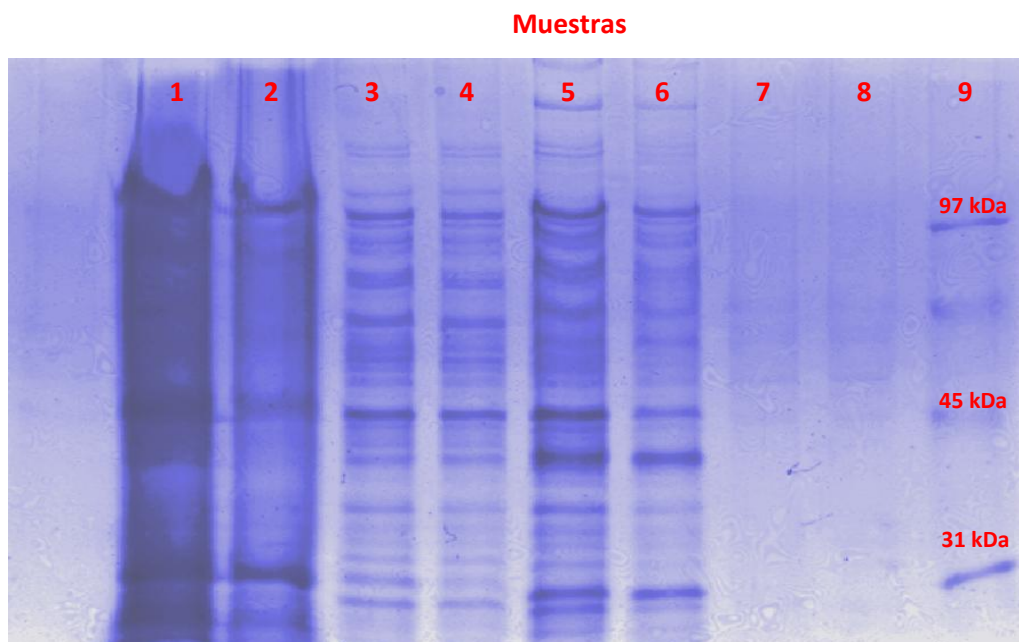


Figura XXIX: Electroforesis SDS-PAGE de las muestras indicadas en la tabla VI. (1) Células intactas + B. Tris HCl; (2) Células rotas por sonicación + B. Tris HCl; (3) Citosol; (4) Citosol; (5) Proteínas adheridas a membrana de células intactas, tratadas con B. de extracción (>10 kDa); (6) Proteínas adheridas a membrana de células rotas por sonicación, tratadas con B. de extracción (>10 kDa); (7) Proteínas adheridas a membrana de células intactas, tratadas con B. de extracción (<10 kDa); (8) Proteínas adheridas a membrana de células rotas por sonicación, tratadas con B. de extracción (<10 kDa); (9) Marcador de bajo peso molecular.

A partir de los geles SDS-PAGE se realizaron los zimogramas, primero para la evaluación de actividad proteolítica y después de lisis bacteriana. En la figura XXX se observa la actividad proteolítica aproximadamente a los 61 kDa en todos los carriles, excepto en las fracciones inferiores a 10 kDa. Cabe resaltar que en el gel se aprecia actividad por arriba de 120 kDa en los carriles 1, 2, 5 y 6.



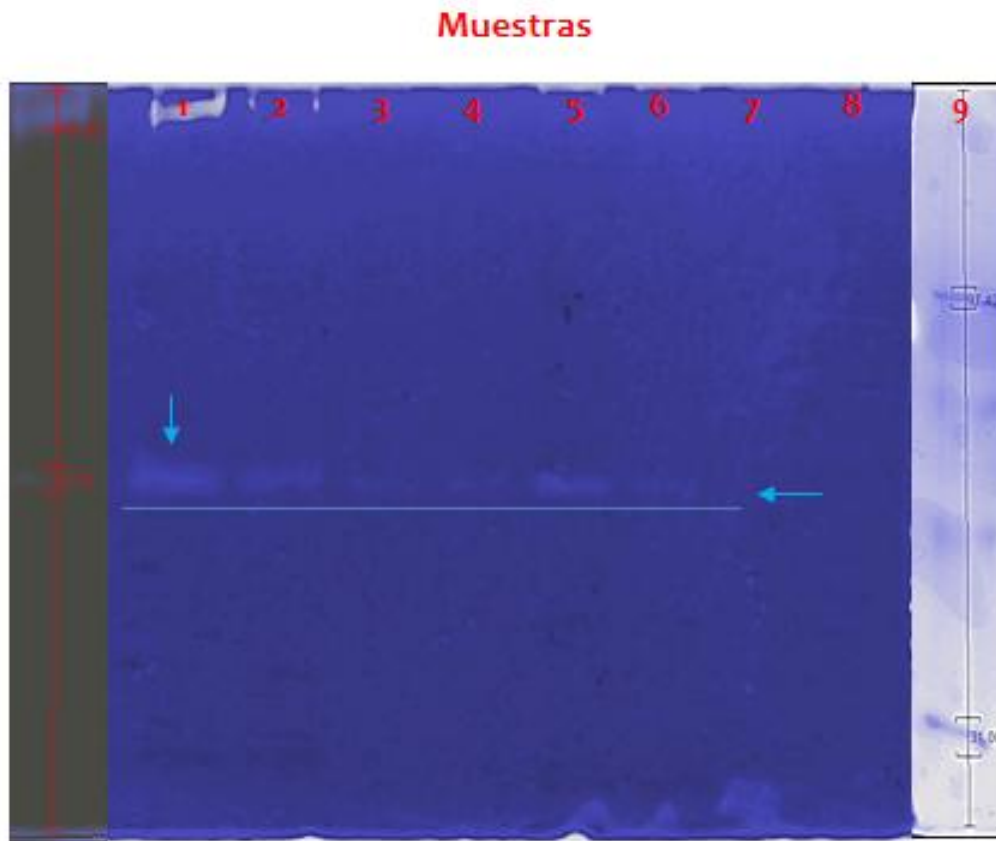


Figura XXX. Zimograma del gel SDS-PAGE de fracciones celulares de *Serratia marcescens* para evaluar la actividad proteolítica empleando gelatina 0.1% como sustrato. (1) Células intactas + B. Tris HCl; (2) Células rotas por sonicación + B. Tris HCl; (3) Citosol; (4) Citosol; (5) Proteínas adheridas a membrana de células intactas, tratadas con B. de extracción (>10 kDa); (6) Proteínas adheridas a membrana de células rotas por sonicación, tratadas con B. de extracción (>10 kDa); (7) Proteínas adheridas a membrana de células intactas, tratadas con B. de extracción (<10 kDa); (8) Proteínas adheridas a membrana de células rotas por sonicación, tratadas con B. de extracción (<10 kDa); (9) Marcador de peso molecular de bajo peso.

Con el objetivo de determinar la lisis bacteriana, se hizo un zimograma utilizando a *Micrococcus lysodeikticus* (Figura XXXI) buscando la ausencia de células indicadoras y por lo tanto actividad lítica. Se observó la presencia de dos bandas asociadas a células intactas (Carril 1) y células rotas por sonicación (Carril 2), de pesos moleculares aproximados a 32 y 38 kDa.

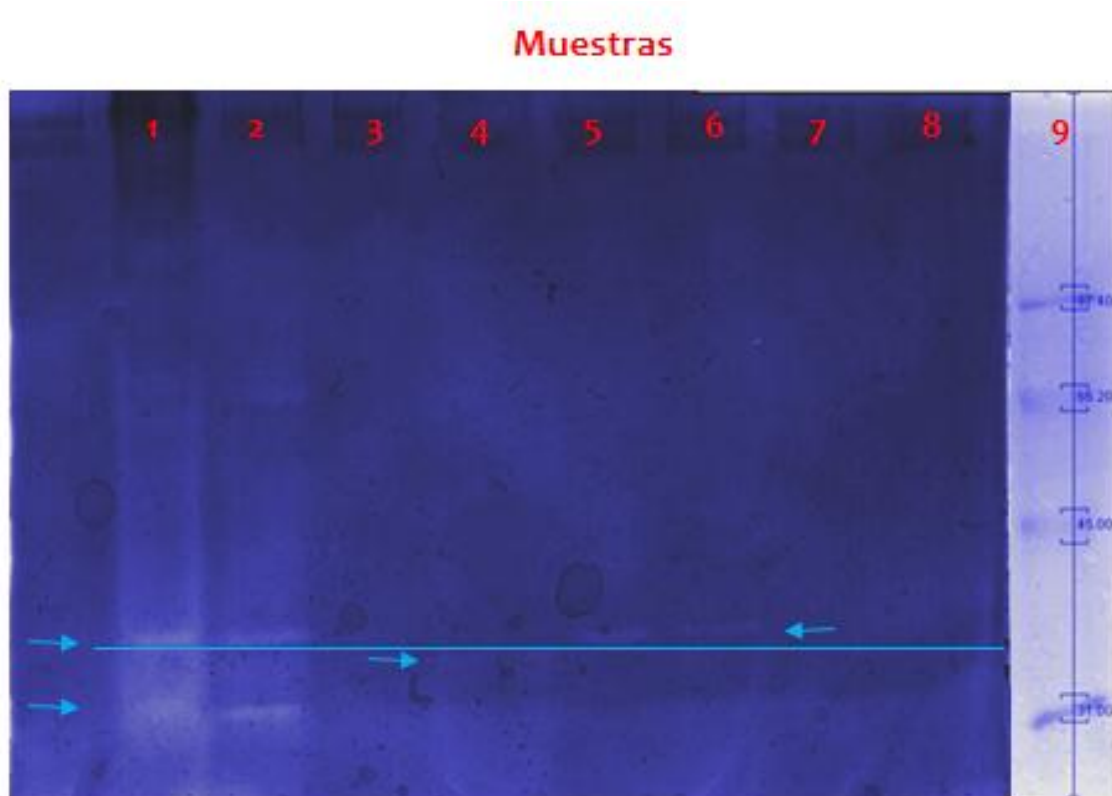


Figura XXXI. Zimograma del gel SDS-PAGE para determinar actividad lítica empleando a *Micrococcus lysodeikticus* a una concentración del 0.2%. (1) Células intactas + B. Tris HCl; (2) Células rotas por sonicación + B. Tris HCl; (3) Citosol; (4) Citosol; (5) Proteínas adheridas a membrana de células intactas, tratadas con B. de extracción (>10 kDa); (6) Proteínas adheridas a membrana de células rotas por sonicación, tratadas con B. de extracción (>10 kDa); (7) Proteínas adheridas a membrana de células intactas, tratadas con B. de extracción (<10 kDa); (8) Proteínas adheridas a membrana de células rotas por sonicación, tratadas con B. de extracción (<10 kDa); (9) Marcador de bajo peso molecular.

En los carriles 5 y 6 (proteínas adheridas a membrana de células intactas y rotas por sonicación tratadas con buffer de extracción >10 kDa) también existe una banda tenue de actividad lítica de 32 kDa. Las bandas de lisis observadas no muestran relación con las bandas de actividad proteolítica evidenciadas en el gel de gelatina (Figura XXX).

De acuerdo al peso molecular y pruebas previas en medio sólido, se sugiere que esta actividad lítica podría estar determinada por bacteriocinas pertenecientes a la clase III de la clasificación realizada por Ness en 1996; la cual corresponde a bacteriocinas de elevado peso molecular (>30 kDa) como las helveticinas J y V, acidofilicina A, lactacinas A y B.

Se realizaron ensayos de difusión en agar utilizando las mismas fracciones cargadas a los geles de poliacrilamida. Los resultados mostraron que la mayor actividad inhibitoria se presentaba frente a *Micrococcus luteus*, con un mayor halo en la fracción citosólica (Tabla VII). La cepa 2B, identificada como *Bacillus weihenstephanensis*, fue el segundo microorganismo en presentar mayor inhibición, en este caso el halo de mayor tamaño se observó con la fracción de proteínas adheridas a membrana de células rotas por sonicación, tratadas con B. de extracción >10 kDa (Tabla VII).

En el ensayo de difusión en agar empleando células intactas y células rotas por sonicación hubo crecimiento. En la tabla VII aparecen números negativos que se interpretan como ausencia de halo, pues es el resultado de restar el control (Buffer de Extracción).

*Escherichia coli* fue la bacteria menos susceptible a las fracciones probadas, sólo las proteínas adheridas a membrana de células rotas por sonicación, tratadas con buffer de extracción (>10 kDa) lograron tener un efecto inhibitorio sobre dicha cepa. En general, las muestras con mayor potencial inhibitorio observado mediante este experimento son las correspondientes al citosol y proteínas adheridas a membrana de células rotas por sonicación, tratadas con buffer de extracción (>10 kDa).

Tabla VII. Promedio de los halos de inhibición en ensayos de difusión en agar, resultado de la evaluación de las fracciones cargadas a los geles de poliacrilamida antes mencionados.

Muestra	<i>B. subtilis</i>	<i>B. weihenstephanensis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>
1	6.6 $\phi$	8 $\phi$	8.3 * $\phi$	--
2	4.2*	7.5	7.4	--
3	6.5	5	8.8	--
4	5.6	4.8	7.3	--
5 $\Delta$	-4*	2.1	1	--
6 $\Delta$	3.5	15.1	1	5.6
7 $\Delta$	-8.5*	1	2	--
8 $\Delta$	--	--	--	--
9	9.5*	1.5	5	--

(1) Células intactas + B. Tris HCl; (2) Células rotas por sonicación + B. Tris HCl; (3) Citosol; (4) Citosol; (5) Proteínas adheridas a membrana de células intactas, tratadas con B. de extracción (>10 kDa); (6) Proteínas adheridas a membrana de células rotas por sonicación, tratadas con B. de extracción (>10 kDa); (7) Proteínas adheridas a membrana de células intactas, tratadas con B. de extracción (<10 kDa); (8) Proteínas adheridas a membrana de células rotas por sonicación, tratadas con B. de extracción (<10 kDa); (9) Buffer de extracción. Unidades = mm;  $\Delta$  = muestras que contienen buffer de extracción por lo que se restó el control. \* Halo bacteriostático.  $\phi$  Crecimiento bacteriano.

### ***Bacillus weihenstephanensis***

En 1998, *Bacillus weihenstephanensis* fue sugerido como una nueva especie en las diferentes bases de secuencias de genes ribosomales y genes de proteínas de choque térmico frío (Stenfors et al., 2002). Pocas características fisiológicas específicas están disponibles para distinguir a las cuatro especies válidas del grupo de *B. cereus*: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycooides* y *B. anthracis*. Las cuatro especies comparten un alto grado de similitud genética como lo demuestran los estudios de hibridación ADN-ADN y la comparación del ARNr o ADNr bacteriano en el 16S, 23S y las regiones espaciadoras 16S-23S (Lechner et al., 1998).

*Bacillus weihenstephanensis* es una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa, formadora de esporas que generalmente se encuentra en el suelo. Es una especie psicrotolerante de *B. cereus* y estudios filogenéticos realizados en la cepa KBAB4 muestran que en la naturaleza es el grupo más activo en términos de intercambio genético. *B. weihenstephanensis*, posee cuatro plásmidos que codifican alrededor de 240 kb de material genético extra-cromosómico que pueden explicar este fenómeno de intercambio de genes. Esto puede indicar un potencial mecanismo de propagación de la toxicidad de la comunidad psicrófila a otros miembros de *Bacillus*, razones por las cuales podría incrementar los riesgos de salud humana (Lechner et al. 1998; Thorsen et al., 2006).

De acuerdo a las observaciones realizadas en el laboratorio, morfológicamente *Bacillus weihenstephanensis* (2B) no es parecida a *B. cereus*, aunque algunos autores reportan que la morfología celular y la utilización de sustratos son similares a *B. cereus*; no podría confundirse con *B. thuringiensis* por los cristales de carácter proteico que posee en la fase de esporulación, ni a *B. mycooides* por el tipo de crecimiento en forma de espiral que presenta cuando crece en medio sólido, realmente *B. weihenstephanensis* es muy semejante morfológicamente a *B. anthracis*.

Para hacer una comparación con alguna cepa tipo de *Bacillus weihenstephanensis*, se realizaron esfuerzos por conseguirla en varias colecciones de cepas, sin embargo, esta bacteria está catalogada como una especie patógena humana y no se permite su envío.

El trabajo de *Lechner et al. en 1998*, en donde se aisló por primera vez a *Bacillus weihenstephanensis* reporta una secuencia de pares de bases distintiva dentro del 16S <sup>1003</sup>TCTAGAGATAG, así como la capacidad para crecer a 4°C, 7°C y a no a 43°C. Esta secuencia de bases está presente en el 16S de la bacteria explorada en este estudio.

Se evaluó esta psicrotolerancia midiendo crecimiento por peso seco, y en efecto la cepa crece a 4°C pero no a 43°C.

Finalmente es preciso decir que existen reportes de bacterias fitopatógenas pertenecientes al género *Bacillus* (*Sosa- Moss et al. 1996*) por lo que no se descarta la posibilidad de que *B. weihenstephanensis* sea uno de ellos.

- El presente estudio confirma la utilidad de las bacterias como fuente de compuestos antibacterianos. Se logró el aislamiento de 107 poblaciones microbianas asociadas a *Magnolia dealbata* Zucc. bacterias en mayor proporción, 13 de las cuales generaron un efecto antimicrobiano.
- Las cepas bacterianas abundadas en este estudio fueron identificadas molecular y bioquímicamente como *Serratia marcescens* (1B) y *Bacillus weihenstephanensis* (2B).
- *Serratia marcescens* produjo un efecto bactericida de amplio espectro; posee actividad proteolítica, de DNasa, bacteriocinas, lítica y surfactante.
- La actividad lítica de *Serratia marcescens* está dada por proteínas de 32 y 38 kDa, las cuales podrían ser bacteriocinas de alto peso molecular y las responsables del efecto antibacteriano encontrado en este estudio.
- Por otro lado, existen reportes de bacterias fitopatógenas pertenecientes al género *Bacillus* (Sosa-Moss et al., 1996), dado el tipo de crecimiento que presenta *B. weihenstephanensis*, no se descarta la posibilidad de que sea un patógeno de plantas.

## MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

Agar Nutritivo	23 g/l
<i>Fórmula: Peptona y extracto de carne.</i>	

Caldo nutritivo	g/l
Bacto extracto de carne	3
Bacto peptona	5

Czapeck	g/l
Sacarosa	30
NaNO <sub>3</sub>	3
MgSO <sub>4</sub>	0.5
KCl	0.5
FeSO <sub>4</sub>	0.01
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0
Agar	15
Cloranfenicol	25 mg/ml

Medio YMG	g/l
Digerido péptico de tejido animal	5
Extracto de levadura	3
Extracto de malta	3
Dextrosa	10
Agar	20

Medio M2	%
Extracto de levadura	1
Peptona	2
Glucosa	1
Agar	1.5

Medio LB	%
Triptona (bactotriptona)	1
Extracto de levadura	0.5
NaCl	1

Medio MBS	g/l
Extracto de levadura	0.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.2
NH <sub>4</sub> Cl	1.0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2
Caseína	2%

### Soluciones para extracción de ADN

STET	
NaCl	0.1 M
Tris.HCl pH 8	10 mM
EDTA pH 8	1 mM
Tritón x-100	5%

Buffer TE	
Tris pH 8	10 mM
EDTA	1 mM

CTAB/NaCl	
CTAB	10%
NaCl	0.7 M
Disolver a 65°C si es necesario.	



## Tinción de Gram

Cristal violeta	
Solución A	
Cristal violeta	2 g
Etanol	20 ml
Solución B	
Oxalato amónico	8 g
Agua destilada	80 ml
Mezclar y filtrar.	
Lugol	
Yodo	1 g
KI (Yoduro de potasio)	2 g
H <sub>2</sub> O	300 ml

*NOTA: El yodo con el yoduro de potasio se muele en un mortero y poco a poco se agrega el yoduro de potasio y poco a poco se agrega el agua destilada, una vez disuelto se vacía a una botella opaca para evitar la descomposición.*

Alcohol – Acetona	70:30
-------------------	-------

Safranina	ml
Solución safranina 2.5%	10
H <sub>2</sub> O	100

Verde de malaquita
Solución 5% acuosa.

Buffer de corrida TAE (Tris-acetato) 50X	
Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 ml
EDTA (0.5 M, pH 8)	100 ml

## Soluciones para geles SDS-PAGE

Buffer de Extracción	
EDTA	10 mM
NaCl	10 mM
Tris- HCl	10 mM
SDS	2%
pH 8	

Buffer de carga para muestra 4X	
SDS	0.4 g
Glicerol	5 ml
Buffer SDS-PAGE 4X pH 6.8	2.5 ml
Azul de bromofenol (5%)	400 µl
Mezclar y aforar a 9ml con H <sub>2</sub> O, hacer alícuotas de 900 µl y adicional 100 µl de β- mercaptoetanol	

Buffer de renaturalización	
Tris-HCl	10 mM
Tritón X-100	1%
pH 8	

Buffer de corrida 10x	
Tris	250 mM
Glicina	1.92 M
SDS	0.1%
H <sub>2</sub> O dest.	cbp 1 L
pH 8.3	

Gel separador (12%)	
H <sub>2</sub> O	3.09 ml
Buffer SDS-PAGE 4X pH 8.8	1.91 ml
SDS 10%	85 µl
Acrilamida	3.39 ml
Persulfato de amonio 10%	56 µl
TEMED	5.3 µl

Gel concentrador (5%)	
Acrilamida	415 µl
Buffer SDS-PAGE 4X pH 6.8	250 µl
SDS 10%	25 µl
H <sub>2</sub> O	1.8 ml
Persulfato de amonio 10%	17.5 µl
TEMED	1.75 µl

Zimograma - Gel separador	
Células <i>Micrococcus lysodeikticus</i>	0.2% (17 mg)
Gelatina	0.1% (10 mg)
H <sub>2</sub> O	3.09 ml
Buffer SDS-PAGE 4X pH 8.8	1.91 ml
SDS 10%	85 µl
Acrilamida	3.39 ml
Persulfato de amonio 10%	56 µl
TEMED	5.3 µl

Solución teñidora azul Coomassie R-250	
Azul de Coomassie	0.1%
Metanol	45%
H <sub>2</sub> O	40%
Ac. Acético glacial	10%

Solución destañidora	
Metanol	45%
Ac. Acético glacial	10%
H <sub>2</sub> O	45%

Solución azul de metileno	
Azul de metileno	0.1%
KOH	0.01%

## Técnicas Moleculares

### Extracción de ADN genómico

- Inocular 5 ml de cultivo líquido con la cepa bacteriana de interés.
  - Crecer en condiciones apropiadas hasta que el cultivo esté saturado.
- Centrifugar 1.5 ml del cultivo en una microcentrífuga por 2 min a 13, 200 RPM o hasta que se forme el pellet compacto.
  - Eliminar el sobrenadante.
- Resuspender el pellet en 565 µl de buffer TE pipeteando varias veces.
  - Añadir 30 µl de 10% SDS y 3 µl de proteinasa K 20 mg/ml para dar una concentración final de 100 µg de proteinasa K en 0.5% de SDS.
  - Agitar vigorosamente e incubar 1 h a 37°C.
  - La solución debe hacerse viscosa conforme el detergente lisa las paredes celulares. No hay necesidad de predigerir la pared celular con lisozima.
- Añadir 100 µl de una solución de NaCl 5 M y agitar vigorosamente.
  - Paso importante puesto que el precipitado de ácido nucleico-CTAB se formará si la concentración de sal cae por debajo de 0.5 M a temperatura ambiente. Se eliminan proteínas, pared celular, polisacáridos en complejo con CTAB y se retienen los ácidos nucleicos en la solución.
- Añadir 80 µl de CTAB / NaCl.
  - Agitar vigorosamente e incubar 10 min a 65°C.
- Añadir un volumen aproximado de 0.7 a 0.8 ml de cloroformo/alcohol isoamílico.
  - Agitar fuertemente.
  - Centrifugar 4 o 5 min en una centrífuga a 13, 200 RPM.
- Pasar el sobrenadante acuoso, viscoso a un tubo de microcentrífuga, dejando la interfase atrás.
  - Añadir volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico.
  - Agitar vigorosamente.
  - Centrifugar 5 min a 13, 200 RPM.

- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
  - Añadir 0.6 volumen de isopropanol para precipitar los ácido nucleicos.
  - Agitar el tubo adelante y atrás hasta que un precipitado blanco de ADN se vuelva visible.
  - Centrifugar a 13 200 RPM durante 15 min.
  - En este punto es posible transferir el pellet a un tubo que contiene alcohol al 70%.
- El ADN se lava con alcohol 70% para remover el CTAB residual re-centrifugar por 5 min a temperatura ambiente para resuspenderlo.
  - Cuidadosamente remover el sobrenadante.
  - Secar el pellet a temperatura ambiente por 15 min.
- Resuspender el pellet en 100 µl de buffer TE, los que se observen con poco ADN, en 50 µl de TE.
- Agregar RNasa 10 mg/ml (1 µl) e incubar 1 h a 37°C.
- Agregar 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico + H<sub>2</sub>O esterilizada hasta alcanzar 1 ml de volumen final.
- Agregar 0.1 volumen de NaCl 1 M.
- Agitar y centrifugar 5 min a 13200 RPM.
- Agregar 0.6 volumen de isopropanol. Agitar vigorosamente y centrifugar 15 min a 13200 RPM.
- Desecharel isopropanol.
- Agregar 1 ml de etanol al 70%, centrifugar 10 min.
- Decantar el etanol.
- Secar.
- Resuspender en 100 µl de H<sub>2</sub>O esterilizada. (Ausubel et al., 1991).

### *Electroforesis en gel de Agarosa*

- Para preparar 50 ml de un gel de agarosa 0.8% se adiciona 1  $\mu$ l de bromuro de etidio.
- Realizar mezcla de 1  $\mu$ l de marcador de peso molecular 1 Kb + 1  $\mu$ l de buffer de carga 6X.
- Depositar en cada uno de los pozos del gel de electroforesis las diferentes muestras mezcladas con buffer de carga.
- Se corre el gel por aproximadamente 2 h a 70 V.
- El gel se observa en un transiluminador Dual-Intensity Transilluminator UVP, para observar las bandas.
- Finalmente se fotodocumentan en un equipo Gel-logic (Kodak).

### *Purificación de bandas de ADN de un gel de agarosa*

- Se corre un volumen aproximado de 50  $\mu$ l de muestra con 5 de buffer de carga en un gel de agarosa al 0.8% de pozo grande. Una vez que ha corrido, se corta el fragmento que contiene la banda de interés.
- Se corta en pedazos pequeños el fragmento de gel.
- Se introducen los pedazos a un tubo eppendorf de 0.6 ml que contiene fibra de vidrio, este tubo tiene un pequeño orificio en la parte inferior que permite la salida del ADN a un tubo eppendorf de 1.5 ml.
  - Centrifugar 1 min a 3000 RPM.
- Se obtiene una mezcla de ADN con buffer de corrida TAE 1X. Separar el tubo que contiene fibra de vidrio e introducirlo en un tubo eppendorf nuevo.
  - Centrifugar 1 min a 3000 RPM.
  - Retirar el tubo de fibra de vidrio.
- Juntar los eluatos de los tubos eppendorf y agregar un volumen igual de fenol/cloroformo.
  - Centrifugar 5 min a 13000 RPM.
- Separar la fase acuosa y eliminar el sobrenadante.
- Agregar 1/10 del volumen de NaCl y 2.5 vol de etanol absoluto.
  - Agitar.

- Incubar 30 min a -20 C.
  - Centrifugar 20 min a 13000 RPM.
- Secar a 40°C durante 15 min.

#### *Transformación de Escherichia coli por electroporación*

- 1.- Agregar 2 µl de ligación a 50 µl células electrocompetentes DH5α en una celda para electroporar de 0.1mm.
- 2.- Darle un choque eléctrico de 1.25 kV durante 4 milisegundos.
- 3.- Agregar 950 µl de LB + glucosa 100 mM.
- 4.- Incubar en agitación de 200 RPM durante 1 h a 37°C. Después de la incubación, agregar 250 µl a una caja de LB + Ampicilina (150 µg/ml) + X-Gal (40 µg/ml) + IPTG (60 µl por 250 ml de medio). Incubar por 24 h a 37°C.
- 5.- Con un palillo estéril picar colonias blancas e inocular 5ml de medio LB + Ampicilina (150 µg/ml).
- 6.- Incubar a 37°C en una agitadora a 200 RPM.

- **Arias, H. (1992).** Información básica municipal de Veracruz. Cambio XXI Fundación. Artes Gráficas. Veracruz.
- **Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. & Struhl Kevin. (1991).** Current Protocols in Molecular Biology, volume I. Ed. Wiley. Unit I.
- **Bradford, M. (1976).** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- **Brizuela, M. A., García, L., Pérez, L. y Mansur, M. (1998).** Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. Revista Iberoamericana de Micología. 15: 69-74.
- **Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. (1974).** Bergey's manual of determinative bacteriology. (Eighth edition), The Williams and Wilkins Co. Baltimore. pp.747 - 842.
- **Cappuccino, J. G. & Sherman, N. (2008).** Microbiology, a laboratory manual. Ninth edition, Pearson, Sn. Francisco, USA. pp. 59, 287-291.
- **Centro Estatal de Estudios Municipales. (1988).** Los municipios de Veracruz. Colección Enciclopedia de los Municipios de México. Secretaría de Gobernación y Gobierno del Estado de Veracruz-Llave. Talleres Gráficos de la Nación. México. D.F.
- **Clayton, E. & Von Graevenitz, A. (1966).** Nonpigmented *Serratia marcescens*. The Journal of the American Medical Association. 197(13): 111-116.
- **Demain, A. & Sanchez, S. (2009).** Microbial drug discovery: 80 years of progress. The Journal of Antibiotics. 62: 5-16.
- **Ding, M. J. & Williams, R. P. (1983).** Biosynthesis of Prodigiosin by White Strains of *Serratia marcescens* Isolated from Patients. Journal of Clinical Microbiology. 17(3): 476-480.
- **Domínguez, F., Chávez, M., Garduño, R. M., Chávez, A. V., Mata, M. & Cruz, S. F. (2009).** Production of honokiol and magnolol in suspension cultures of *Magnolia dealbata* Zucc. Natural Product Communications. 4(7): 939-943.
- **González T. (2010).** Los enzibióticos como agentes terapéuticos antibacterianos y antifúngicos. Imprenta de la Universidad de Santiago de Compostela. pp. 26-29.

- **Hejazi, A. & Falkiner, F. R. (1997).** *Serratia marcescens*. Review article. J. Med. Microbiol. 46: 903-912.
- **Jui-Lung, S., Kee-Ming, M., Po-Hsun, H., Wen-Chi, C., Der-Cherng, C., Ya-wen, C., Po-Len, L., Ming-Chih, C. & Yung-Hsiang, C. (2010).** Honokiol and Magnolol as Multifunctional Antioxidative Molecules for Dermatologic Disorders. *Molecules*. 15(9): 6452-6465.
- **Koneman, E. (2008).** Diagnóstico microbiológico. 6a edición. Editorial Médica Panamericana. pp: 183-184.
- **Kotani, A., Kojima, S., Hakamata, H., Dongri, J. & Kusu, F. (2005).** Determination of Honokiol and Magnolol by Micro HPLC with Electrochemical Detection and Its Application to the Distribution Analysis in Branches and Leaves of *Magnolia obovata*. *Chem. Pharm. Bull.* 53(3): 319-322.
- **Lechener, S., Mayr, R., Francis, K., Püß, Kaplan, T., Wießner-Gunkel, E., Stewart, G. & Scherer, S. (1998).** *Bacillus weihenstephanensis* sp. Nov. Is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Systematic Bacteriology*. 48: 1373-1382.
- **Leeman, N. R. (2008).** Prevention and Treatment of Head and Neck Cancer with Natural Compound Inhibitors of STAT3. UMI Microform, pp. 103.
- **Liébana, U. J. (2004).** Microbiología Oral. 2da. Edición. McGraw-Hill, Interamericana. pp. 103-106.
- **López, L. A. y Sánchez de Lorenzo, C. J. (1998).** Árboles en España, manual de identificación. Grupo Mundi-Prensa. España. pp. 101-105.
- **López, M. J., Ochoa, Z. A., Santoyo, P. G., Anaya, L. J., Medina, M. E., Martínez, T. M. y Loeza, L. P. (2008).** Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamiento biomédicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 39(3): 49-57.
- **Madigan, M., T., Martinko J. M., Dunlap P., V. & Clark D., P. (2009).** Brock's Biology of Microorganisms. 12<sup>th</sup> ed. Pearson. USA. pp: 297-299.
- **Manzi, L. V. y Mayz, J. C. (2003).** Valorando los microorganismos. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 23(1): 85-88.



- **Martínez, A., Domínguez, F., Orozco, S., Chávez, M., Salgado, H., González, M., & González-Trujano, M. E. (2006).** Neuropharmacological effects of an ethanol extract of the *Magnolia dealbata* Zucc. leaves in mice. *ELSEVIER*. 106(2): 250-5.
- **Martínez, M. C., Ortiz, M. D., Ogura, T. y Beltrán, G. M. (2010).** Microorganismos endófitos ¿Amigos o enemigos de las plantas? *Revista Ciencia y Desarrollo*. 36(242): 6-11.
- **Medina, C. M., Cristancho, D. y Uribe, D. (2009).** Respuesta fisiológica y capacidad antagonista de aislamientos filoféricos de levaduras obtenidos en cultivos de mora (*Rubus glaucus*). *Acta biológica Colombiana*. 14(3): 179-196.
- **Murphy, C. M. (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4): 546-582.
- **Pathania, R. & Brown, E. D. (2008).** Small and lethal: searching for new antibacterial compounds with novel modes of action. *Biochemistry and cell Biology*. 86(2): 111-115.
- **Ramírez, P. L. y Castaño, D. M. (2009).** Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*. Año XV. 42: 263-268.
- **Rodicio, M. R. y Mendoza, M. C. (2004).** Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*. 22(4): 238-45.
- **Romero, C. R. (2007).** Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. pp. 149 y 150.
- **Sarker, S. & Maruyama, Y. (2002).** *Magnolia: The genus Magnolia*. Illustrated edition. pp. 187.
- **Soberón, M., y Bravo, A. (2008).** *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas. Instituto Nacional de Tecnología Industrial. Microbios. Capítulo 12.
- **Sosa-Moss, C., Perdomo, R. F., Brathwaite, C. W. y Salazar, C. J. (1996).** Manual de técnicas para el diagnóstico de las enfermedades de las plantas. pp: 63.
- **Stenfors, L. P., Mayr, R., Scherer, S. & Granum, P. E. (2006).** Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains. *FEMS, Microbiology Letters*. 215: 47-51.

- **Stierle, A., Strobel, G. & Stierle, D. (1993).** Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew. *Scienc.* 260 (5105): 214-216.
- **Taylor, P. L. & Wright, G. D. (2008).** Novel approaches to discovery of antibacterial agents. *Animal Health Research Reviews.* 9(2): 237-246.
- **Thorsen, L., Hansen, B. M., Nielsen, K. F., Endriksen, N. B., Phipps, R. K. & Budde, B. B. (2006).** Characterization of Emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a New Cereulide-Producing Bacterium. *Appl. Envir. Microbiol.* 72: 5118 - 5121.
- **Torres, G. J. y Sánchez, C. J. (2001).** Producción de un biosurfactante microbiano por *Torulopsis magnoliae* en cultivos sumergidos por carga. *CIENCIA.* 9 (3): 305-312.
- **Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. (2007).** Introducción a la microbiología. 9ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana. pp. 80-82.
- **Velazco, C., Foroughbakhch, P., Alanís, G. y Alvarado, A. (2008).** *M. dealbata* en Nuevo León, México. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León *Revista mexicana de Biodiversidad.* 79: 459-463.
- **Voet, D. y Voet, J. G. (2006).** Bioquímica. 3a edición. Médica panamericana. Argentina. pp. 133 y 163.
- **Watanabe, K., Ikegami, F. & Horie, S. (2002).** *Magnolia*. Chapter 1. Introduction, The Genus *Magnolia*, Edited by Satyajit D. Sarker and Yuji Maruyama.
- **Wilson, K. H. (1987).** Preparation of genomic DNA from bacteria. In *Current protocols in Molecular Biology*. Edited by F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D.D. Moorc, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhls. New York: Wiley. pp. 2.4.1-2.4.2.