



Universidad Nacional Autónoma de México

---

## Facultad de Química

**Evaluación de una cepa de *Pseudomonas* asociada a *Magnolia dealbata* Zucc. por su capacidad para producir compuestos con actividad farmacológica potencial.**

***TESIS***

***Que para obtener el grado de:***

---

**Química Farmacéutica Bióloga**

***Presenta:***

---

**Diana Lemus Hernández**



**MÉXICO D.F.**

**2013**



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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: Q.F.B. ADRIANA GUADALUPE MEJÍA CHÁVEZ**

**VOCAL: DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA**

**SECRETARIO: DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL**

**1ER. SUPLENTE: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO**

**2° SUPLENTE: M. EN B. BEATRIZ RUÍZ VILLAFÁN**

**Sitio donde se desarrolló el tema:** Laboratorio de Microbiología Industrial. Dpto: Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM.

---

Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Asesor

---

M. en B. Beatriz Ruíz Villafán

Supervisor Técnico

---

Diana Lemus Hernández

Sustentante

## **Agradecimientos académicos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, gracias por permitirme formar parte de ti, conocer tu esencia. Gracias por ser mi *alma máter*.

A la Facultad de Química, por todos los años de hospedaje, de alegrías, de desvelos y sobre todo de enseñanzas.

Al Dr. Sergio Sánchez, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo. Por siempre estar dispuesto a escuchar, sus enseñanzas, su apoyo.

A la M. en B. Beatriz Ruíz, por tu paciencia y, por siempre estar dispuesta a escuchar y enseñar.

A la Dra. Martha Macías, por todo el apoyo brindado. Por su gran disposición para enseñar.

A la Q.F.B. Adriana Guadalupe Mejía Chávez, por su entera disposición durante la revisión.

Al Dr. Roberto Hernández y Juliana, por permitirnos usar sus instalaciones. Por el tiempo brindado y, el apoyo.

A la M. en C. Mariana Ávalos, por todas tus enseñanzas, por ser el primer contacto con éste maravilloso equipo de trabajo.

A la M. en C. Silvia Guzmán, por tus enseñanzas. Porque sin ti nada de esto sería posible.

Al M. en C. Víctor Tierrafría, por tu apoyo académico.

Al Dr. Ignacio Camacho, por las enseñanzas, por el apoyo brindado y, sobre todo por permitirme conocer el mundo de la investigación científica.

A la Dra. Aliesha González, por brindar un apoyo incondicional, por tu paciencia para enseñar. Por permitirme conocer el mundo de la investigación científica.

A mis padres Martha y Julio, por sus enseñanzas diarias, por alimentar mis sueños, por enseñarme a caminar para que ahora pueda recorrer mi vereda. Por tantas cosas que no caben en una sola hoja, gracias. Los quiero.

*“El mejor científico está abierto a la experiencia y, esta empieza con un romance, es decir, la idea de que todo es posible”*

Ray Bradbury

## **Agradecimientos personales:**

A mis padres, por ser parte de mi vida.

A mis sobrinos, gracias por hacer de algo simple, algo divertido. Por recordarme lo importante en la vida.

A mis tíos, por ser siempre un apoyo incondicional. Por estar en las buenas y en las malas.

A mis primos, si aunque lo duden. Gracias por dejarme ser parte de su vida. Por tantos momentos alegres. Los quiero.

A mis compañeros de esta parte del camino, los quiero demasiado, en verdad sin ustedes el camino no hubiese sido el mismo.

Gaby, gracias por ser mi amiga durante la adaptación a la Universidad. Aunque al principio nada parecía pintar bien, venos ahora casi 6 años después. Gracias por las risas, los sueños y las clases divertidas.

Josh, gracias por siempre tener una sonrisa para mí. Por más malo que pareciera el día siempre lo alegrabas.

Aglaé, gracias por escuchar mil veces la misma historia. Por tus consejos y palabras de aliento, claro y por tus regaños.

Robert, gracias por siempre tener un comentario gracioso para alegrar los días. Por hacer de la clase más aburrida algo divertido. Por tantos momentos compartidos.

Viri, gracias por todo el apoyo no sólo emocional sino académico brindado. Gracias por compartir tantos momentos conmigo.

Jaque, gracias por los “y luego ...”, por los cafés, por las pláticas.

Danny, gracias por los momentos de risa compartidos y ahora las rodadas.

A todos mis compañeros del Laboratorio. Alba, Brenda, Diana R, Montse, Betty, Marijó, Tere, Mariana, Gaby, Andreita, Adán, Rodrigo y sobre todo al Doctor Sergio, gracias por permitirme formar parte de éste maravilloso grupo de trabajo. Sobre todo por hacer del laboratorio un lindo lugar de trabajo. Y en especial a Karol, Silvia, Allan y Víctor, gracias por preocuparse cada uno a su manera por mí. Espero que nuestra amistad no sea temporal.

Karol, gracias porque a pesar de tener poco tiempo en el laboratorio, me has brindado tu amistad y confianza.

Allan, gracias por tu amistad, por preocuparte por mis mil estados de ánimo, por estar dispuesto siempre a escucharme y tenerme confianza.

Silvia, gracias por tu amistad, tu confianza, soportarme, brindarme palabras de aliento cuando las necesitaba.

Víctor, gracias por todo tu apoyo tanto académico, como emocional, por siempre estar dispuesto a escuchar, por tener las palabras adecuadas para calmarme, por las pláticas, por confiar en mí y por brindarme tu amistad.

## Contenido

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
3 PRODUCTOS NATURALES CON ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA.....	3
3.1 <i>Metabolitos microbianos</i> .....	4
3.2 <i>Necesidad de nuevos productos naturales</i> .....	6
4 MICROORGANISMOS ASOCIADOS A PLANTAS.....	7
4.1 <i>Endófitos</i> .....	9
4.2 <i>Rizófitos</i> .....	9
4.3 <i>Epífitos</i> .....	10
5 MAGNOLIA.....	12
3.1 <i>Magnolia dealbata Zucc</i> .....	12
5.1.1 Microorganismos asociados a <i>Magnolia dealbata Zucc.</i> .....	13
6 PSEUDOMONAS .....	15
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>17</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
1 OBJETIVO GENERAL .....	17
2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>19</b>
1 SELECCIÓN DE LA CEPA PRODUCTORA .....	19
1.1 <i>Conservación de la cepa productora y cepas prueba</i> .....	19
2 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>PSEUDOMONAS SP. 1AC</i> .....	19
3 CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>PSEUDOMONAS SP. 1AC</i> Y MONITOREO DE LA INHIBICIÓN BACTERIANA DE SUS METABOLITOS .....	23
3.1 <i>Curva de crecimiento</i> .....	23
3.1.1 Determinación de glucosa residual.....	23
3.2 <i>Monitoreo de la inhibición bacteriana del sobrenadante de Pseudomonas sp. 1AC sobre M. luteus</i> .....	24
3.2.1 Antibiosis .....	25
4 CULTIVO DE <i>PSEUDOMONAS SP. 1AC</i> PARA REALIZAR LA EXTRACCIÓN POR PARTICIÓN.....	25
4.1 <i>Extracción de la biomasa de Pseudomonas sp. 1AC</i> .....	26

4.2	<i>Extracción del sobrenadante (SN) y control de extracción</i>	26
4.3	<i>Determinación de actividad biológica</i>	26
4.3.1	MIC (Concentración mínima inhibitoria)	26
4.3.2	Actividad antiparasitaria sobre <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
4.3.3	Toxicidad sobre <i>Artemia salina</i>	29
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>		<b>30</b>
1	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>PSEUDOMONAS</i> SP. 1AC	30
2	CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>PSEUDOMONAS</i> SP. 1AC Y MONITOREO DE LA INHIBICIÓN BACTERIANA DE SUS METABOLITOS	35
2.1	<i>Curva de crecimiento</i>	35
2.1.1	Glucosa residual	36
2.2	<i>Monitoreo de la inhibición bacteriana del sobrenadante de Pseudomonas sp. 1AC sobre M. luteus</i>	37
3	EXTRACCIÓN POR PARTICIÓN DEL SOBRENADANTE, BIOMASA Y CONTROL DE EXTRACCIÓN	39
3.1	<i>Determinación de actividad biológica</i>	40
3.1.1	MIC (Concentración mínima inhibitoria)	40
3.1.2	Actividad antiparasitaria sobre <i>Trypanosoma cruzi</i>	41
3.1.3	Toxicidad sobre <i>Artemia salina</i>	43
<b>CONCLUSIONES</b>		<b>46</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>		<b>47</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		<b>48</b>
<b>APÉNDICE I TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR</b>		<b>54</b>
1	EXTRACCIÓN DE DNA	54
2	PREPARACIÓN DE GELES DE AGAROSA AL 0.8%	55
3	PURIFICACIÓN DEL AMPLICÓN CON FIBRA DE VIDRIO	55
<b>APÉNDICE II MICROBIOLOGÍA</b>		<b>56</b>
1	MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES	56
2	ESTÁNDAR 0.5 DE LA ESCALA DE MC FARLAND	56

## Introducción

---

A lo largo de la historia, los seres humanos hemos empleado a los productos naturales con diferentes fines. Los productos naturales, son metabolitos de las plantas, animales o microorganismos que pueden ser considerados bioactivos si presentan alguna actividad biológica. Se han empleado mayoritariamente con fines medicinales y, han sido los productos provenientes de plantas los más utilizados. Es hasta el descubrimiento de la penicilina cuando se empiezan a buscar productos naturales derivados de microorganismos para uso medicinal (Strobel *et al*, 2004; Bérdy, 2005).

En la actualidad la mayoría de los metabolitos bioactivos empleados como antibióticos provienen de microorganismos. Esta preferencia se debe a la facilidad de producción y menor costo con respecto a los provenientes de plantas, además de que presentan estructuras con una mayor complejidad y diversidad. La mayoría de los metabolitos provenientes de microorganismos con uso medicinal, son los denominados metabolitos secundarios, los cuales no son indispensables para el crecimiento del microorganismo en un cultivo puro, son moléculas de adaptación producidas por especies individuales o géneros y, se encuentran íntimamente ligados a la ecología del organismo productor. El género bacteriano que muestra una amplia diversidad y número de metabolitos secundarios bioactivos es *Streptomyces*, los otros géneros bacterianos que le siguen en importancia son *Pseudomonas* y *Bacillus* (Demain, 1981; Strobel *et al*, 2004; Bérdy, 2005; O'Brien y Wright, 2011).

A pesar de la gran diversidad química de los metabolitos actuales, existe un incremento en la necesidad de nuevas moléculas, debido a la resistencia microbiana a los tratamientos de elección, así como por la toxicidad de los fármacos empleados en enfermedades crónicas. Por esto se ha decidido buscar microorganismos que viven en ambientes extremófilos o que se encuentran asociados a plantas y que tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios

con un amplio espectro de bioactividades y/o nuevos mecanismos de acción (Strobel *et al*, 2004; Bérdy, 2005; McChensey *et al*, 2007).

Los microorganismos asociados a plantas han despertado la curiosidad de los investigadores a partir del descubrimiento de que el hongo endófito *Taxomyces andreanae* posee la capacidad de producir el mismo metabolito (Taxol, de uso en el tratamiento de cáncer) que su planta hospedera *Taxus brevifolia* (Stierle *et al*, 1993). En la actualidad no se busca únicamente que los microorganismos asociados produzcan el mismo metabolito que su hospedero, sino que también posean capacidad de producir nuevos metabolitos.

Para hacer una selección racional de la planta de estudio, se busca que crezcan en áreas con gran biodiversidad, que sean endémicas, de ambientes únicos y que posean una historia etnobotánica relacionada con los intereses de estudio. Según el nicho donde residan los microorganismos con respecto a la planta, se clasifican en: rizófitos, epífitos y endófitos (Strobel *et al*, 2004). Una planta que cumple con algunos de los puntos de selección es *Magnolia dealbata* Zucc. (especie endémica de México). Trabajos previos en nuestro equipo de trabajo han mostrado la capacidad que tienen los microorganismos asociados a dicha planta (bacterias y hongos), para producir compuestos con actividad antibacterial. De las bacterias aisladas que mostraron un espectro de inhibición favorable en un primer screening, resultaron pertenecer al género *Pseudomonas* (Gutiérrez, 1993; Gutiérrez y Vovides, 1997; Hardman, 2002; Manterola, 2011; Espinosa, 2012; Guzmán, 2012).

El género *Pseudomonas* es ampliamente conocido por su capacidad de producir metabolitos secundarios de notable interés, como análogos del Rhizoxin (Loper *et al*, 2008), debido a que esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. Además, ha sido encontrada ampliamente asociada a plantas (Garrity, 2005; Gross y Loper 2009; Guzmán, 2012). Es por esto que en éste trabajo se busca evaluar las actividades antimicrobiana, parasitocida y tóxica de el o los metabolito(s) producidos por una *Pseudomonas* asociada a *Magnolia dealbata* Zucc. esto a nivel de extractos orgánicos.

### 3 Productos naturales con actividad farmacológica

Los productos naturales son compuestos carbonados que pueden obtenerse de microorganismos, plantas o animales. Estos compuestos pueden derivar del metabolismo primario o secundario de los seres vivos; los metabolitos primarios son comunes a todos los seres vivos, son esenciales para el crecimiento celular y se encuentran altamente conservados entre especies, géneros y reinos. Algunos ejemplos de este tipo de metabolitos son: aminoácidos, vitaminas y, ácidos orgánicos. Mientras que los metabolitos secundarios son característicos de organismos específicos, son moléculas de adaptación producidos por especies individuales o géneros y, se encuentran íntimamente ligados a la ecología del organismo productor, ya que han evolucionado como respuesta a los efectos ambientales (Demain, 1981).

Los metabolitos secundarios han sido explotados durante miles de años por la humanidad con diversos propósitos. Sin embargo, el mayor uso que se le ha dado a los productos naturales es medicinal (Strobel *et al*, 2004; Bérdy, 2005).

De manera general, los productos naturales pueden ser empleados de tres formas diferentes:

- Aplicándolos directamente en la medicina, agricultura o cualquier otro campo.
  - Usándolos como materia prima para alguna modificación química o microbiológica subsecuente.
  - Empleándolos como guía para la síntesis química de nuevos análogos.
- (Bérdy, 2005)

Los productos naturales derivados de plantas han sido empleados por la humanidad durante millones de años, en especial de forma medicinal debido a su accesibilidad, aún en la actualidad son los principales componentes empleados en la medicina tradicional China. Es hasta que el investigador Louis Pasteur descubre

que la fermentación es causada por seres vivos que se comienza a estudiar a los microorganismos como fuentes de productos naturales. Esta idea se vio reforzada con el descubrimiento de la penicilina por Fleming, a partir de éstos hechos, se comenzó la explotación de los microorganismos con fines aplicativos (Strobel *et al*, 2004). Cabe recalcar que ya que los productos naturales derivan del metabolismo de seres vivos son también denominados metabolitos. Además dado que presentan una actividad biológica *in vivo* o *in vitro*, son denominados bioactivos. En la tabla 1 se muestra el número aproximado de metabolitos con actividad antibiótica de microorganismos (bacterias, hongos y protozoarios), plantas y animales (Bérdy, 2005). En ella, podemos observar que la principal fuente de metabolitos bioactivos con actividad antibiótica son los microorganismos.

**Tabla 1. Número de metabolitos con actividad antibiótica según la fuente de producción.**

Modificada de Bérdy (2005)

Fuente		Antibióticos
Microorganismos	Bacterias	2870
	Actinomicetos	8800
	Hongos	5015
	Protozoarios	35
	<b>Total</b>	<b>16535</b>
Plantas	Algas	780
	Plantas	11700
	<b>Total</b>	<b>12480</b>
Animales	Invertebrados	480
	Animales marinos	3540
	Anfibios, reptiles	240
	Vertebrados terrestres	390
	<b>Total</b>	<b>4650</b>

### 3.1 Metabolitos microbianos

El interés en el ámbito industrial por los sistemas microbianos se debe a la facilidad y bajo costo en la producción de sus metabolitos, dando como resultado una disminución de precio en el mercado, con respecto a los metabolitos provenientes de animales y plantas. Bajo estas bases se ha visto incrementado el

estudio de metabolitos de hongos y bacterias, principalmente de los metabolitos secundarios (Demain, 1981; Bérdy, 2005)

Adicionalmente, estos metabolitos, muestran una gran variedad de bioactividades y poseen estructuras químicas complejas. Entre éstos se encuentran los antibióticos, toxinas y factores de crecimiento de plantas (Strobel *et al*, 2004; Bérdy, 2005; O'Brien y Wright, 2011). En la tabla 2 se muestran algunos ejemplos de microorganismos, así como el número aproximado de metabolitos secundarios con actividad antibiótica que producen (Bérdy, 2005).

**Tabla 2. Metabolitos con actividad antibiótica producidos por microorganismos.** Modificada de Bérdy (2005)

Fuente		Antibióticos
<b>Bacterias</b>	<i>Bacillus</i> sp.	795
	<i>Pseudomonas</i> sp.	610
	Otras	1465
	<b>Total</b>	<b>2870</b>
<b>Actinomicetos</b>	<i>Streptomyces</i> sp.	6550
	Otros	2250
	<b>Total</b>	<b>8800</b>
<b>Hongos</b>	Macroscópicos	1050
	Microscópicos filamentosos	3770
	Levaduras	105
	Mohos	30
	<b>Total</b>	<b>5015</b>
<b>Protozoarios</b>		<b>35</b>

Muchos metabolitos secundarios han probado ser agentes muy eficaces como: antibacteriales, antifúngicos, inmunosupresores, antiparasitarios o herbicidas, exhibiendo una variedad de aplicaciones en la medicina y agricultura (Vaishnav y Demain, 2010).

Los microorganismos más importantes en la producción de metabolitos secundarios bioactivos son los actinomicetos, dentro de éstos el género

*Streptomyces* produce alrededor del 56% de los antibióticos producidos por bacterias (tabla 2), por lo que se separa a los Actinomicetos de las bacterias en el conteo de metabolitos bioactivos, mientras que otros géneros bacterianos que les siguen en importancia son *Bacillus* y *Pseudomonas*. Los microorganismos de los que se conocen menos antibióticos son los protozoarios. Sin embargo, esto no implica que no posean la capacidad de producirlos, sino que no se han encontrado las condiciones adecuadas para que los sinteticen. En éste sentido, cabe mencionar que pequeños cambios en las condiciones de cultivo repercuten en la producción de metabolitos bioactivos, por lo que los metabolitos detectados, no representan el total de los que pueden ser sintetizados por dichos microorganismos (Bérdy, 2005).

### **3.2 Necesidad de nuevos productos naturales**

A pesar del gran número de metabolitos bioactivos conocidos, aún existe un incremento en la demanda de metabolitos nuevos. En el caso de los antibióticos, el aumento en su demanda se debe al incremento de cepas resistentes a los tratamientos de elección, la re-emergencia de algunos patógenos como *Mycobacterium tuberculosis* y, los problemas debidos a las infecciones virales (Spelberg *et al*, 2008). En el caso de las enfermedades crónicas, se requiere la introducción de alternativas novedosas y con menor toxicidad. Cabe recordar que para satisfacer las necesidades del mercado, las farmacéuticas han recurrido a la síntesis química de diversos compuestos, o a la modificación química de los principios que actualmente se emplean (Bérdy, 2005). Lo anterior se debe a que la búsqueda de nuevos productos de origen natural en particular de plantas, representa un mayor costo y tiempo de inversión, debido a la cantidad de materia prima necesaria para la caracterización del metabolito y el poco rendimiento que se obtiene de las muestras. Dichas condiciones han limitado la diversidad en estructuras químicas de las moléculas conocidas. Sin embargo, la investigación básica se ha abocado a la búsqueda de nuevos productos naturales producidos por microorganismos provenientes de nichos biodiversos, lo que se podría traducir en el hallazgo de moléculas con estructuras complejas y con versatilidad de bioactividades. De manera general los productos naturales pueden resultar en

nuevos mecanismos de acción con respecto a los de compuestos sintéticos. Además, los metabolitos bioactivos provenientes de microorganismos tienen características químicas comunes como ciclopéptidos, anillos lactámicos, etc., los cuales son raros en las bibliotecas sintéticas y en productos naturales derivados de plantas (Bérdy, 2005; McChensey *et al*, 2007). Estas son las razones por las cuales se ha incrementado la búsqueda de metabolitos a partir de microorganismos, además de los costos de producción previamente mencionados.

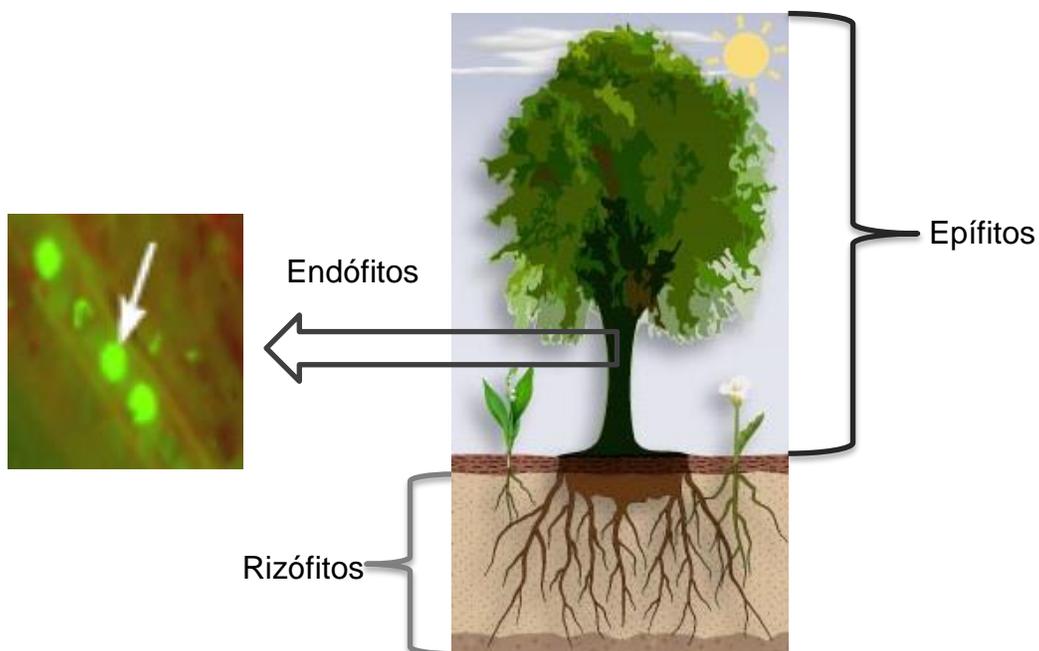
En la búsqueda de nuevas estructuras químicas, se ha partido de la premisa de que los metabolitos secundarios son resultado de la interacción del microorganismo con su ambiente, por lo que se ha decidido explorar nuevas fuentes de microorganismos como es el caso de los extremófilos y los asociados a plantas. Éstos últimos han tenido gran interés, después del descubrimiento de hongos asociados al árbol *Taxus brevifolia*, capaces de producir Taxol al igual que su planta hospedera (Strobel *et al*, 2004; Bérdy, 2005).

#### **4 Microorganismos asociados a plantas**

El estudio de los microorganismos asociados a las plantas se ha incrementado desde 1993, cuando se descubrió que el hongo *Taxomyces andreanae* posee la capacidad de producir Taxol (Paclitaxel) al igual que su planta hospedera (Stierle *et al*, 1993). En la actualidad, no sólo se estudia a los microorganismos asociados a plantas en la búsqueda de la producción del mismo compuesto que su hospedero, también se buscan nuevos metabolitos debido a que viven en ambientes únicos, bajo una enorme presión por la sobrevivencia, con nutrientes limitados y en una constante competencia por los mismos.

Como organismos autótrofos, las plantas juegan un papel central al sostener otros tipos de vida. Dado que se encuentran fijadas a un sustrato, deben liberar una colección de señales químicas, para así poder interactuar con otros organismos del medio, ya sea para combatir microorganismos patógenos y/o atraer a los benéficos. Estos compuestos incluyen azúcares, polisacáridos, aminoácidos, ácidos aromáticos, ácidos alifáticos, ácidos grasos, esteroides, enzimas, proteínas y

diversos metabolitos secundarios (Badri *et al*, 2009). Las plantas se encuentran en asociación benéfica o patógena con los microorganismos. Se cree que las diferencias en la respuesta de defensa que monta la planta contra los patógenos y los microorganismos asociados, es debida a la secreción de metabolitos diferentes o a la cantidad de metabolitos secretados. Se piensa que dicha cantidad puede ser mayor en el caso de los patógenos (Compant, 2010). Según el nicho donde residen estos sistemas microbianos, se pueden clasificar en rizófitos, endófitos y epífitos. En la figura 1 se muestra un esquema representativo de la clasificación de los microorganismos asociados a plantas según su nicho.



**Figura 1. Nichos de los microorganismos en las plantas.** Se muestran los diferentes nichos para los microorganismos según las partes de la planta. Se muestra a *Pseudomonas putida* VM1450 en el xilema del Álamo. Fotografía tomada de Ryan *et al* (2008).

Se denominan rizófitos a aquellos microorganismos que se encuentran en la rizósfera es decir del sustrato hacia abajo, en la parte externa de las raíces. Los endófitos son aquellos microorganismos que se encuentran en la endosfera es decir en el interior del tejido de la planta. Y finalmente los epífitos son aquellos que se encuentran en la filósfera, es decir la parte externa de la zona aérea de la planta.

A continuación se hará mención de las características de la población en cada uno de los nichos previamente mencionados.

#### **4.1 Endófitos**

Los microorganismos endófitos colonizan el tejido interno del hospedero sin causar daño aparente (sin dar síntomas de enfermedad). La mayoría de los microorganismos endófitos son hongos y, se sabe que poseen efectos benéficos sobre la planta. Este tipo de microorganismos pueden promover el crecimiento de las plantas debido a la producción de reguladores de crecimiento. También pueden solubilizar fosfato, proporcionar vitaminas esenciales, incrementar la toma de minerales y, son capaces de alterar la acumulación y metabolismo de nitrógeno en las mismas. Además confieren protección contra patógenos, ya que segregan sustancias antagonistas para éstos y, compiten por los espacios de colonización y los nutrientes (Reinhold y Hurek, 2011). Existe una diversidad de comunidades en los diferentes órganos de la planta, indicando la diversidad de capacidades que poseen los microorganismos para colonizarla. Las bacterias generalmente colonizan los espacios intracelulares y, han sido aisladas de todos los compartimentos de la planta incluyendo semillas. Los géneros bacterianos, que poseen las mejores habilidades de colonizar y persistir en la endósfera son *Cellulomonas*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Pseudomonas* y *Microbacterium*. Al parecer la mayoría de los endófitos son originarios de la rizósfera y la filósfera. Existen sitios prominentes de ingreso activo en las raíces, en donde la penetración es facilitada debido a que el tejido no se encuentra completamente diferenciado. Sin embargo, algunos pueden ser transmitidos a través de las semillas (Ryan *et al*, 2008; Reinhold y Hurek, 2011).

#### **4.2 Rizófitos**

Las plantas viven en una asociación muy cercana con los microorganismos que habitan el suelo en el que crecen. Las comunidades microbianas del suelo representan el mayor reservorio de diversidad biológica conocida en el mundo (Berendsen *et al*, 2012). Los rizófitos promueven el crecimiento de la planta y reducen el crecimiento de fitopatógenos, a través de la producción de antibióticos,

competencia por nutrientes y, producción de enzimas líticas (Compant, 2010). Algunas veces la supresión de la enfermedad no es debida a un microorganismo, sino a un consorcio de los mismos. Sin embargo, existen microorganismos específicos que son capaces de proteger a la planta directa o indirectamente de los patógenos. Su eficacia está influenciada por el resto de la comunidad microbiana. Los microorganismos supresores deben presentarse en un número alto para tener un efecto significativo. Algunos sincronizan su respuesta metabólica y transcripcional al confrontarse con diferentes competidores y responden de diversas formas contra diferentes especies. Es la microbiota total y sus interacciones la que afecta la salud de la planta (Berendsen *et al*, 2012). La composición del suelo (depósito de carbono, ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos), es un factor importante en la composición de la comunidad microbiana en el suelo. Sin embargo la microbiota de diferentes especies de plantas creciendo en el mismo suelo es diferente. Se ha demostrado que algunas especies de plantas pueden crear comunidades similares en diferentes tipos de suelos, sugiriendo que las plantas tienen la capacidad de moldear la composición de su microbiota en la rizósfera. Esto ocurre a través de la producción de exudados específicos en las raíces, formando compuestos con función doble (como antibióticos contra patógenos y quimioatrayentes de especies benéficas). Estos microorganismos, utilizan el carbono que les provee la planta y a cambio proveen a la misma de nitrógeno, fósforo y minerales a través de la descomposición de materia orgánica del suelo (Singh *et al*, 2004). Dentro de los principales géneros colonizadores de la rizósfera se encuentran *Pseudomonas* y *Bacillus* (Compant, 2010).

### 4.3 Epífitos

En el caso de los epífitos, los colonizadores por excelencia son las bacterias, pueden arribar a la filósfera a través de insectos, la atmósfera, las semillas o pueden ser transmitidas por animales. Los epífitos más estudiados son los de las hojas debido al ambiente hostil en el que viven como son, los cambios en la disponibilidad de agua, de nutrientes y la incidencia de la radiación UV. Las poblaciones microbianas difieren de tamaño según la temporada del año, siendo

menor durante los meses cálidos y secos y mayor durante los meses fríos y lluviosos. Se pueden encontrar de manera individual en la superficie de las hojas, pero frecuentemente se encuentran como agregados de bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Los agregados microbiológicos pueden proteger contra la radiación UV y, la depredación, pueden moderar el pH y el intercambio de gases. La mayoría de los microorganismos aislados de la superficie de las hojas, tienen la capacidad de soportar niveles altos de radiación UV. Además, poseen la capacidad de producir surfactantes, permitiendo la solubilización y difusión de los sustratos, así como la diseminación bacteriana hacia áreas en donde los nutrientes son abundantes. Otro mecanismo potencialmente relacionando con el incremento en la disponibilidad de nutrientes es la capacidad para producir toxinas como la siringomicina y siringopeptina, entre otras, ambas producidas por *Pseudomonas syringae*, que afectan el transporte de iones a través de la membrana plasmática de las células vegetales (Szabó *et al*, 2004). Algunos microorganismos producen polisacáridos extracelulares que los protegen de la desecación y contra especies reactivas de oxígeno. Algunos géneros bacterianos que habitan este nicho son *Pseudomonas* y *Erwinia*. (Lindow y Leveau, 2002; Lindow y Brandl, 2003; Whipps *et al*, 2008).

Para el estudio de los microorganismos asociados a plantas, se han empleado los siguientes criterios para la selección racional de las mismas:

- Plantas de ambientes únicos, especialmente aquellas con una biología inusual y que posean estrategias novedosas de supervivencia.
- Plantas que tienen una historia etnobotánica que se relacione con los usos específicos o aplicaciones relacionados a los intereses del estudio.
- Plantas endémicas, que posean una longevidad inusual, o que ocupan extensiones de tierra poco convencionales.
- Plantas que crecen en áreas con gran biodiversidad (Strobel *et al*, 2004).

## 5 **Magnolia**

El género *Magnolia* cumple con dos de los puntos arriba mencionados, son endémicas y tienen una historia etnobotánica relacionada con la medicina. A continuación se hablará un poco de manera general sobre el género.

La familia Magnoliaceae cuenta con alrededor de 220 especies de árboles y arbustos nativos de Asia y América. Debe su nombre en honor al profesor en botánica y medicina Pierre Magnol. Alrededor del 80% de las especies se encuentran en la región templada y tropical del sudeste de Asia, el 20% restante se encuentra en América. Entre las especies del género *Magnolia*, *Magnolia obovata* y *Magnolia officinalis*, son muy importantes en la medicina herbal Chino-Japonesa. Dentro de las propiedades medicinales de la corteza de *Magnolia* están su uso como ansiolítico, anticonvulsivo, antiagregante plaquetario, relajante muscular, antibacterial, antiséptico, antihelmíntico, sedante y, contra problemas gastrointestinales. Han sido aislados al menos 225 metabolitos secundarios diferentes, predominantemente alcaloides, lignanos, neolignanos y terpenoides de diferentes especies de *Magnolia*. Es por ello que el género *Magnolia* es considerado una fuente rica de diversos compuestos bioactivos (Hardman, 2002). La corteza de *M. officinalis* contiene tres grupos de compuestos biológicamente activos: alcaloides, aceites esenciales y compuestos bifenólicos (magnolol y honokiol), estos últimos han atraído la atención debido a su diversidad de propiedades farmacológicas como ansiolítico, antidepresivo, anticonvulsivo, entre otras (Young-Jung *et al*, 2011).

Las especies Asiáticas son las más estudiadas, algunas de las especies Americanas son *Magnolia macrophylla*, *Magnolia ashei*, *Magnolia tripetal*, *Magnolia dealbata*, entre otras (Gutiérrez, 1993). *M. dealbata* es la especie endémica de nuestro país por lo que se hablará de ella en una forma más amplia.

### 3.1 ***Magnolia dealbata* Zucc**

Es una especie endémica de México, propia de los bosques de niebla del centro y este del país (Oaxaca, Querétaro, Veracruz, Hidalgo, San Luis Potosí y Nuevo León). La población más grande se reporta en Coyopolan municipio de Ixhuacán

de los Reyes, Veracruz, donde es usada por su madera y para aplicaciones medicinales (flores y corteza). En la figura 2 se muestra la flor de *M. dealbata*. Los árboles de ésta especie tienen una altura de 40-50 m (Gutiérrez, 1993; Gutiérrez y Vovides, 1997; Velasco-Macías *et al*, 2008) y, son considerados en peligro de extinción por la NOM-059-SEMARNAT-2010, (Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo).



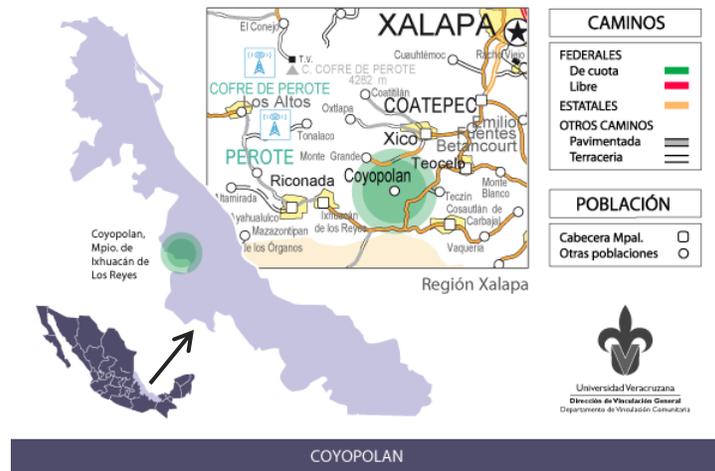
**Figura 2. Flor de *Magnolia dealbata* Zucc.** Se muestra la belleza de la flor del árbol *Magnolia dealbata* Zucc. endémica de México, por lo cual se emplea de manera ornamental.

Sus extractos también son empleados como tranquilizantes, en el tratamiento de epilepsias y enfermedades cardíacas (Gutiérrez, 1993; Gutiérrez y Vovides, 1997), aunque, no se cuenta con estudios científicos que respalden dichas acciones.

#### **5.1.1 Microorganismos asociados a *Magnolia dealbata* Zucc.**

Debido a la historia etnobotánica mexicana de *M. dealbata* Zucc. y, al interés por el estudio de los endófitos de plantas, parte del equipo de trabajo del laboratorio decidió coleccionar muestras en Coyopolan, municipio de Ixhuacán de los Reyes, Veracruz, en la figura 3 se muestra la localización de la zona de colecta. Se tomaron muestras de diversos órganos del árbol como: la corteza, raíz, hojas y frutos, para aislar a los microorganismos asociados a dicho hospedero, se aislaron 47 hongos y 55 bacterias (Espinosa, 2012; Guzmán, 2012; Manterola, 2011). A todos ellos, se les realizó un primer screening para evaluar su capacidad

antibiótica en contra de una o más de los siguientes microorganismos: *Micrococcus luteus*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus epidermidis*. Las pruebas de antibiosis en bacterias se realizaron por estría cruzada (Guzmán, 2012), mientras que para el caso de los hongos, se determinó la actividad antimicrobiana con pruebas de antibiosis por difusión, empleando sobrenadantes de las fermentaciones de 13 días (Espinosa, 2012).



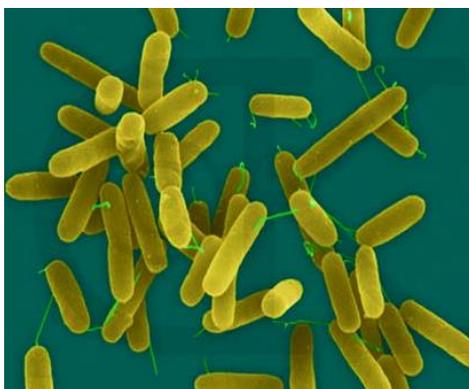
**Figura 3. Mapa de la ubicación de Coyopolan, Veracruz.** Se muestra la ubicación de la zona de toma de muestra por Guzmán.

En el caso de los hongos, los microorganismos empleados fueron *M. luteus*, *B. subtilis*, *E. coli* y *S. cerevisiae*. Para el caso de los hongos, 11 mostraron actividad (Espinosa, 2012). Mientras que en el caso de las bacterias 13 mostraron actividad y, dentro de estas 13, 8 presentaron inhibición contra al menos tres de las cinco cepas prueba. Es por esto que se procedió a identificarlas por técnicas moleculares (16S rDNA) y bioquímicas (VITEK2). Las 8 cepas bacterianas resultaron pertenecer al género *Pseudomonas*, sin asignárseles la especie a la que pertenecen. Se sabe que forman parte del grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes (Guzmán, 2012). De estas 8 cepas (1AB, 1AC, 1AE, 14A, 16A, 21A, 24A y 28A), se decidió trabajar con 3 (14A, 24A y 28A) para caracterizar la actividad biológica de sus metabolitos. Dentro de las cinco cepas restantes, la que mostró un mejor patrón de inhibición es la denominada 1AC, debido a su capacidad para inhibir completamente a tres de los microorganismos: *M. luteus*, *S.*

*cerevisiae* y *S. epidermidis* y parcialmente a *B. subtilis*. Es por esto que se consideró como un excelente modelo de estudio para la evaluación de diversas actividades biológicas de sus metabolitos. La cepa 1AC fue aislada de la corteza externa sin sanitizar, por lo que se trata de un epífito (Guzmán, 2012).

## 6 *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* pertenece al orden *Pseudomonadales*, familia *Pseudomonadaceae* y, cuenta con más de 60 especies. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza ya que, su hábitat incluye suelos, agua, plantas y, animales. Son bacilos aerobios, Gram-negativos de 0.5-1.0 por 1.5-5.0  $\mu\text{m}$ ; son mótils debido a la presencia de uno o varios flagelos polares. En la figura 4 se muestran algunas de las características ya descritas. La mayoría de las especies no crece bajo condiciones ácidas ( $\text{pH} \leq 4.5$ ) y, no requieren de factores de crecimiento, de tal forma que pueden crecer en medio mínimo químicamente definido con iones amonio o nitratos como fuente de nitrógeno y compuestos orgánicos simples como única fuente de carbono y de energía. La mejor temperatura de crecimiento para la mayoría de las cepas es de  $28^{\circ}\text{C}$  (Garrity, 2005; Gross y Loper 2009). Tienen la capacidad de producir pigmentos: cuatro fenazinas (piocianina, piorrubina, clororafina, oxifenazina), la proteína azul de *Pseudomonas* y, pioverdina. Una sola cepa tiene la capacidad de producir diferentes fenazinas. Las pioverdinas son el colorante amarillo-verde, típico de las *Pseudomonas* fluorescentes, las cuales funcionan como sideróforos. Otro sideróforo que sintetizan las *Pseudomonas* fluorescentes es la piochelina el cual no es pigmentado (Garrity, 2005).



**Figura 4. Microfotografía electrónica de *Pseudomonas*.** Se muestra un conjunto de *Pseudomonas*, de color verde se observan los flagelos que le dan movilidad.

Esta especie es bien conocida por su capacidad de producir metabolitos secundarios bioactivos. Su diversidad ecológica y metabólica se ve reflejada en su genoma, cuyo tamaño varía de 4.6 a 7.1 Mb con un contenido de GC entre 57.8 y 66.6%. Los metabolitos secundarios juegan un papel muy importante para las *Pseudomonas*, ya que pueden funcionar en la adquisición de nutrientes, en su virulencia y, en la defensa contra competidores y depredadores confrontados en hábitats naturales. Por ejemplo, la colonización de la rizósfera por ciertas cepas de las especies *P. putida* y *P. fluorescens* resulta la mayoría de las veces en un incremento en el crecimiento de la planta, debido a la producción de metabolitos antagonistas contra los patógenos de plantas (Garrity, 2005; Gross y Loper 2009). Entre los diversos metabolitos bioactivos producidos por *Pseudomonas*, se encuentran los siguientes:

- Karalicina: un antibiótico, con acción inhibitoria contra levaduras y, débilmente antiviral contra virus del *Herpes simplex*.
- Fluvioles: un grupo de antibióticos con actividad antitumoral.
- Pirrolnitrina: antimicótico tópico.
- Fenazinas: un grupo de compuestos que presentan actividad antibiótica, antitumoral y antiparasitaria (Gross y Loper, 2009).

## Justificación

---

- La resistencia microbiana y la toxicidad de los tratamientos para enfermedades crónicas, ha llevado a retomar la búsqueda de compuestos naturales con actividad farmacológica, en especial aquellos de origen microbiano.
- Debido a que es bien sabida la capacidad del género *Pseudomonas* como productor de metabolitos con diversas actividades biológicas. *Pseudomonas* sp. 1AC es un modelo de estudio interesante para buscar compuestos con actividades adicionales a la antibacteriana.

## Hipótesis

---

Al ser las *Pseudomonas* una fuente importante de compuestos bioactivos, nos permite predecir que *Pseudomonas* sp. cepa 1AC producirá compuestos con actividades biológicas adicionales a la antibacteriana.

## Objetivos

---

### 1 Objetivo general

Evaluar la actividad biológica de los extractos orgánicos producidos por *Pseudomonas* sp. 1AC.

### 2 Objetivos particulares

- Establecer el género y especie del microorganismo a través de técnicas de biología moleculares.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos, empleando cepas prueba.

- Evaluar la actividad antiparasitaria, empleando a *Trypanosoma cruzi* como modelo de estudio.
- Evaluar la toxicidad de los extractos orgánicos, empleando *Artemia salina*.

### 1 Selección de la cepa productora

Una muestra de la cepa 1AC, se aisló por estría en agar nutritivo (AN) y, se incubó por 24 h a 29°C. De este cultivo se seleccionaron 3 colonias, las cuales se inocularon por separado en la mitad de una caja de AN. Las colonias se incubaron por 24 h a 29°C y, una vez crecidas, se inocularon con *Micrococcus luteus* ATCC 9341 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 de manera perpendicular al inóculo central. Las cajas se incubaron nuevamente por 24 h a 29°C y se observó el patrón de inhibición. La colonia que presentó el mejor patrón de inhibición fue conservada según la metodología que se explica a continuación.

#### 1.1 Conservación de la cepa de estudio y cepas prueba.

Una colonia de *Pseudomonas* sp. 1AC, *M. luteus* y *Escherichia coli* ATCC 11229, se resuspendieron en 1 mL de Caldo Nutritivo (CN) y se realizaron dos fermentaciones de 50 mL en caldo nutritivo (CN). Para el caso de *B. subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 las colonias se resuspendieron y, la fermentación se realizó en medio con extracto de levadura, peptona y glucosa (YPD), la formulación de los medios se describe en el apéndice II.

Los matraces se incubaron por 24 h a 29°C para el caso de *Pseudomonas* sp. 1AC y *S. cerevisiae* y, a 37°C para *M. luteus*, *E. coli* y *B. subtilis*. Pasado dicho periodo de incubación, las células se cosecharon por centrifugación por 15 min a 8000 rpm y 4°C. El sobrenadante se desechó y, se lavaron las células con 25 mL de solución salina (SSI) y, se centrifugó por 10 min a 8000 rpm y 4°C. El botón celular se resuspendió en 5 mL de glicerol estéril al 10% y se realizaron alícuotas de 500 µL en tubos de 1.5 mL. También se tomó una muestra de ésta cepa para realizar una tinción de Gram para comprobar su pureza.

### 2 Identificación molecular de *Pseudomonas* sp. 1AC

Para la identificación molecular se empleó la secuenciación del gen 16S rDNA (Weisburg *et al*, 1991) por ser el más empleado para un primer acercamiento y

determinar el género. Para conocer la especie se emplearon los genes housekeeping *gyrB* y *rpoD* (Yamamoto *et al*, 2000; Mulet *et al*, 2009). En la tabla 3 se muestran las secuencias de los primers empleados para la identificación molecular de la cepa 1AC y el tamaño del amplicón esperado. La nomenclatura empleada en dicha tabla es la siguiente: A=Adenina; C= Citosina; G=Guanina; T=Timina; Y=C+T; S=G+C; R=A+G; K=G+T; N=A+G+C+T. En el apéndice I se describe la técnica empleada para el aislamiento del DNA genómico.

**Tabla 3. Primers empleados para la identificación molecular de *Pseudomonas* sp. 1AC.**

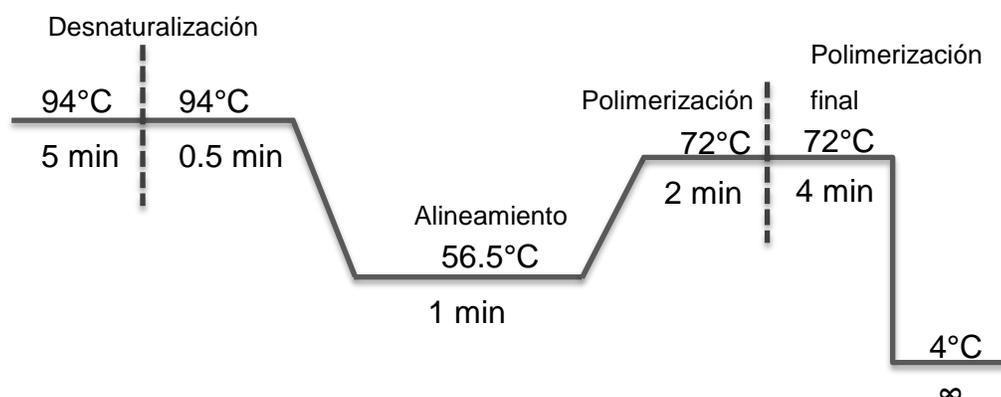
Gen	Primer		Secuencia 5'→3'	Tamaño del amplicón (pb)
<b>16S rDNA</b>	16S1	Fwd	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCATGGCTCAG	1500
	16S2	Rev	CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT	
<b><i>gyrB</i></b>	UP1E	Fwd	CAGGAAACAGCTATGACCAYGSNNGGNGGNARTTYRA	966
	APrU	Rev	TGTAACGACGGCCAGTGCGNGGRTCYTTYTCYTGRCA	
	M13R	Fwd	CAGGAAACAGCTATGACC	
	M13R(-21)	Rev	TGTAACGACGGCCAGT	
<b><i>rpoD</i></b>	PsEG30F	Fwd	ATYGAAATCGCCAARCG	760
	PsEG790R	Rev	CGGTTGATKTCCTTGA	

Se empleó el mismo par de oligos tanto para la amplificación como para la secuenciación de los genes 16S rDNA y *rpoD*. En el caso de *gyrB* se emplearon los oligos UP1E y APrU para la amplificación del gen. Para la secuenciación del mismo, se emplearon los oligos M13R y M13R(-21). La mezcla de reactivos empleada para las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), se describe en la tabla 4. Para todas las reacciones se emplearon las mismas cantidades de reactivos.

Para la identificación de cada uno de los genes se emplearon condiciones diferentes de amplificación, todas durante 30 ciclos, las cuales se muestran en las figuras 5, 6 y 7 (Weisburg *et al*, 1991; Yamamoto y Harayama, 1995; Mulet *et al*, 2009; Mulet *et al*, 2010).

**Tabla 4. Mezcla de reactivos para la amplificación de los genes empleados para la identificación molecular de *Pseudomonas sp. 1AC*. \*= marca BioTecMol**

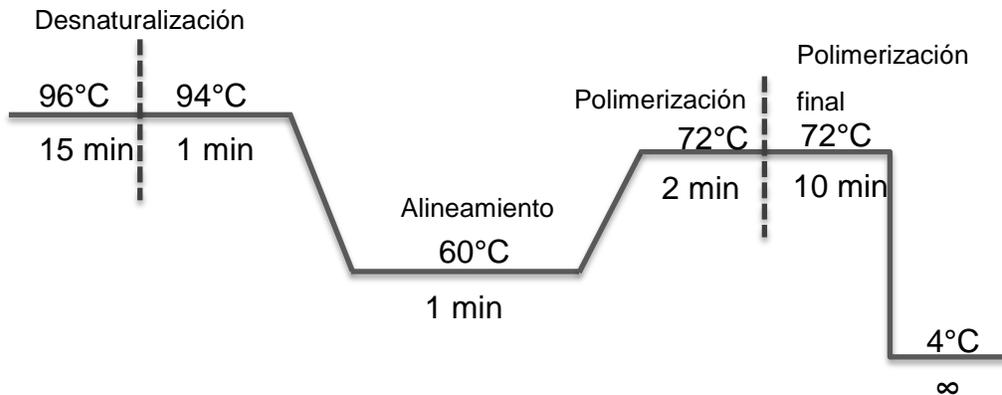
Reactivo	Cantidad (μL)
DNA (100 ng/μL)	2.5
Buffer (10x)*	5.0
dNTP's (1.25 mM)	8.0
Oligo Fwd (20 pmol/μL)	1.0
Oligo Rev (20 pmol/μL)	1.0
MgCl <sub>2</sub> (30mM)*	2.5
Amplificasa (5 U/μL)*	1.0
Agua	29.0



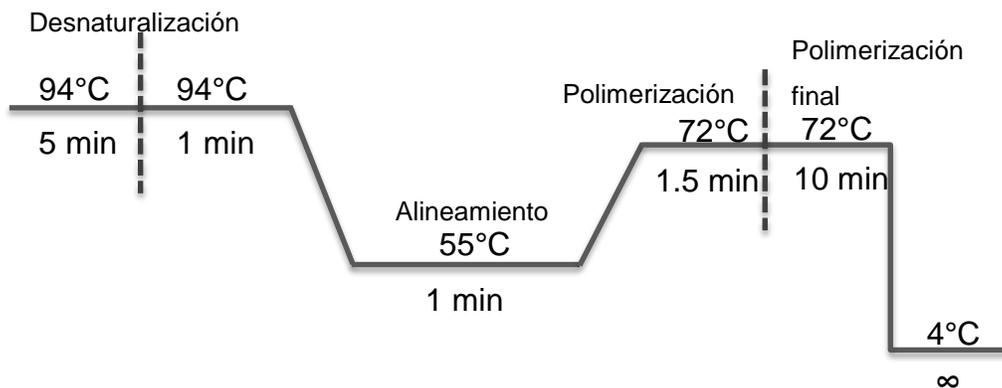
**Figura 5. Condiciones para la amplificación del gen 16S rDNA de *Pseudomonas sp. 1AC*. Se muestran las condiciones de tiempo y temperatura a las cuales se llevó a cabo la amplificación del gen 16S rDNA de *Pseudomonas sp. 1AC*.**

Para corroborar la correcta amplificación del gen deseado, se corrió un gel de agarosa al 0.8%, verificando que cada amplicón correspondiera al tamaño esperado. Una vez corroborado, se escaló a 4 reacciones, para obtener suficiente

muestra para la secuenciación de cada gen. Posteriormente, se procedió a purificar la banda de amplificación empleando tubos con fibra de vidrio.



**Figura 6. Condiciones para la amplificación de *gyrB* de *Pseudomonas* sp. 1AC.** Se muestran las condiciones de tiempo y temperatura a las cuales se llevó a cabo la amplificación del *gyrB* de *Pseudomonas* sp. 1AC.



**Figura 7. Condiciones para la amplificación de *rpoD* de *Pseudomonas* sp. 1AC.** Se muestran las condiciones de tiempo y temperatura a las cuales se llevó a cabo la amplificación del *rpoD* de *Pseudomonas* sp. 1AC.

La metodología completa, tanto de la preparación del gel de agarosa como de la purificación del amplicón, se encuentran en el apéndice I.

La secuenciación se llevó a cabo en la compañía Laragen (USA). Con las secuencias, se realizó una comparación empleando el programa Basic Local

Alignment Search Tool (BLAST) con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), con el fin de conocer a los microorganismos con mayor similitud a *Pseudomonas* sp. 1AC. Para conocer la relación entre *Pseudomonas* sp. 1AC y diferentes especies del género, se contruyeron árboles filogenético. Para ello se obtuvieron secuencias de los genes *gyrB* y *rpoD* de otras cepas de *Pseudomonas* y, de otros microorganismos (*Streptomyces*, *Bacillus* y *Rhizobium*), empleados como controles de alineamiento, para la construcción de árboles filogenéticos. Para ello se empleó la base de datos Integrated microbial genomes and metagenomes (img) del Doe Joint Genome Institute (JGI). Obtenidas dichas secuencias, se realizó un alineamiento con el programa ClustalW, para obtener los valores phylip. Con dichos valores se procedió a alimentar al programa Phyltree para la construcción de los árboles.

### **3 Caracterización del crecimiento de *Pseudomonas* sp. 1AC y monitoreo de la inhibición bacteriana de sus metabolitos**

#### **3.1 Curva de crecimiento**

Para determinar la curva de crecimiento, se descongeló una alícuota de *Pseudomonas* sp. 1AC, se centrifugó por 5 min a 12000 rpm, se decantó el sobrenadante y el botón celular se lavó con 1 mL de SSI, se centrifugó nuevamente bajo las condiciones anteriores. Se retiró el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1 mL de SSI, se le determinó densidad óptica (DO) a  $\lambda_{600}$ , ajustándola a 0.5 de DO. Con 500  $\mu$ L de la suspensión celular obtenida, se inocularon 3 matraces de 250 mL con 50 mL de CN y, 3 matraces de 250 mL con 50 mL de CN+0.5% de glucosa. Los matraces se incubaron a 29°C a 180 rpm, de cada matraz se tomaron muestras a las 0, 3, 6 h y de 8 a 48 h cada dos h. De las muestras se determinó crecimiento por DO, pH empleando un potenciómetro y, glucosa residual empleando un método colorimétrico.

##### **3.1.1 Determinación de glucosa residual**

Para determinar la glucosa residual con respecto al tiempo, se empleó el método enzimático-colorimétrico de glucosa oxidasa-peroxidasa (Spinreact). Mediante el

cual se determina la cantidad de glucosa de manera indirecta, ya que lo que se determina espectrofotométricamente es la quinona resultante de dos reacciones enzimáticas secuenciales. En la primera reacción la glucosa oxidasa transforma la glucosa en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno resultante es transformado en quinona en presencia de la peroxidasa. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra. Para determinar la concentración de glucosa, se procedió a preparar la muestra, el blanco y el patrón según la tabla 5.

Las muestras y el patrón (100 mg/dL), se mezclaron e incubaron por 10 min a 37°C. Pasado dicho tiempo se leyó la absorbencia del patrón y muestras a 505 nm. Después se calculó la concentración de las muestras según la siguiente fórmula:

$$\frac{(A)_{Muestra}}{(A)_{Patrón}} \times 100 (Conc. Patrón) = \frac{mg}{dL} \text{ de glucosa en la muestra} \times 0.0555 =$$

*mmol glucosa/L*

**Tabla 5. Preparación de muestras, blanco y patrón para la determinación de glucosa residual.**

	<b>Blanco</b>	<b>Patrón</b>	<b>Muestra</b>
<b>Reactivo (mL)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Patrón (µL)</b>	-	10	-
<b>Muestra (µL)</b>	-	-	10

### **3.2 Monitoreo de la inhibición bacteriana del sobrenadante de *Pseudomonas* sp. 1AC sobre *M. luteus***

Con el fin de establecer el momento de mayor producción de metabolitos con la capacidad de inhibir a *M. luteus*, se inocularon 2 matraces de 250 mL con 50 mL de CN y 2 matraces de 250 mL con 50 mL de CN+0.5% de glucosa, según la metodología descrita previamente, los matraces se incubaron a 180 rpm por 12 h a 29°C. Con 1 mL del contenido, se inocularon 3 matraces de 500 mL con 100 mL

del medio correspondiente (CN o CN+0.5% de glucosa), los matraces se incubaron a 180 rpm a 29°C. Se procedió a tomar muestra cada 3 h hasta las 24 h y, después cada 6 h hasta las 48 h. A las muestras se les determinó crecimiento, pH y, se realizó antibiosis de las muestras concentradas dos veces.

### 3.2.1 Antibiosis

La prueba se realizó en cajas Petri con 25 mL de AN inoculado con 250 µL de volumen de una suspensión de *M. luteus* (dilución 1:100 de una suspensión ajustada espectrofotométricamente al estándar 0.5 de McFarland). Se colocaron 4 sensidiscos por placa y se adicionaron 25 µL de las muestras concentradas a cada sensidisco con una muestra diferente. En la figura 8 se muestra el acomodo de los sensidiscos, además se realizaron blancos de pH de 6, 7, 8 y 9.

Las placas se incubaron por 18 h a 37°C y al final se midieron los diámetros de los halos de inhibición, reportándolos como mm de inhibición.

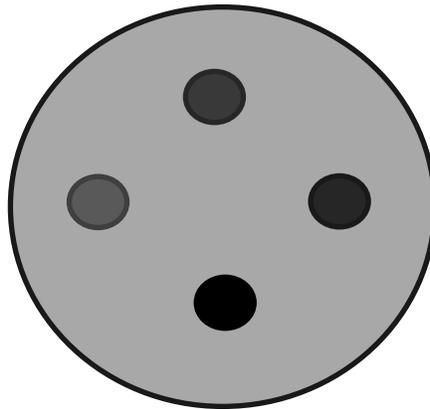


Figura 8. Distribución de sensidiscos para la prueba de antibiosis.

## 4 Cultivo de *Pseudomonas* sp. 1AC para realizar la extracción por partición

Se descongeló un glicerol de *Pseudomonas* sp. 1AC, se lavó y ajustó a 0.5 DO y, con 500 µL de la suspensión celular, se inoculó un matraz de 250 mL con 50 mL de NB+0.5% glucosa. El matraz se incubó a 180 rpm, a 29°C por 12 h. Con 10 mL de dicho cultivo, se inocularon 2 matraces Fernbach de 2.8 L cada uno con 1 L de NB+0.5% glucosa. Los matraces Fernbach se incubaron a 180 rpm por 24 h a 29°C. Las células se cosecharon por centrifugación por 15 min a 10000 rpm a 4°C

y se separó el sobrenadante de la biomasa. El sobrenadante se filtró a través de membrana Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.22  $\mu\text{m}$  y, se realizó antibiosis de los metabolitos secundarios presentes en el medio de cultivo, antes de realizar las extracciones.

#### **4.1 Extracción de la biomasa de *Pseudomonas* sp. 1AC**

La biomasa se maceró con 400 mL de una mezcla diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):metanol (MeOH) 1:1 durante 3 h y, se procedió a filtrarla empleando primero filtros Whatman número 1, seguido por membranas Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.22  $\mu\text{m}$ . El extracto obtenido (EOB) se concentró a sequedad en un rotavapor.

#### **4.2 Extracción del sobrenadante (SN) y control de extracción**

El sobrenadante se extrajo 3 veces con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y posteriormente 4 veces con acetato de etilo (AcOEt) se empleó un total de 500 mL de disolvente por cada litro de SN. Los extractos obtenidos se concentraron a sequedad empleando un rotavapor. Para el caso de esta extracción (EOSN), se realizó un blanco que consistió en extraer bajo las mismas condiciones 2 L de medio CN+ 0.5% de glucosa estéril (EOC).

Los extractos se recuperaron en viales previamente pesados y, se realizó una cromatografía en capa fina (CCF) para conocer el perfil metabólico presente en los extractos orgánicos.

#### **4.3 Determinación de actividad biológica**

##### **4.3.1 MIC (Concentración mínima inhibitoria)**

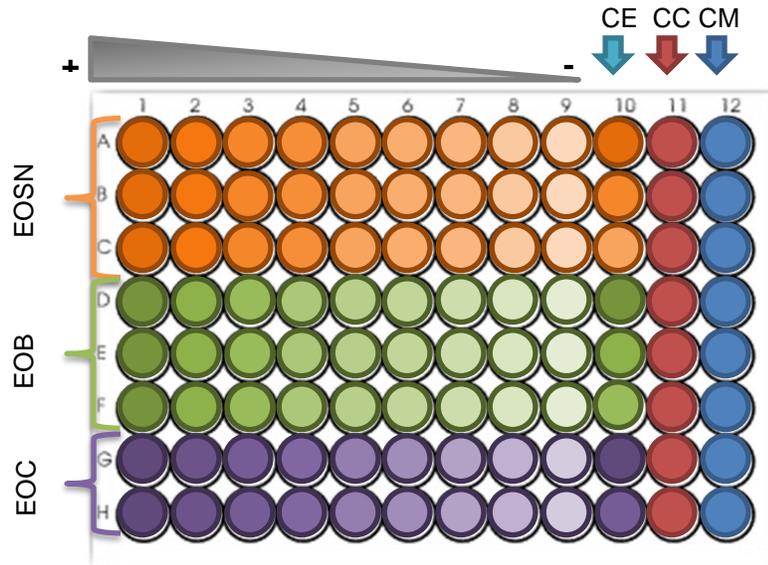
Se determinó la concentración mínima inhibitoria de los extractos obtenidos en 4.1 y 4.2 según la metodología descrita por Wiegand *et al* (2008). La actividad se determinó sobre las bacterias *M. luteus*, *E. coli* y, *B. subtilis*, además de la levadura *S. cerevisiae*. Las bacterias *M. luteus* y, *E. coli* fueron aisladas por estría en AN e incubadas por 24 h a 37°C. En el caso de *B. subtilis* y *S. cerevisiae* fueron aisladas en YPD agar e incubadas por 24 h, la primera a 37°C y la segunda a 29°C. Se realizó una suspensión de colonias en SSI y, se ajustaron espectrofotométricamente al 0.5 de la escala de McFarland, a 600 nm. La

suspensión ajustada, se diluyó 1:100 con el medio de cultivo adecuado (CN o YPD líquido según sea el caso).

Se hicieron soluciones stock de los extractos a una concentración de 20 mg/mL. Para el ensayo se diluyeron a una concentración final de 800 µg/mL en medio CN para *M. luteus* y *B. subtilis* y, de 12.8 mg/mL para *E. coli* y *S. cerevisiae* en medio CN y YPD respectivamente. Los controles positivos empleados contra levaduras, bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas fueron cicloheximida, eritromicina y ácido nalidíxico a una concentración stock de 4 mg/mL, respectivamente. Al igual que con los extractos, los antibióticos fueron diluidos a una concentración final de 800 µg/mL en medio CN o YPD líquido, según el microorganismo. La prueba se realizó en placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos (Corning, Costar). Con un volumen final de 100 µL en cada pozo. Las concentraciones finales de los extractos (columna 1-9) fueron 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.2, 1.6, 0.8 µg/mL para el caso de *M. luteus* y *B. subtilis* y, de 3200, 1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 µg/mL para *E. coli* y *S. cerevisiae*. En el caso de los controles empleados, las concentraciones fueron de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.2, 1.6, 0.8 µg/mL para los cuatro microorganismos.

Las columnas 10, 11 y 12 se emplearon como controles, la columna 10 corresponde a los controles de los extractos, 50 µL del extracto y 50 µL del medio empleado (CE). En la columna 12 se colocó el control de esterilidad y blanco de absorbencia (CM), el cual consistió en 100 µL del medio (CN o YPD líquido). Finalmente en la columna 11 se colocó el control de crecimiento del microorganismo prueba (CC), el cual consistió en 50 µL del medio adecuado y 50 µL de la suspensión del microorganismo prueba. En la figura 9 se muestra el acomodo de las muestras en la placa.

La placa se incubó a 37°C o 29°C según el microorganismo empleado, por 24 horas y, se leyó a una  $\lambda_{600}$  (Wiegand *et al*, 2008). Las pruebas se realizaron por triplicado.



**Figura 9. Diagrama general de la posición de los extractos para determinación de MIC.** Se muestra la posición de los diferentes extractos. CE=control de extractos. CC= control de crecimiento y CM= control de medio.

#### 4.3.2 Actividad antiparasitaria sobre *Trypanosoma cruzi*

Esta prueba se realizó en placas de 96 pozos, se colocaron 100  $\mu$ L de la solución de 800, 400 y 200  $\mu$ g/mL del extracto a probar o control positivo (Geneticina G418) por duplicado y, posteriormente 100  $\mu$ L de una suspensión de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (cepa CL-Brener) ajustada a  $3 \times 10^6$  células/mL. Las placas se incubaron por 48 h a 28°C y, se contó en cámara de Neubauer por observación directa al microscopio, realizando una dilución 1:10 con formaldehído al 8%. Para medir la actividad parasiticida, la prueba se realizó por triplicado y se calculó la concentración a la cual sobrevivió el 50% de los epimastigotes con respecto al control. Para ello, se construyeron curvas dosis-respuesta en Excel 2010. Posterior a esto, se realizó un ANOVA y un análisis de Duncan, para determinar diferencias entre los tratamientos.

Para observar los cambios morfológicos de los epimastigotes por estar en contacto con los extractos o G418, se realizó un frotis de la siguiente manera: Se centrifugó el contenido de un pozo (200  $\mu$ L) a 7000 rpm por 10 min. Se lavó el botón celular con 40  $\mu$ L de paraformaldehído al 4% y, se realizó un frotis. Las muestras se tiñeron con el kit HEMA 3 (Fischer Scientific), empleando la metodología descrita por el proveedor.

### 4.3.3 Toxicidad sobre *Artemia salina*

Se determinó la toxicidad de los extractos usando la metodología descrita por Meyer y colaboradores (1982), empleando al crustáceo *Artemia salina*.

Las muestras se prepararon disolviendo 20 mg del extracto a evaluar en 2 mL de una mezcla 1:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH. De dicha solución se transfirieron 500, 50 y 5 µL a tres frascos viales, dejándose evaporar el disolvente.

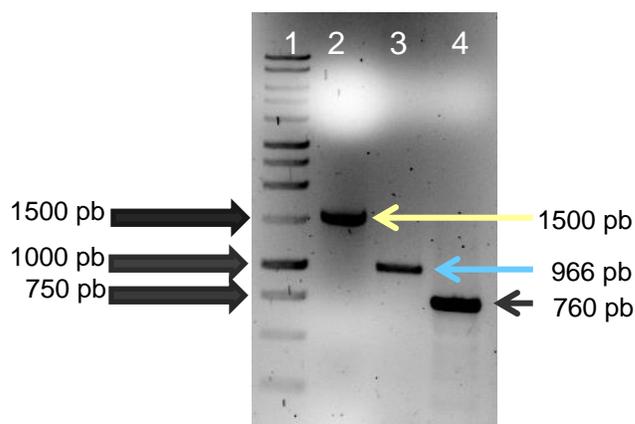
Los huevecillos de *A. salina* se incubaron en un medio salino artificial (Instant Ocean sea salt) durante 48 h a 30°C. Con periodos de luz- oscuridad de 12 h-12 h. Transcurrido dicho periodo se transfirieron 10 crustáceos a cada vial. Se aforaron los viales con 5 mL de medio salino artificial. Las concentraciones finales de los extractos fueron 1000, 100 y 10 µg/mL, haciendo la prueba por triplicado. Los viales se incubaron por 24 h con iluminación a 30°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se contó el número de larvas sobreviviente. Con los datos obtenidos, se calculó la concentración letal media (CL<sub>50</sub>). Para ello, se construyeron curvas dosis-respuesta en Excel 2010 y, se realizó un ANOVA.

## Resultados y discusión

---

### 1 Identificación molecular de *Pseudomonas* sp. 1AC

La cepa 1AC fue identificada de manera preliminar por Guzmán (2012) como perteneciente al género *Pseudomonas*, sin embargo no se pudo discernir su especie. Por lo que para su identificación, se amplificaron por PCR además del gen 16S rDNA, otros genes denominados “housekeeping” reportados para este género, como son *gyrB* y *rpoD* los cuales codifican para la subunidad B de la DNA girasa y el factor sigma de la RNA polimerasa respectivamente. Se verificó que el amplicón fuera del tamaño esperado mediante un gel de agarosa al 0.8%, en la figura 10 se muestran las bandas del tamaño correspondiente a cada amplicón. Se observa un amplicón de aproximadamente 1500 pb, otro de aproximadamente 1000 pb y otro de 750 pb, correspondientes a los genes 16S rDNA, *gyrB* y *rpoD* respectivamente (Weisburg *et al*, 1991; Mulet *et al*, 2009).



**Figura 10. Amplicones para la identificación molecular de la *Pseudomonas* 1AC.** Se muestra un gel de agarosa al 0.8% con 5  $\mu$ L del producto de PCR para cada gen empleado para la identificación molecular de la *Pseudomonas* sp. 1AC, en el primer carril se muestra el marcador de peso molecular de 1kb, en el segundo carril se muestra el amplicón correspondiente al 16S rDNA, en el tercer carril el amplicón correspondiente a *gyrB* y, en el cuarto carril el amplicón correspondiente a *rpoD*.

Obtenidos los tamaños esperados de los amplicones, se escaló la PCR, para tener muestra suficiente, purificar y secuenciar con la compañía Laragen. Obtenidas las

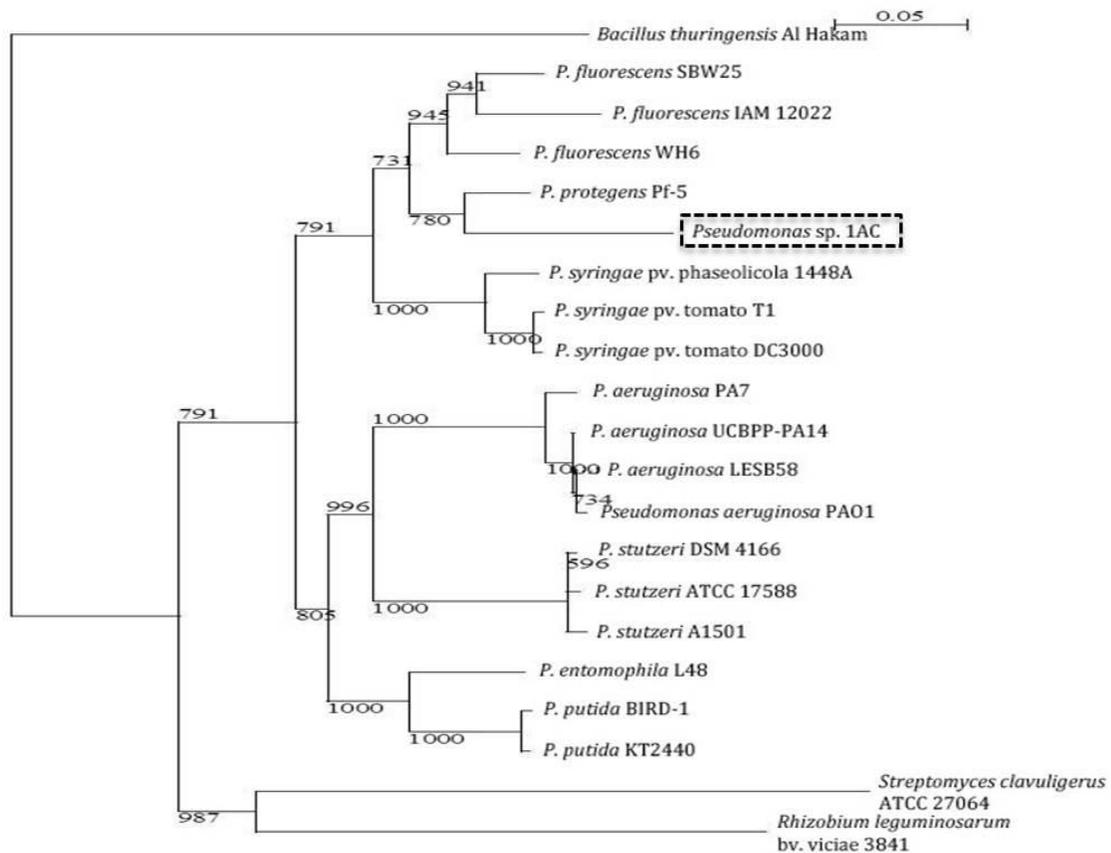
secuencias de los amplicones se realizó una comparación empleando el programa BLAST de la base de datos NCBI, para conocer a los microorganismos que presentaran un mayor porcentaje de identidad con *Pseudomonas* sp. 1AC para el caso de cada gen. De dichas comparaciones, se obtuvo como resultado que *Pseudomonas* sp. 1AC tiene un mayor porcentaje de identidad con *Pseudomonas protegens* Pf-5 con un máximo de identidad del 99, 96 y 90% para los genes del 16S rDNA, *gyrB* y *rpoD* respectivamente.

Para ejemplificar mejor la similitud de *Pseudomonas* sp. 1AC, con otras especies de su género y ver qué tan cercana es a cada una, se construyeron árboles filogenéticos empleando dos genes marcadores (*gyrB* y *rpoD*). No se utilizó el gen 16S rDNA debido a que al realizar la comparación en el programa BLAST, el máximo de identidad para 16S rDNA es del 99% para todas las secuencias arrojadas. El alto porcentaje de identidad se debe a que la mayoría de las secuencias reportadas para este gen se encuentran incompletas. Es por esto que en la actualidad no sólo se usa el gen 16S rDNA como marcador filogenético, también se buscan otros genes conservados conocidos como *housekeeping* (Mulet *et al*, 2010). Para la construcción de dichos árboles, se obtuvieron las secuencias de los genes housekeeping de la base de datos img del JGI.

Los árboles construidos empleando *gyrB* y *rpoD* se muestran en las figuras 11 y 12 respectivamente, *Pseudomonas* sp 1AC se encuentra encerrada en un cuadro en ambos árboles. En los cuales se observa que las especies *P. aeruginosa* y *P. stutzeri* forman el linaje de *P. aeruginosa*, ambas especies son patógenos oportunistas para el ser humano y el resto de las especies del género *Pseudomonas* pertenecen al linaje de *P. fluorescens* las cuales no son consideradas patógenas para el ser humano, dicha división de linajes ya había sido reportada con el empleo de los oligos para *gyrB* y *rpoD* (Lalucat *et al*, 2006; Kerr y Snelling, 2009; Mulet *et al*, 2010). Dado que *Pseudomonas* sp. 1AC presenta una mayor similitud con el linaje de *P. fluorescens*, se hablará un poco más sobre los grupos pertenecientes a éste linaje. En la figura 12 se observa que en el linaje *P. fluorescens* la especie con menor similitud es *P. putida*, la cual ha



El grupo más cercano es el de *P. fluorescens* el cual es ampliamente conocido por su capacidad de producir compuestos con diferentes actividades, además como ya se mencionó en el marco teórico, especies pertenecientes a este grupo han sido aisladas como microorganismos asociados a plantas.



**Figura 12. Árbol filogenético empleando *rpoD*** Se muestra la relación que guarda *Pseudomonas* sp. 1AC (Recuadro) con respecto a otros microorganismos, según las secuencias de *rpoD*. Se muestran los valores de bootstrap.

Como ya se había mencionado y como se observa en las figuras 11 y 12 el microorganismo con mayor similitud a *Pseudomonas* sp. 1AC es *P. protegens* Pf-5. La especie *P. protegens*, descrita recientemente ha sido aislada asociada a plantas, al igual que nuestro microorganismo de estudio. Esta especie debe su nombre a la capacidad que tienen de producir compuestos capaces de inhibir fitopatógenos. Dentro de la especie *P. protegens*, parece existir una diferencia

entre las cepas pertenecientes al viejo y al nuevo continente, lo que hablaría de las diferencias evolutivas, dado el ambiente en donde se desarrollan (Ramette *et al*, 2011).

Hablando en específico del caso de *P. protegens* Pf-5, ya se ha secuenciado completamente su genoma, evidenciando su capacidad productora de diversos compuestos con actividad biológica. Actualmente, se conocen 8 metabolitos de los 9 que se sabe es capaz de producir. Su genoma es el más grande del género, esto puede deberse a las diferencias en el ambiente en el que se desarrolla con respecto a otras especies de *Pseudomonas*. Por lo que evolutivamente, se ha visto en la necesidad de desarrollar la capacidad de producir un mayor número y diversidad de metabolitos (Paulsen *et al*, 2005; Gross *et al*, 2007; Loper *et al*, 2008).

Aunque *P. protegens* Pf-5 y *Pseudomonas* sp. 1AC se encuentren relacionadas filogenéticamente, esto no implica que produzcan los mismos compuestos. Además, el hecho de provenir de diferentes fuentes *Pseudomonas* sp. 1AC (epífito de la corteza de *Magnolia dealbata* Zucc, México) y *P. protegens* Pf-5 (rizófito de algodón, Texas), nos lleva a pensar que pudieran producir diferentes compuestos con actividad biológica.

Debido a la cercanía que presenta la especie *P. protegens* con *P. fluorescens*, se solía pensar que pertenecía a dicha especie (Silby *et al*, 2009), ya que ambas tienen la capacidad de producir pioverdina, sin embargo el patrón que presentan por siderotipificación por isoelectroenfoco es diferente entre *P. fluorescens* y *P. protegens*. Por lo que para comprobar que *Pseudomonas* sp. 1AC pertenece a la especie *P. protegens* sería necesario realizar la siderotipificación. Además, la especie *P. protegens* produce los antimicrobianos pioluteorina y 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) a diferencia de otras *Pseudomonas* fluorescentes que únicamente sintetizan DAPG (Ramette *et al*, 2011). Por lo que determinar la producción de dichos metabolitos, serviría para comprobar si la cepa 1AC pertenece a la especie *P. protegens*.

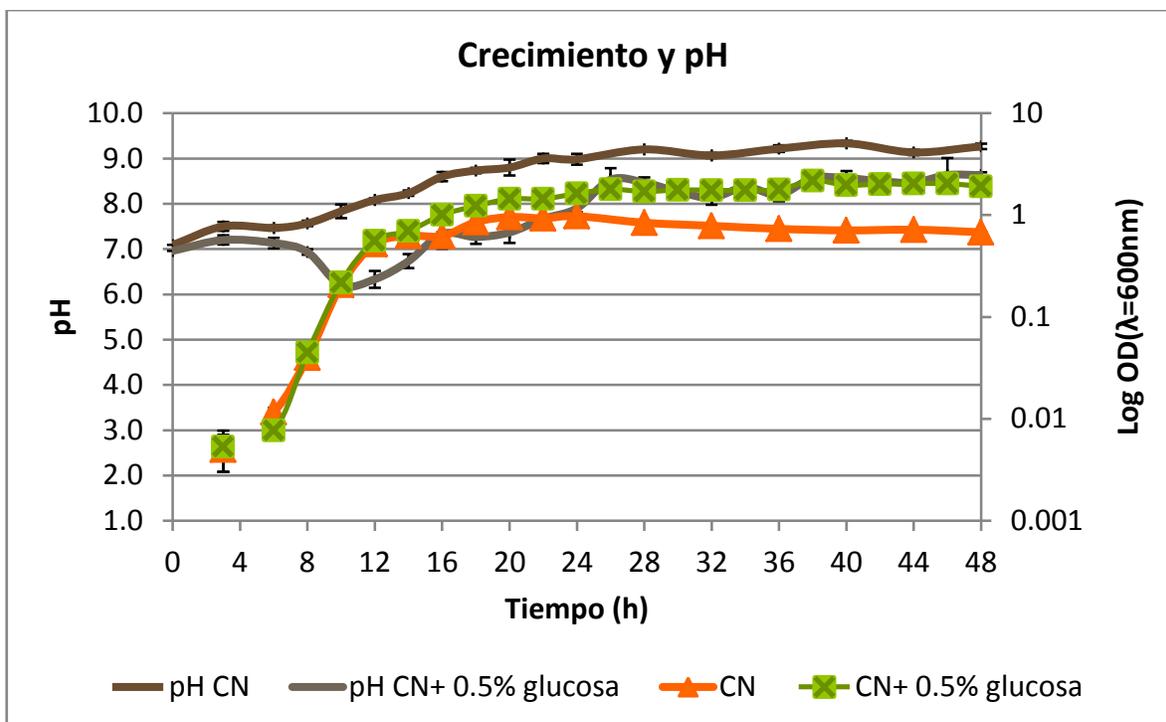
## 2 Caracterización del crecimiento de *Pseudomonas* sp. 1AC y monitoreo de la inhibición bacteriana de sus metabolitos

### 2.1 Curva de crecimiento

En el caso del crecimiento de *Pseudomonas* sp. 1AC se probaron dos medios diferentes (CN y CN+27 mM de glucosa) con el propósito de determinar en cuál existe una mejor producción de metabolitos con actividad antimicrobiana, es importante recordar que la producción de metabolitos secundarios, se ve afectada por las condiciones de cultivo.

En la figura 13 se observa el crecimiento de *Pseudomonas* sp. 1AC tanto en el medio suplementado como sin suplementar, en la figura se puede observar que en la fase logarítmica, no existe una diferencia en el crecimiento, ya que las líneas se traslapan. Sin embargo, en la fase estacionaria (16-48 h), se observa una diferencia entre el medio suplementado y el medio sin suplementar. En el medio suplementado se alcanza un mayor crecimiento debido a la glucosa con la que cuenta el medio (27 mM). Con los valores de crecimiento de la fase logarítmica (6-12 h), se calcularon los tiempos de duplicación. En el caso del CN fue de 32 min y para el CN suplementado de 29 min.

Para el caso del pH, en la figura 13 se observa un comportamiento similar en la basificación con ambos medios. Sin embargo, para el caso del medio suplementado, se observa una disminución del pH, entre las 8 y 10 h, después vuelve a incrementarse. Cabe mencionar que dicho comportamiento no se observa para el caso del CN sin suplementar, esto debido a que al contar con glucosa el medio suplementado, se lleva a cabo la glucólisis lo que produce una acidificación del medio. La basificación para el caso de ambos medios puede ser debida a la ruptura de las proteínas en grupos amino (Tortora *et al*, 2007).



**Figura 13. Curva comparativa del crecimiento de *Pseudomonas sp.* 1AC y pH de ambos medios.** Se observa una tendencia similar para el caso de ambos medios. Se observan en líneas de color oscuro el pH y, en líneas de color verde y naranja, se observa el crecimiento en ambos medios CN (naranja) y CN suplementado (verde).

### 2.1.1 Glucosa residual

Para conocer el consumo de glucosa en el medio suplementado, se determinó la glucosa residual en el sobrenadante con ayuda del kit glucosa oxidasa-peroxidasa (GOD-POD) de la marca Spinreact. En el caso del consumo de glucosa, en la figura 14 se observa que al entrar a la fase estacionaria, empieza el mayor consumo de la misma. Esto explicaría porque en la fase estacionaria se observa un mayor crecimiento en el medio suplementado con respecto al no suplementado (figura 13). Se comienza a observar una disminución de la glucosa residual a las 6 horas, lo que explicaría la pequeña disminución del pH (figura 13), debido a la glucólisis.

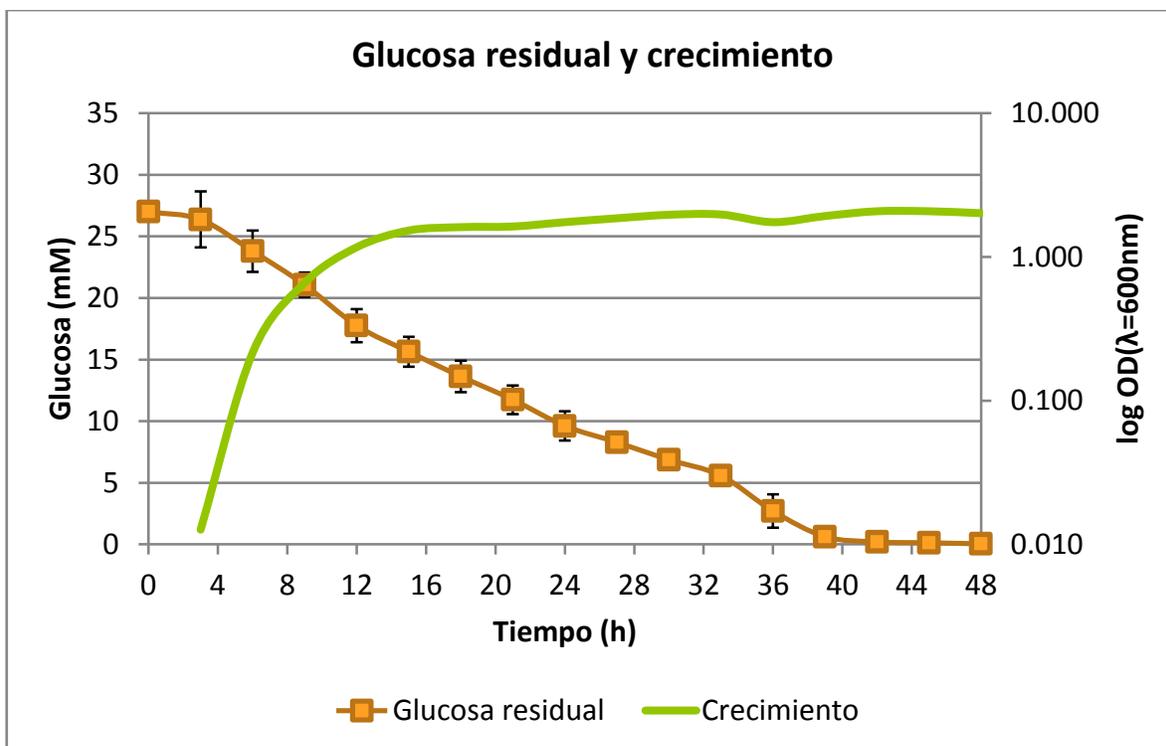
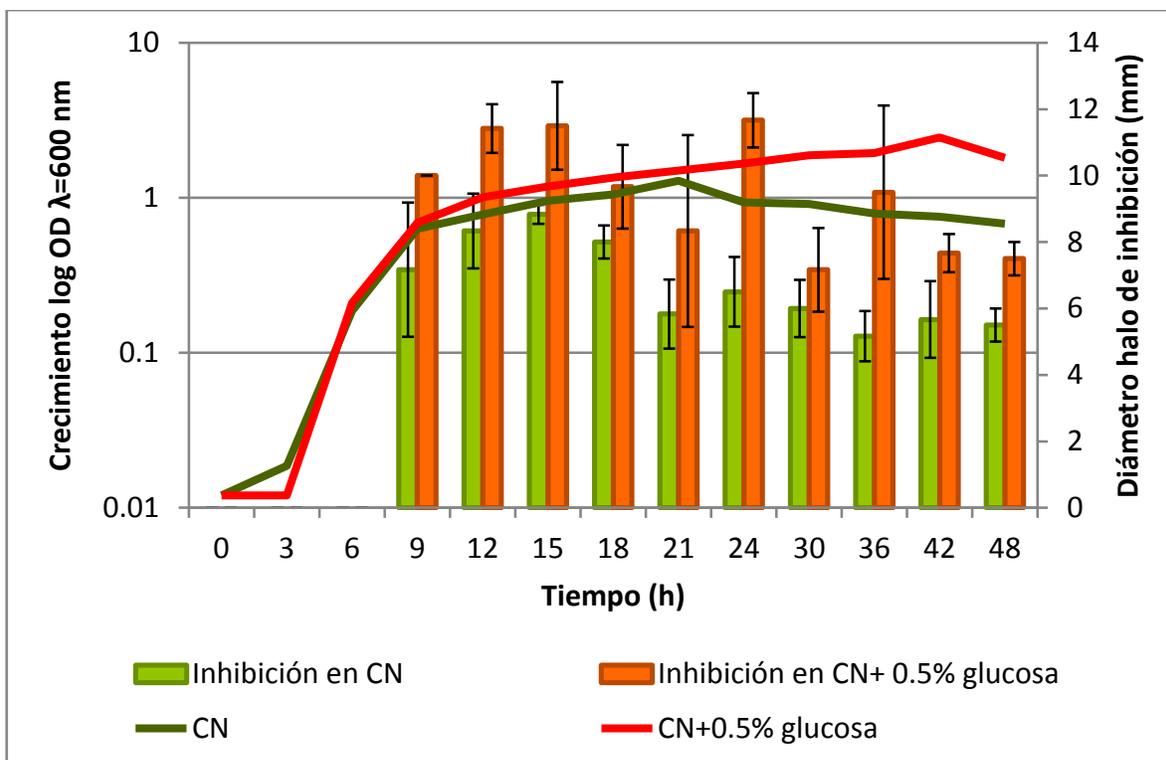


Figura 14. Consumo de glucosa con respecto al crecimiento de *Pseudomonas* sp. 1AC en CN+27 mM de glucosa. Se observa en color verde el crecimiento y en color naranja la glucosa residual. El mayor consumo de la misma se observa durante la fase estacionaria.

## 2.2 Monitoreo de la inhibición bacteriana del sobrenadante de *Pseudomonas* sp. 1AC sobre *M. luteus*

Para conocer el medio y tiempo adecuado para una mayor producción de metabolito (s) con actividad antibiótica, se realizó el monitoreo de la inhibición de los metabolitos en el sobrenadante sobre *M. luteus*. El monitoreo se realizó mediante pruebas de antibiosis de los sobrenadantes en sensidiscos, sobre *M. luteus*. En la figura 15, se observa la relación entre la inhibición de los metabolitos en el SN de ambos medios (suplementado y sin suplementar) sobre *M. luteus* con respecto al crecimiento de *Pseudomonas* sp. 1AC en ambos medios. En la figura se aprecia inhibición del sobrenadante de ambos medios contra *M. luteus* a partir de las 9 h, lo que corresponde a la fase pre-estacionaria del crecimiento, dicho comportamiento es característico de los metabolitos secundarios (Demain, 1981).



**Figura 15. Monitoreo de la inhibición del SN contra *M. luteus*, con respecto al crecimiento de *Pseudomonas sp. 1AC* en ambos medios.** Se muestran los diámetros de inhibición del sobrenadante contra *M. luteus*, con respecto al crecimiento de *Pseudomonas sp. 1AC*. Se muestra en barras los halos de inhibición, verde (CN) y naranja (CN suplementado). En línea sin marcadores se muestra el crecimiento verde (CN) y rojo (CN suplementado).

Se observa que la inhibición del SN del medio suplementado (barras naranjas) sobre *M. luteus*, se mantiene constante hasta las 24 h, posterior a dicho tiempo se observa una disminución. Para el medio sin suplementar la inhibición se mantiene constante hasta las 18 h, después decae y, se mantiene hasta las 48 h. Para ambos casos se sigue observando una inhibición hasta las 48 h. Sin embargo, la inhibición es mayor en el caso del medio suplementado, con respecto al medio sin suplementar. Dado que la inhibición bacteriana observada está relacionada con la producción de metabolitos bioactivos, el mejor medio para la producción de metabolitos bioactivos según esta prueba es el medio suplementado, ya que los halos observados son mayores en todos los tiempos. Por lo que se decidió trabajar únicamente con el medio suplementado para el cultivo del cual se realizaran extracciones para evaluar su actividad, antibiótica, parasitocida y su toxicidad.

### 3 Extracción por partición del sobrenadante, biomasa y control de extracción

Elegido el medio donde se observaba por inhibición sobre *M. luteus* una mayor producción de metabolitos bioactivos, se realizó una fermentación de 2 L, con el fin de tener cantidad suficiente de los metabolitos para poder evaluar las bioactividades. Al sobrenadante y biomasa de dicha fermentación se le realizaron extracciones empleando AcOEt, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH. Además se realizó un control del medio (2L de CN+0.5% de glucosa) el cual se extrajo con las mismas condiciones que el SN. Los extractos se llevaron a sequedad y se determinó su rendimiento. El rendimiento de las extracciones se muestra en la tabla 6, se denominó EOB al extracto orgánico de la biomasa, EOSN al extracto orgánico del SN y EOC al extracto orgánico del control del medio.

**Tabla 6. Rendimiento de la extracción por partición.**

Extracto orgánico	Rendimiento (mg/L)
Biomasa (EOB)	194.6
SN (EOSN)	130.6
Control (EOC)	216.9

En la tabla 6 se observa un mayor rendimiento en el EOC que el EOSN, debido a que el contenido de cada uno es diferente, ya que en el EOC se tienen los componentes del medio, mientras en el EOSN se tienen los metabolitos producto de la fermentación. En la figura 16 se observa el perfil cromatográfico para los tres extractos, se puede apreciar una diferencia en el contenido entre el EOC y EOSN, ya que en el EOSN se observan los metabolitos producto del consumo de los nutrientes del medio.



**Figura 16. Perfil cromatográfico de los extractos.** En el carril 1 se muestra el EOC, en el segundo carril el EOSN y en el tercer carril el EOB. Cromatoplaaca eluida con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  (98:2). Revelada con ácido sulfúrico al 10%.

### 3.1 Determinación de actividad biológica

#### 3.1.1 MIC (Concentración mínima inhibitoria)

Para evaluar la actividad antibiótica de los extractos orgánicos (EOSN, EOB y EOC), se determinó la concentración mínima inhibitoria de los mismos contra *M. luteus*, *B. subtilis*, *E.coli* y *S. cerevisiae*. Los resultados de esta prueba para los cuatro microorganismos empleados, se muestran en la tabla 7. En dicha tabla se puede observar que para el caso tanto del EOB como del EOSN únicamente hay inhibición contra microorganismos Gram-positivos.

Esto corresponde con la mayoría de antibióticos reportados provenientes de *Pseudomonas*, ya que son capaces de inhibir únicamente a microorganismos Gram-positivos (Reader-Christ *et al*, 2012). Sin embargo, los valores de MIC son menores a los observados para el compuesto Orfamida A, producido por *P. protegens* Pf-5 (Reader-Christ *et al*, 2012).

Tabla 7. MIC de los extractos orgánicos del sobrenadante (EOSN) y biomasa (EOB) y, controles contra los diferentes microorganismos prueba.

Microorganismo	Tratamiento	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>M. luteus</i>	EOB	25
	EOSN	25
	Eritromicina	0.8
<i>B. subtilis</i>	EOB	12.5
	EOSN	12.5
	Eritromicina	0.8
<i>E. coli</i>	EOB	*
	EOSN	*
	Ácido nalidíxico	3.125
<i>S. cerevisiae</i>	EOB	*
	EOSN	*
	Cicloheximida	0.781

Dado que los valores de MIC son iguales para EOB y EOSN, no podemos saber si se trata de un compuesto extracelular. Cabe recordar que, la inhibición observada puede ser debida a un efecto de sinergismo de los metabolitos producidos. En caso de que se tratara de un compuesto único con dicha actividad, al purificarlo, se esperaría un menor valor de MIC. Es importante mencionar que aunque los datos no se muestran en la tabla 7, para el caso del EOC no se observa inhibición contra alguno de los microorganismos prueba a concentraciones de 3.2 mg/mL hasta 0.8  $\mu\text{g/mL}$ .

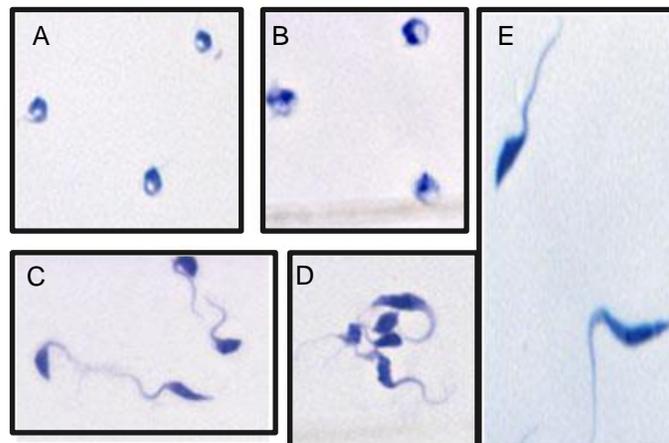
### 3.1.2 Actividad antiparasitaria sobre *Trypanosoma cruzi*

Para evaluar la actividad antiparasitaria de los extractos, se empleó *Trypanosoma cruzi* como modelo de estudio. Se determinó la  $\text{CI}_{50}$  de cada extracto empleando epimastigotes de *T. cruzi* (CL-Brener). En el caso de la actividad tripanocida, se observa actividad tanto en el EOSN, como en la geneticina (G418). Los datos se muestran en la tabla 8, donde podemos observar que el efecto producido tanto por el EOSN como por G418, es estadísticamente diferente con respecto al EOB y EOC.

Sin embargo los tripanosomas tratados con el EOSN y EOB, muestran cambios morfológicos (Figura 17- A y 17- B), los cuales no se observan para el tratamiento con G418 (Figura 17-D).

**Tabla 8.  $CI_{50}$  de los diferentes tratamientos contra *T. cruzi*.** (\*=diferencia contra todos los tratamientos, con una  $\alpha=0.05$ )

Tratamiento	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
EOB	280 $\pm$ 32
EOSN*	97 $\pm$ 13
G418*	142 $\pm$ 92
EOC	345 $\pm$ 95



**Figura 17. Diferencias morfológicas entre tratamientos.** Se observan las diferencias morfológicas de *T. cruzi* al ser expuestos por 24 h a los diferentes tratamientos. Se puede observar una diferencia entre la morfología de los parásitos al ser expuestos al EOB y EOSN (A y B respectivamente) con respecto al resto de los tratamientos. En el caso de los parásitos expuestos al EOC (C) y de los expuestos a G418 (D), no se observa cambios morfológicos con respecto al control de crecimiento (E).

Al observar los mismos cambios morfológicos tanto en presencia del EOB como del EOSN, podemos decir que el compuesto o compuestos responsable (s) de dicho efecto se encuentra en ambos extractos. Y que se encuentra en mayor concentración en el EOSN debido a que la  $CI_{50}$  es menor en el EOSN que en el EOB (Tabla 8).

Se han reportado compuestos producidos por *Pseudomonas*, con la capacidad de inhibir parásitos. Por ejemplo, se ha reportado que *P. protegens* CHA0, tiene la capacidad de producir un proteasa (AprA) contra nemátodos de plantas sin producir cambios morfológicos (Siddiqui *et al*, 2005) y, el 2,4- diacetilfloroglucinol (DAPG) un compuesto capaz de producir cambios morfológicos (Neiding *et al*, 2011). Además, se ha descrito un factor anti-tripanosomal producido por una cepa de *P. fluorescens*, capaz de producir cambios morfológicos en *T. cruzi* (Mercado *et al*, 1986). Sin embargo, las condiciones bajo las cuales fue probado éste último, hacen dudar de la verdadera eficacia del mismo.

También se han reportado compuestos producidos por otras *Pseudomonas*, con la capacidad de inhibir la síntesis de tubulina, lo cual podría explicar los cambios morfológicos observados, ejemplo de esto es el antifúngico Rhizoxin (Loper *et al*, 2008).

### 3.1.3 Toxicidad sobre *Artemia salina*

Para evaluar la toxicidad de los extractos orgánicos anteriormente evaluados y conocer si podrían tener actividad citotóxica, se determinó la CL<sub>50</sub> de los mismos empleando al crustáceo *A. salina*. Los resultados para esta prueba se muestran en la tabla 9. Se observa que la CL<sub>50</sub> para los EOB y EOSN son menores a 1000 µg/mL, por lo cual se consideran activos (Anderson *et al*, 1991). Mientras que para el control negativo (EOC) es mayor a 1000 µg/mL por lo que no se considera activo.

**Tabla 9. CL<sub>50</sub> de los tratamientos contra *Artemia salina*.** (\*=diferencia contra todos los tratamientos, con una  $\alpha=0.05$ ).

Extracto	CL <sub>50</sub> (µg/mL)
EOB	26±12
EOSN	41±17
EOC*	>1000

En la mayoría de los casos reportados donde se emplea esta prueba como un tamizaje para posteriormente realizar pruebas de citotoxicidad con líneas

celulares, se muestra que aquéllos extractos o compuestos que muestren en este modelo una  $CL_{50}$  menor a 500  $\mu\text{g/mL}$ , presentan una inhibición contra líneas celulares cancerígenas (Carballo *et al*, 2002; Luo *et al*, 2012). Por lo que según los resultados mostrados en la tabla 9, los EOSN y EOB son candidatos para realizar pruebas de citotoxicidad.

Se puede observar que las  $CL_{50}$  obtenidas para *Artemia salina* son menores que las obtenidas para *T. cruzi*. Esto puede ser debido a la complejidad de la membrana de *T. cruzi* (De Souza, 2009). Aparte se observa que en el caso del EOB es 10 veces menos activo para *T. cruzi* con respecto a *A. salina* (Tabla 8 y 9). La diferencia puede ser debida a la presencia de endotoxinas bacterianas, las cuales podrían causar la muerte de *A. salina*, dicho efecto se ha reportado para diferentes animales, como es el caso de la coagulación de la hemolinfa de *Limulus polyphemus* (Bermejo y Duarte, 2003; Tortora *et al*, 2007). Para el caso de la toxicidad del EOSN, en caso de ser el mismo compuesto responsable de la actividad tripanocida, que afecta los microtúbulos, explicaría la toxicidad similar para ambos modelos (Tabla 8 y 9).

Además, hay que recordar que se trata de una mezcla de compuestos, por lo que al purificarlos, se esperaría que la toxicidad en el modelo de *A. salina* disminuya o se muestre una mayor selectividad en pruebas de citotoxicidad.

Para las *Pseudomonas* se sabe que el 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) es capaz de inhibir a diferentes microorganismos (Kamei e Isnasetyo, 2003; Tofazzan y Von Tiedemann, 2011), además de producir cambios morfológicos en *Caenorhabditis elegans* (Neiding *et al*, 2011). Sin embargo no se ha reportado su uso o evaluación citotóxica aunque si muestra toxicidad en ratones según Kamei e Isnasetyo (2003).

Como ya se había mencionado un posible mecanismo de acción para el efecto parasiticida es la inhibición de la tubulina. Dicho efecto puede ser causado por un análogo del Rhizoxin, del cual se ha reportado su efecto como antifúngico y citotóxico (Tsuruo *et al*, 1986; Loper *et al*, 2008).

Se ha reportado que tanto el DAPG como un análogo de Rhizoxin son producidos por *P. protegens* Pf-5 (Paulsen *et al*, 2005; Loper *et al*, 2008), especie similar a *Pseudomonas* sp. 1AC.

## Conclusiones

---

Aunque se encuentra relacionada con *P. protegens* Pf-5, es posible que *Pseudomonas* sp. 1AC se trate de una especie diferente de acuerdo con el árbol filogenético basado en *rpoD*.

*Pseudomonas* sp. 1AC, produce compuestos con actividad antibiótica contra bacterias Gram-positivas, lo cual se observa en ambos extractos.

El extracto del sobrenadante de *Pseudomonas* sp. 1AC presentó inhibición del crecimiento de los epimastigotes de *T. cruzi* y produjo cambios morfológicos en los mismos.

Los extractos del sobrenadante y la biomasa de *Pseudomonas* sp. 1AC, son tóxicos contra *A. salina*, por lo que para conocer la selectividad del o los compuestos se deben realizar las pruebas de citotoxicidad empleando líneas celulares.

## Perspectivas

---

Realizar la purificación de los metabolitos.

Determinar cuál es o son los metabolito (s) responsables de la actividad ya descrita.

Realizar las pruebas necesarias para conocer si se trata de una cepa perteneciente a la especie *P. protegens* o de una nueva especie.

## Bibliografía

---

1. Anderson J, Goetz C, McLaughlin J y Suffnes M. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis* (1991). 2: 107-111.
2. Badri D, Weir T, Van der Lelie D y, Vivanco J. Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology* (2009). 20: 642-650.
3. Bérdy, J. Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics* (2005). 58: 1-26.
4. Berendsen R, Pieterse C y Bakker P. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science* (2012). 17: 478-486.
5. Bermejo A y Duarte J. Mechanism of transduction of lipopolysaccharide. *Ars Pharmaceutica* (2003). 44: 121-139.
6. Bode H. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. *Current Opinion in Chemical Biology* (2009). 13: 224-230.
7. Carballo J, Hernández-Inda Z, Pérez P y García-Grávalos M. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology* (2002). 2: 17-21.
8. Compant, S; Clément, C; Sessitsch, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanism involved and prospect for utilization. *Soil Biology & Biochemistry* (2010). 42: 669-678.
9. De Souza W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2009). 104: 89-100.
10. Demain, A. L. Industrial microbiology. *Science* (1981). 214: 987-995.
11. Espinosa A. Búsqueda de hongos asociados a *Magnolia dealbata* Zucc. productores de metabolitos con actividad antimicrobiana. Tesis de Licenciatura (2012). Facultad de Química, UNAM.
12. Garrity G. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*, Volume Two, part B. Second edition (2005) USA Springer. 323-348 pp.

13. Gross H, *et al.* The Genomistropic approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters. *Chemistry & Biology* (2007). 14: 53-63.
14. Gross, H y Loper, J. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Natural product reports* (2009). 26: 1408-1446.
15. Gutiérrez L y Vovides A. An *insitu* study of *Magnolia dealbata* Zucc. in Veracruz State: an endangered endemic tree of Mexico. *Biodiversity and Conservation* (1997). 6: 89-97.
16. Gutiérrez L. Estudio biológico de una especie forestal endémica (*Magnolia dealbata* Zucc.). Tesis de Maestría en Ciencias (1993). Facultad de ciencias biológicas, UANL.
17. Guzmán S. Evaluación de la capacidad de microorganismos asociados a *Magnolia dealbata* Zucc. para producir compuestos con actividad biológica. Tesis de Maestría en ciencias biológicas (2012). Posgrado en ciencias biológicas, UNAM.
18. Hardman Roland. Medicinal and Aromatic plants-Industrial profiles. Taylor & Francis 2002. Volume 28.
19. Hirano S y Upper C. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*- a pathogen, ice nucleus and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (2000). 64: 624-653.
20. Kamei Y e Isnansetyo A. Lysis of methicillan-resistant *Staphylococcus aureus* by 2,4-diacetylphloroglucinol produced by *Pseudomonas* sp. AMSN isolated from a marine alga. *International Journal of Antimicrobial Agents* (2003). 21: 71-74.
21. Kerr K y Snelling A. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection* (2009). 73: 338-344.
22. Lalucat J, Bennisar A, Bosch R, García-Valdés E y Palleroni N. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Reviews* (2006). 70: 510-547.
23. Lindow S. y Brandl M. Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* (2003). 69: 1875-1883.

24. Lindow S. y Leveau J. Phyllosphere microbiology. Current opinion in biotechnology (2002). 13: 238-243.
25. Loper J, et al. Isolation and identification of rhizoxin analogs from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 by using a genomic mining strategy. Applied and Environmental Microbiology (2008). 74: 3085-3093.
26. Luo X et al. Two new coumarins from *Micromelum falcatum* with cytotoxicity and brine shrimp larvae toxicity. Molecules (2012). 17: 6944-6952.
27. Manterola A. Aislamiento e identificación de una cepa bacteriana asociada a *Magnolia dealbata* Zucc. por su capacidad para producir un antibacteriano. Tesis de Licenciatura (2011). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
28. McChesney J, Venkataraman S y Henri J. Plant natural products: Back to the future or into extinction? Phytochemistry (2007) 68: 2015-2022.
29. Mercado T, Butany J y Ferrans V. *Trypanosoma cruzi*: Ultraestructural changes produced by an anti-trypanosomal factor from *Pseudomonas fluorescens*. Experimental Parasitology (1986). 61: 65-75.
30. Meyer B, Ferrigni N, Putnam J, Jacobsen L, Nichols D y McLaughlin J. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Medica (1982). 45: 31-34.
31. Mulet M, Bennasar A, Lalucat J y García-Valdés E. An *rpoD*-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for the detection in environmental samples. Molecular and cellular probes (2009). 23: 140-147.
32. Mulet M, Lalucat J y García E. DNA sequenced-based analysis of the *Pseudomonas* species. Environmental Microbiology (2010). 12: 1513-1530.
33. Neiding N, Paul R, Scheu S y Jousset A. Secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 drive complex non-trophic interactions with bacteriovorous nematodes. Environmental Microbiology (2011). 61: 853-859.
34. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-

Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.

35. O'Brien J y Wright G. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. *Current Opinion in Biotechnology* (2011). 22: 552-558.
36. Paulsen I, *et al.* Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature Biotechnology* (2005). 23: 873-878.
37. Poblete-Castro I, Becker J, Dohnt K, Martins V y Wittman C. Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2010). 93: 2279-2290.
38. Ramette A, *et al.* *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Systematic and Applied Microbiology* (2011). 34: 180-188.
39. Reader-Christ K, *et al.* Model membrane studies for characterization of different antibiotic activities of lipopeptides from *Pseudomonas*. *Biochimica et Biophysica Acta* (2012). 1818: 566-573.
40. Reinhold-Hurek B y Hurek T. Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology* (2011). 14: 435-443.
41. Ryan R, Germaine K, Franks A, Ryan D y Dowling D. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology letters* (2008) 278: 1-9.
42. Siddiqui I, Haas D, Heeb S. Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Applied and Environmental Microbiology* (2005). 71: 5646-5649.
43. Silby M *et al.* Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biology* (2009) 10: R51-R51.16.
44. Singh B, Millard P, Whiteley A y Colin J. Unravelling rhizosphere-microbial interactions: opportunities and limitations. *TRENDS in Microbiology* (2004). 12: 386-393.

45. Speldberg B *et al.* The epidemic of antibiotic-resistant infections. *Clinical Infection Diseases* (2008). 46: 155-164.
46. Stierle A, Strobel G y Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific ye. *Science* (1993). 260: 214-216.
47. Strobel G, Daisy B, Castillo. U y Harper J. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* (2004). 67: 257-268.
48. Szabó Z, Budai M, Blaskó K y Gróf P. Molecular dynamics of the cyclic lipodepsipeptides action on model membranes: effects of syringopeptin22A, syringomycin E, and syringotoxin studied by EPR technique. *Biochimica et Biophysica Acta* (2004). 1660: 118-130.
49. Tofazzal M y Von Tiedemann A. 2,4-Diacetylphloroglucinol suppresses zoosporogenesis and impairs motility of Peronosporomycete zoospores. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (2011). 27: 2071-2079.
50. Tortora G, Funke B y Case C. *Introducción a la Microbiología*. Editorial Panamericana (2007). 9ª edición. 127, 138, 463 pp.
51. Tsuruo T *et al.* Agent against human and murine tumor cells and their vincristine-resistant sublines. *Cancer Research* (1986). 46: 381-385.
52. Vaishnav P y Demain A. L. Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* (2010). 29: 223-229.
53. Vallet-Gely I *et al.* Association oh hemolytic activity of *Pseudomonas entomophila* a versatile soil bacterium, with cyclic lipopeptide production. *Applied and Environmental Microbiology* (2010). 76: 910-921.
54. Velasco-Macías C. G *et al.* *Magnolia dealbata* en Nuevo León, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* (2008). 79: 459-463.
55. Weisburg W, Barns S, Pelletier D y Lane D. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* (1991) 173: 697-703.
56. Whipps J, Hand P, Pink D, y Bending G. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology* (2008). 105: 1744-1755.

57. Wiegand I, Hilbert K y Hancock R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols* (2008). 3: 163-175.
58. Yamamoto S y Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology* (1995). 61: 1104-1109.
59. Yamamoto S, Kasai H, Arnold D, Jackson R, Vivian A y Harayama S. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intragenic structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* (2000). 146: 2385-2394.
60. Young-Jung L, Yoo L, Chong-Kil L, Jae J, Sang H y Jin H. Therapeutic applications of compounds in the *Magnolia* family. *Pharmacology & Therapeutics* (2011). 130: 157-176.

## Apéndice I

### Técnicas de biología molecular

---

#### 1 Extracción de DNA

- 1) Centrifugar 1.5 mL de cultivo por 5 min a 12000 rpm.
- 2) Decantar el sobrenadante y resuspender el paquete celular en 565  $\mu$ L de buffer TE (Tris 10 mM pH 8/EDTA 1 mM pH 8), 30  $\mu$ L de SDS 10% y 3  $\mu$ L de proteinasa K (20 mg/mL) e incubar 1 h a 37°C.
- 3) Adicionar 100  $\mu$ L NaCl 5M y 80  $\mu$ L de CTAB(10%)/NaCl(0.7M) agitar e, incubar por 10 min a 65°C.
- 4) Adicionar un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), centrifugar por 5 min a 13200 rpm.
- 5) Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y, adicionar un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1).
- 6) Agitar y centrifugar por 5 min a 13200 rpm
- 7) Transferir la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y, adicionar 0.6 volúmenes de isopropanol frío e incubar a -20°C toda la noche.
- 8) Centrifugar por 15 min a 13200 rpm, desechar el sobrenadante y lavar el DNA con 500  $\mu$ L de etanol al 70%.
- 9) Centrifugar por 5 min a 13200 rpm y, secar el pellet a 42°C por 15 min.
- 10) Disolver el pellet 100  $\mu$ L de Buffer TE con 1  $\mu$ L de RNAsa (10 mg/mL) e incubar 1 h a 37°C.
- 11) Adicionar 500  $\mu$ L de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y, 400  $\mu$ L de agua esterilizada, agitar y centrifugar por 5 min a 13200 rpm.
- 12) Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y, adicionar 50  $\mu$ L de NaCl 1 M y 300  $\mu$ L de isopropanol frío, agitar por inversión y se centrifugar por 15 min a 13 200 rpm.
- 13) Lavar el DNA con 1 mL de etanol al 70% y, centrifugar por 10 min a 13200 rpm. Se secó el DNA a 42°C por 15 min.
- 14) Finalmente, se resuspendió en 50  $\mu$ L de buffer Tris-HCl pH=8 10 mM.

## **2 Preparación de geles de agarosa al 0.8%**

1. Pesar 0.4 g de agarosa (Vivantis) y se disolver en 50 mL de buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM/EDTA 2 mM pH 8.5).
2. Solubilizar la agarosa y, verter en el molde para el gel previamente nivelado.
3. Adicionar 1  $\mu$ L de bromuro de etidio (10 mg/mL), colocar un peine para la formación de los pozos.
4. El gel ya solidificado, se introdujo en la cámara de electroforesis y se cubrió completamente con buffer TAE 1X.
5. Mezclar 1  $\mu$ L de marcador de peso molecular (1kb 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L) o 5  $\mu$ L de muestra con 1  $\mu$ L de buffer de carga (6X) y, se colocaron en los pozos.
6. Correr el gel a 80V por una hora aproximadamente.

## **3 Purificación del amplicón con fibra de vidrio**

1. Cargar un gel con todo el producto de PCR y correrlo bajo las condiciones arriba descritas y, se corta la banda correspondiente y se colocan aproximadamente 250 mg de agarosa por tubo Eppendorf de 0.6 mL con fibra de vidrio, dentro de un tubo de 1.5 mL limpio.
2. Centrifugar a 3000 rpm por 1 min, se coloca el tubo de 0.6 mL con fibra de vidrio en un nuevo tubo de 1.5 mL y se centrifuga nuevamente.
3. El sobrenadante de dos tubos de 1.5 mL se junta y se les agrega 1 volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, centrifugar a 13200 rpm durante 5 min.
4. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y agregar 0.1 volumen de NaCl 5 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, agitar e incubar a -20°C durante 30 min.
5. Centrifugar a 13000 rpm durante 20 min, el amplicón se seca a 40°C por aproximadamente 15 min y, disolver en 30  $\mu$ L de agua estéril.

## Apéndice II

### Microbiología

---

#### 1 Medios de cultivo y soluciones

##### *Caldo nutritivo (NB) (1 L)*

- Extracto de carne 3 g
- Peptona 5 g

- Extracto de carne 3 g
- Agar 15 g

##### *YPD (1 L)*

- Extracto de levadura 10 g
- Peptona 20 g
- Glucosa 10 g

##### *YPD agar (1 L)*

- Extracto de levadura 10 g
- Peptona 20 g
- Glucosa 10 g
- Agar 15 g

##### *Agar nutritivo (AN) (1 L)*

- Peptona 5 g

##### *Solución salina (SSI) (1 L)*

- Cloruro de sodio 8.5 g

#### 2 Estándar 0.5 de la escala de Mc Farland

Se preparó una solución de cloruro de bario dihidratado ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) al 1.175% (w/v) y una solución de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 1% v/v. Se añadieron 0.05 mL de la solución de  $\text{BaCl}_2$  (1.175%) a 9.95 mL de la solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1%) en agitación constante. Se determinó la absorbencia a  $\lambda_{625}$  (0.08-0.13). Se almacenó en obscuridad a temperatura ambiente hasta por un mes (Wiegand *et al*, 2008).