

22
29

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS :

**ESTUDIO DE LA ALTERACIÓN BACTERIANA EN
DINTELES PREHISPANICOS.**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA EL SR.

AGUSTÍN CARRILLO GARCÍA



México, D. F., 17 de Marzo de 1998.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA**

261024



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	Profra. Rosa María Ramírez Gama
VOCAL	Profra. Biserka Sveshtarova Pekarkova
SECRETARIO	Profr. Homero Hernández Montes
1er. SUPLENTE	Profra. Aida Navas Pérez
2o. SUPLENTE	Profra. Luz del Carmen Castellanos Roman

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio de Investigación Microbiológica.
Laboratorio 1 - D, Edificio A.
Departamento de Biología
Facultad de Química, U.N.A.M.

NOMBRE DEL ASESOR:


Profra. Biserka Sveshtarova Pekarkova.

NOMBRE DEL SUSTENTANTE:


Sr. Agustín Garrillo García.

GRACIAS A DIOS,
por concederme luz y vida para lograr un sueño.

**Radiante e inmarcesible es la Sabiduría.
Fácilmente la contemplan los que la aman
y la encuentran los que la buscan.
Es un reflejo de la Luz Eterna, un espejo sin mancha
de la actividad de Dios, una imagen de su Bondad.**

Sabiduría 6,12:7,26.

AGRADECIMIENTOS.

A todos los que hicieron posible el logro de la parte práctica de éste trabajo.

M. en C. Biserka Sveshtarova Pekarkova. Depto. Biología, Fac. Química, U.N.A.M.

Profra. Guadalupe Vélez Pratt. Depto. Biología, Fac. Química, U.N.A.M.

Dra. Silvia Antuna. Microscopía Electrónica de Barrido. Depto. Histología, Fac.
Medicina, U.N.A.M.

Dra. Margarita Portilla. Sección Calorimetría. Depto. Termodinámica, D.E.Pg., Fac.
Química. U.N.A.M.

Lic. Luisa María Mainou. Coordinación Nacional de Restauración del Patrimonio
Cultural. I.N.A.H.

A MIS PADRES, quienes con su vida
me han brindado lo que yo no podré pagarles nunca.

A MIS HERMANOS, quienes en su entusiasmo
son los mejores amigos que he tenido.

A CLAUDIA, compañera y amiga
a quien tanto amo y le ha dado mi vida.

A MIS HIJOS, en quienes Dios me da
la oportunidad de cultivar el amor

A MIS FAMILIARES Y AMIGOS,
que son mi medio de santificación

CAPITULO I. INTRODUCCION

El ciclo del carbono implica la transferencia de bióxido de carbono y carbono orgánico entre la atmósfera y la hidrosfera y litosfera. Este ciclo encierra gran importancia por movilizar uno de los cuatro principales elementos constitutivos de la materia orgánica (Atlas,1990). Sin embargo, constituye un serio problema, que ha tomado relevancia, el deterioro de materiales de importancia científica o cultural cuando son atacados por agentes biológicos, químicos ó físicos por formar parte de éste ciclo (Blanchette,1990). Tal es el caso de la bioalteración de la madera.

La madera es descompuesta por una gran variedad de agentes biológicos que incluyen hongos, bacterias e insectos (Blanchette,1990); sin embargo, el principal biodeterioro de sus componentes es causado por microorganismos (Shimada,1991).

Transformaciones como la degradación de la lignina, por hongos café, y la celulosa, por hongos blancos y bacterias en la madera, movilizan el carbono orgánico almacenado mediante la producción de compuestos geoquímicos simples que pueden ser utilizados por otros organismos ó aún por ellos mismos (Atlas,1990).

Dentro de los hongos más comunes que pueden alterar la madera se pueden encontrar a algunos miembros de los géneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus*. Por otro lado, dentro de las bacterias comúnmente involucradas en la

bioalteración de la madera destacan algunos miembros de los géneros *Cellvibrio*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Pseudomonas*, *Myxococcales* y *Cytophagales* (Shimada,1991; Mainou,1993; Pinzón,1972; Vélez,1982; García,1985; Arroyo,1994; Vivanco,1994).

Los hongos son los más estudiados debido a que dos de los géneros mencionados, *Trichoderma* y *Aspergillus*, son los principales microorganismos involucrados en la producción y síntesis comercial de celulasas, enzimas cuyo sustrato es la celulosa, polímero natural estructural más abundante en el mundo y que es el principal componente de la madera (por tanto del papel), y del algodón (Nickel,1988; Shimada,1991).

En México, el aislamiento, identificación y purificación de cepas celulolíticas se ha realizado con el fin de utilizarlas en el aprovechamiento de materiales celulósicos de desecho, tales como el bagacillo de caña de azúcar (García,1983), para la producción de celulasas y/o proteína unicelular (Campos,1977).

Sin embargo, existen microorganismos celulolíticos, tales como las bacterias deslizantes, que no han sido estudiados con detalle y que han sido involucrados en la alteración de piezas arqueológicas, como los Dinteles Prehispánicos labrados en madera, tales como los hallados en la zona de Tlatelolco (Mainou,1993), y que han sido estudiado en éste trabajo.

CAPITULO II. GENERALIDADES

A.- ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LOS DINTELES DE TLATELOLCO.

Los dinteles estudiados en éste trabajo son tres piezas arqueológicas labradas en madera que corresponden a la época del postclásico y que al parecer datan del año 1390. Las piezas fueron halladas en la zona de Tlatelolco, específicamente en las excavaciones que se realizaban en torno a la construcción del edificio que albergará las oficinas del Tratado de Libre Comercio en la Ciudad de México (Lechuga, 1993).

El nivel en el que se encontraron las piezas era de alto contenido de humedad, condición que fue necesario mantener después del rescate, a fin de evitar el deterioro mecánico de los dinteles, causado por el desplazamiento del agua por el aire del ambiente; en atención a esto, las piezas se colocaron en un ambiente con humedad y temperatura controladas durante un periodo en el cual se determinaría el método más adecuado para su conservación (Mainou, 1993). En el apéndice se encuentra una descripción detallada de los dinteles (Ver apéndice 1)

No obstante, con el tiempo el ambiente fue idóneo para el crecimiento de hongos que iniciaron un proceso de bioalteración de la madera de los dinteles, el cual se sumó al proceso de alteración mecánica citado en el párrafo previo. Para prevenir una afectación mayor de las piezas, se consideró adecuado sumergirlas en una solución de biocida (Pentaclorofenato

sódico) con el fin de evitar el crecimiento de hongos; sin embargo, éstas condiciones propiciaron una mayor proliferación de procariontes (Mainou, 1993).

La observación con microscopía electrónica de barrido reveló el deterioro y deformación de las paredes celulares de la madera. La degradación de la madera denuncia la presencia de hongos y bacterias, proceso denominado *Bioalteración*. Las bacterias que se identificaron como causantes de la degradación de la madera superficial de los Dinteles fueron de los órdenes *Myxococcales* y *Cytophagales*, así como 5 cepas diferentes de *Penicillium*, y 2 cepas diferentes de *Fusarium* (Mainou, 1993).

B.- CONSTITUCIÓN DE LA MADERA

i. Estructura física de la madera

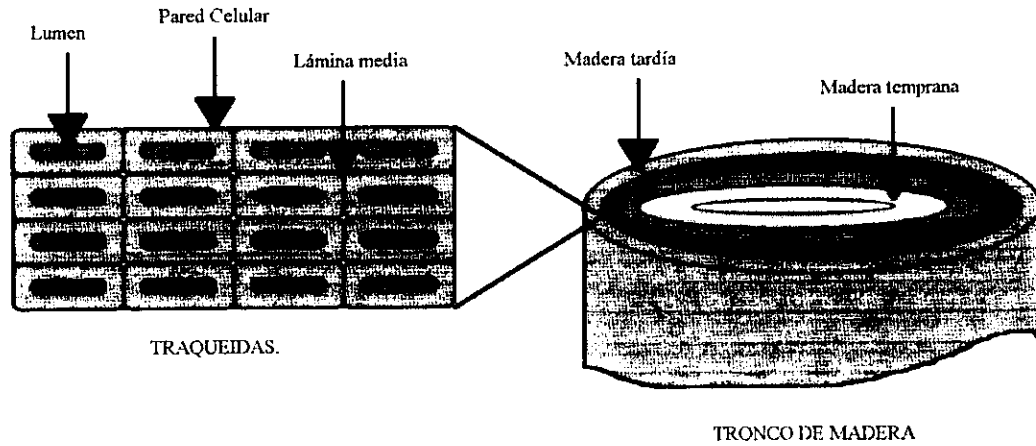
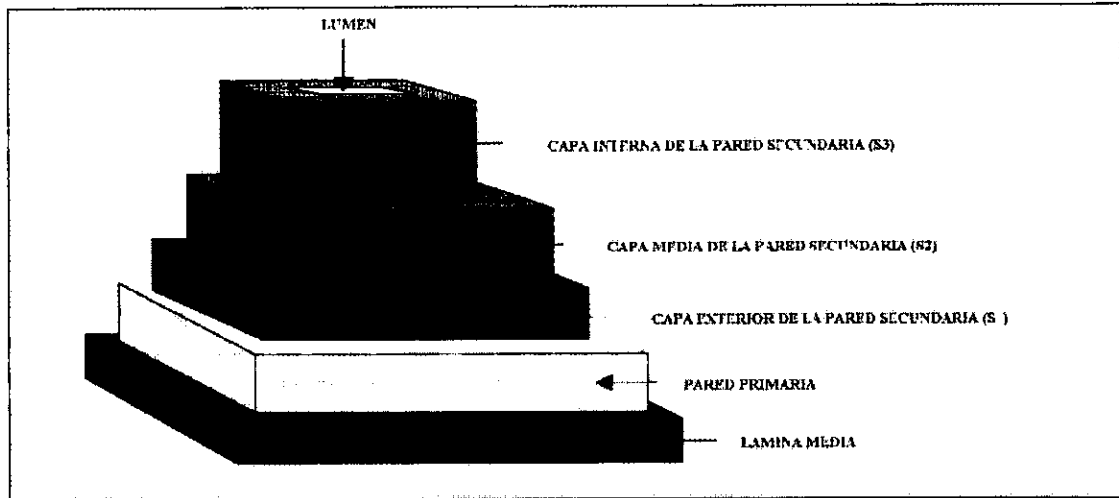
En el corte transversal de un tronco de madera se observan anillos de coloración clara y anillos de coloración oscura. La madera temprana (anillos de coloración clara) corresponde al crecimiento del árbol durante la primavera ó verano, la tardía (anillos de coloración oscura) se desarrolla en el invierno cuando el árbol presenta una disminución de sus actividades vitales. (Grattan, 1987).

El corte transversal de la madera observada al microscopio muestra una apretada materia fibrosa formada por las *traquéidas* que son estructuras alargadas con extremos redondeados así como orificios de forma cuadrada y/o poligonal, a modo de panal, que presentan variaciones en el espesor de la pared de las celdas dependiendo de su ubicación en la zona temprana ó tardía, como se muestra en la figura I. (Ribero, 1990)

Los dinteles prehispánicos de Tlatelolco fueron labrados en madera de coníferas (Mainou, 1993), por lo que sus traquéidas llegan a alcanzar un largo de hasta 7 mm y un diámetro que depende de la zona en que se encuentre, variando desde 25 a 80 μm en la zona temprana, en tanto que en la madera tardía se reducen hasta alcanzar un diámetro de 5 μm (Grattan, 1987).

FIGURA 1. Estructura física de la madera

Corte transversal de un tronco de madera y esquema de una vista microscópica.

**FIGURA 2: Modelo estructural de las células de la madera.**

Como primer paso de diferenciación de la célula de la madera, el protoplasma viviente produce una pared primaria (P) que puede incrementar su superficie a medida que la célula se desarrolla. La sustancia entre las paredes primarias de células adyacentes es llamada capa intercelular ó lámina media. Debido a que es difícil distinguir entre una y otra, se emplea el término "lámina media compuesta" para designar ambas estructuras (Fujita, 1991)

ii. Características químicas

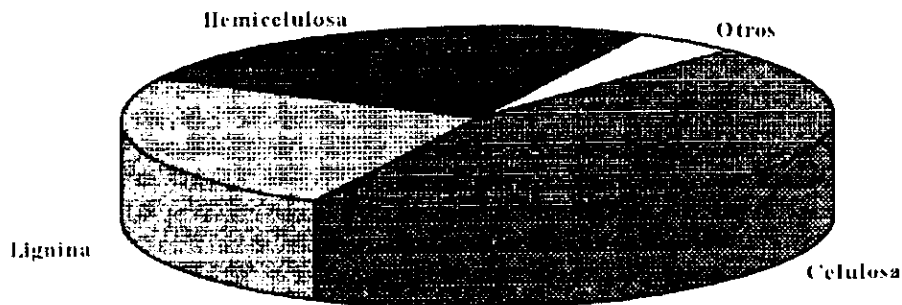
La apariencia y propiedades físicas de la madera fresca o arqueológica dependen en gran medida de la composición química del material. La madera puede ser considerada como una mezcla heterogénea compleja formada por grandes polímeros orgánicos. Los tipos de polímeros y su relativa abundancia dependen tanto de la microestructura celular de la madera como del tipo de árbol del cual proviene. Los tres principales constituyentes químicos de la madera son la celulosa, las hemicelulosas y las ligninas. Aunque la celulosa es un polisacárido simple bien definido, tanto las hemicelulosas como las ligninas incluyen una amplia variedad de tipos de polímeros individuales. La figura 2 ilustra el hecho de que la celulosa, las hemicelulosas y las ligninas juntas típicamente constituyen el 95 % o más del peso seco de la madera. Otras sustancias, tales como grasas, ceras, resinas y fenoles simples que pueden ser extraídos con solventes no polares, representan alrededor de 1% del material remanente. El resto se considera material inorgánico. (Hedges, 1990)

A continuación se describe la estructura química de cada uno de los principales componentes de la madera.

HEMICELULOSAS Y PECTINAS: Las hemicelulosas son el segundo polisacárido en abundancia en la madera y representa entre el 20 y el 30 % de la pared celular. Se distinguen de la celulosa por su solubilidad en álcalis y son denominadas así porque se cree que son intermediarios en la biosíntesis de la misma. La composición en hemicelulosas varía considerablemente de acuerdo a la especie de árbol y las estructuras de la madera. La principal hemicelulosa que se encuentra en maderas ligeras es una glucomanana que contribuye con el 10 - 15 % de la masa de la madera. Este polímero consiste en una cadena que contiene alrededor de una glucosa por cada cuatro unidades de manosa. Este también contiene pequeñas cantidades de galactosa, por lo que se le denomina (galacto)glucomanana. Por lo que corresponde a maderas pesadas, la principal hemicelulosa

es un glucuronoxilano que, dependiendo de la especie particular de angiosperma, constituye del 15 al 30 % de la madera. (Hedges, 1990)

FIGURA 3. Composición porcentual de la madera.



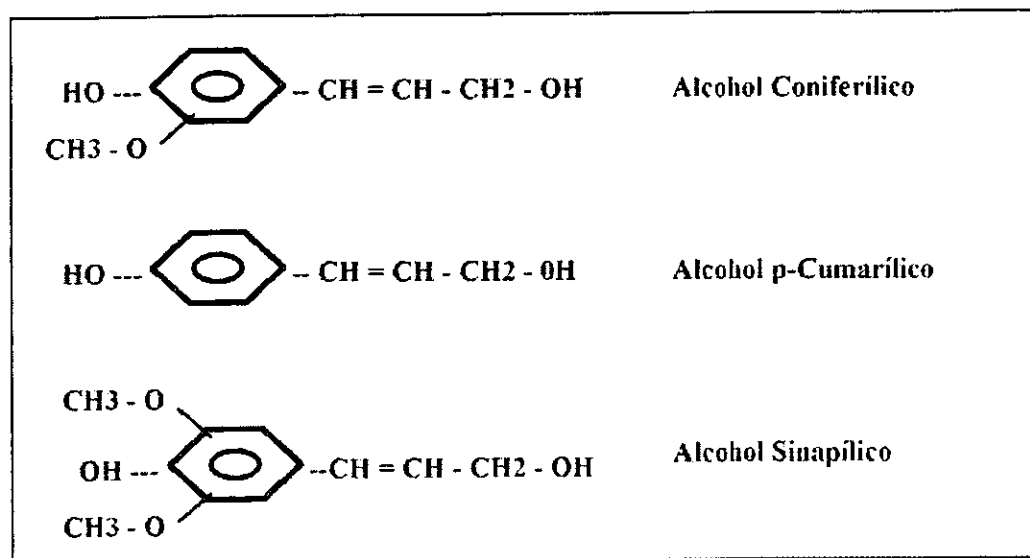
Las Pectinas son un conjunto de polisacáridos contenidos en menor cantidad (menos de 1%), pero funcionalmente importantes en la madera. Estas constituyen la pared celular durante los estados tempranos y consecuentemente son encontrados más tarde junto a la lamina media. (Hedges, 1990). Los compuestos pécticos son macromoléculas formadas por ácidos galacturónicos unidos por medio de enlaces glucosídicos α 1,4; estos constituyen la lámina media y además se encuentran asociados con la celulosa en la capa primaria de la pared celular. Las sustancias pécticas presentes en los vegetales se encuentran en tres formas: como ácidos pécticos, pectinas y protopectinas. Los ácidos pécticos están constituidos únicamente por ácidos galacturónicos formando una cadena lineal. En las pectinas los grupos carboxílicos del ácido galacturónico se encuentran parcialmente metilados. Las protopectinas son sustancias pécticas insolubles de composición variable; en ellas los grupos carboxilo libres de la pectina están conectados con iones metálicos divalentes como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} , ó también con ácido fosfórico. En las protopectinas la mayor parte de las cadenas se encuentran formando una red. Las protopectinas insolubles se

encuentran principalmente en la lámina media de la pared celular vegetal y se pueden convertir en sustancias pecticas solubles por acción enzimática. (Gallegos, 1981).

LIGNINAS. Son polímeros fenólicos entrelazados amorfos que se encuentran únicamente en plantas vasculares y constituyen del 20 al 30 % del peso en varias maderas. (Hedges, 1990)

La rigidez estructural de la madera se atribuye, en parte, a las contribuciones adicionales de la lignina (fenoles poliméricos, ver figura 4) y las hemicelulosas que conectan las cadenas de poliglucósidos mediante entrecruzamientos. (Pine, 1988)

FIGURA 4: Unidades Fenólicas de los polímeros de lignina.

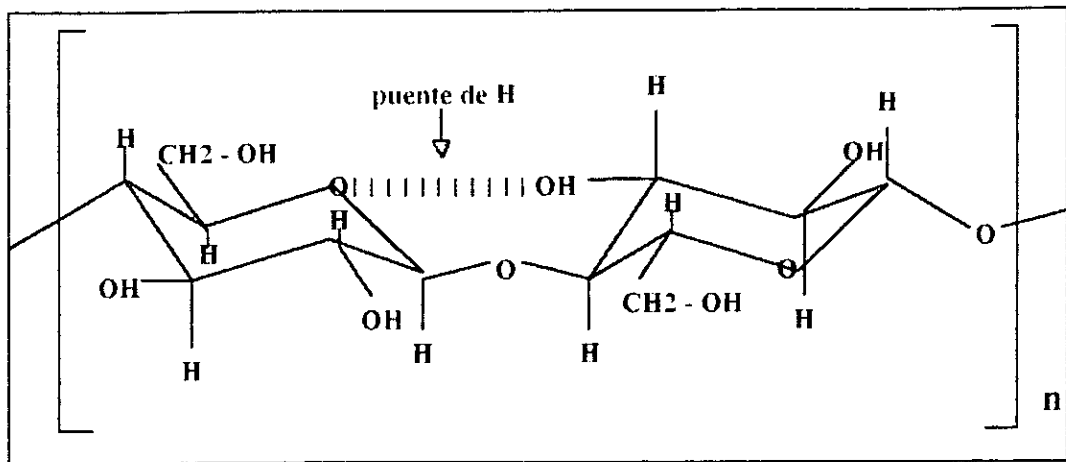


CELULOSA: La celulosa es el compuesto orgánico más abundante de la biosfera y contiene más de la mitad de todo el carbono orgánico que existe. (Stryer, 1994).

La madera consta de un 40 a 50 % de éste compuesto. La estructura de ésta es una secuencia lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces 1,4 - glucosídicos. La celulosa difiere de la amilosa del almidón en que todas las configuraciones glucosídicas son β (ver figura 5). (Pine, 1988). En consecuencia, cada residuo de glucosa está girado con una rotación de 180° respecto al residuo siguiente, de modo que el oxígeno del anillo piranósico

se une por un puente de Hidrógeno al grupo OH en el C₃ de la unidad siguiente. La cadena recta formada por uniones β es óptima para construir fibras con una elevada fuerza tensil, a diferencia de las hélices abiertas formadas por unidades α , como el caso del almidon o el glucógeno, que son adecuados para integrar almacenes de azúcares. (Stryer, 1994)

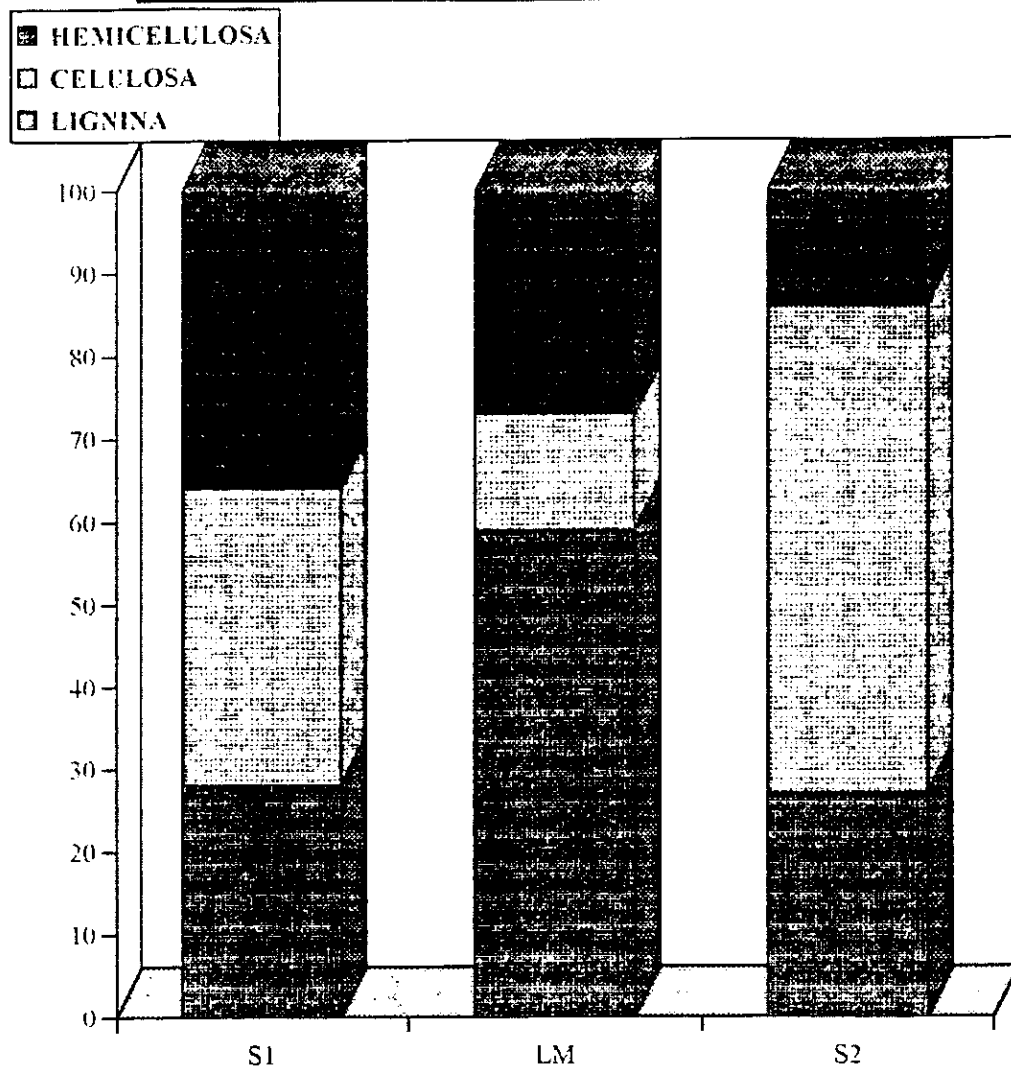
FIGURA 5. Estructura molecular de la celulosa.



El análisis por Rayos X ha confirmado que la celulosa existe en forma de largas cadenas paralelas que se mantienen unidas por enlaces de Hidrogeno. Los grupos de cadenas de celulosa, que se denominan fibrillas y poseen un diámetro aproximado de 20.000 picómetros, justifican el carácter fibroso de los materiales vegetales. (Pine, 1988).

Los tipos y abundancia relativas de la celulosa, la hemicelulosa y lignina varían de acuerdo a los tipos de células de la madera, si se encuentran en madera temprana o tardía (ver figura 1), y del género de árbol de que se trate. Esto se observa mejor en la figura 6. Estas diferencias en la distribución afectan la relativa resistencia de las estructuras a la degradación, de tal manera que los organismos celulolíticos atacan con mayor facilidad la pared primaria y la secundaria, no así la lámina media.

FIGURA 6: % de compuestos en función de la estructura.



% composición en función de la estructura

S1: Capa externa de la pared primaria

LM: Lámina media

S2: Capa media de la pared primaria.

C.- ALTERACIÓN DE LA MADERA HÚMEDA.**i. Fenómenos fisicoquímicos.**

Cuando la madera seca permanece mucho tiempo en contacto directo con agua ocurre un fenómeno fisicoquímico: El aire contenido en las traquéidas tiene una presión atmosférica determinada que debe ser vencida por una presión mayor. El agua tiene la capacidad de adherirse a las paredes de las celdas debido a que son hidrofílicas y absorben rápidamente la humedad. Al absorber el 30% de humedad con respecto al peso de la madera, se alcanza el punto de saturación de las fibras, es decir, la pared celular no puede admitir más agua, pero los lúmenes aún contienen aire. Cuando se rebasa el punto de saturación, el agua ocupa los lúmenes y se considera que la pieza está en el punto de anegación; como consecuencia, la madera tiende a oscurecerse y a desprender un olor característico. (Grattan, 1987)

En el punto de anegación prolongada, las zonas amorfas de la celulosa se disuelven, y posteriormente, las zonas cristalinas se vuelven amorfas, iniciándose un proceso que se autoreproduce cíclicamente y conduce a la destrucción de la pieza. Una vez hidrolizada la celulosa de la capa S2, la lámina media se disuelve perdiéndose la unión entre traquéidas, y por consiguiente se pierde la rigidez característica de la madera. El paso siguiente de éste proceso de alteración es el colapso de la estructura celular, que ocurre cuando la estructura cede ante la presión del agua contenida en los lúmenes, o cuando hay una evacuación violenta de agua. (Mainou, 1993).

Paralelamente tiene lugar una serie de transformaciones químicas sucesivas en la ultra estructura de la madera, es decir, ocurre el fenómeno de la hidrólisis o ruptura de las cadenas moleculares de los componentes básicos de la madera. Esta serie de transformaciones se inicia con la degradación de la hemicelulosa, continúa con la celulosa y, por último, pero excepcionalmente, termina con la disolución de la lignina de la madera (Mainou, 1993).

ii. Bioalteración de la madera

Hongos, bacterias e insectos pueden atacar la madera y usar los componentes de la pared celular o causar desintegración mecánica. La madera en ambientes naturales es colonizada rápidamente por microorganismos e insectos, iniciándose de esta manera el proceso de desintegración. Los polímeros estructurales son reducidos a moléculas simples y finalmente a CO₂ y agua. Esta forma natural de reciclar la materia orgánica es un importante proceso en los ecosistemas terrestres y acuáticos, pero representa un serio problema cuando los materiales de madera, especialmente los de valor histórico, se ven afectados. (Blanchette, 1990)

La biodegradación de la celulosa envuelve principalmente la despolimerización hidrolítica de ésta a compuestos de bajo peso molecular, hasta generar unidades monoméricas de glucosa por catálisis del sistema enzimático de celulasas de los organismos vivos. La mayor parte de la alteración de la celulosa y materiales lignocelulósicos de la madera son causados por microorganismos. (Shimada, 1991).

Los hongos colonizan la madera y degradan los componentes de la pared celular para producir la pudrición café, blanca o suave. Los hongos de la pudrición café degradan principalmente los polisacáridos de la madera, dejando restos de lignina. Los hongos de pudrición blanca pueden degradar todos los componentes de la pared celular. Los hongos de la pudrición suave erosionan la pared secundaria o forman cavidades discretas dentro de la pared celular. (Blanchette, 1990).

Este trabajo fue enfocado al estudio de las bacterias relacionadas con la alteración de los dinteles. Las características de bioalteración bacteriana se describen a continuación.

iii. Efecto bacteriano en la alteración de la madera.

El efecto mejor conocido de las bacterias sobre la madera es el incremento de la permeabilidad después de la anegación. Es poco frecuente la destrucción de la pared celular de la madera por parte de éstos microorganismos, pero ha sido recientemente demostrado

que las bacterias son capaces de degradar la estructura lignocelulósica de la madera. (Daniel,1986; Daniel,1987; Singh,1987).

Las bacterias pueden ser divididas en dos grupos: Bacterias que degradan sólo las membranas y Bacterias que atacan activamente la estructura lignocelulósica de la pared celular en la madera es decir, bacterias que degradan la madera (Blanchette,1990).

a) Bacterias que degradan las membranas.

Esta forma de ataque es conocida principalmente en maderas ligeras sumergidas en agua. La bacteria dirige su ataque a las membranas en las traquéidas. Esto se traduce en un incremento pronunciado en la porosidad, seguido de un marcado incremento de la absorción de fluidos.(Blanchette,1990)

b) Bacterias degradantes de la pared celular.

La clasificación de los tipos de deterioro está basado en la micromorfología del ataque. Mediante microscopía se han descrito tres tipos principales de ataque bacteriano: Erosión, Tuneleado y Cavitación (Blanchette,1990).

EROSIÓN: La degradación causada por la erosión es muy similar a la causada por los hongos de la pudrición blanca. Las bacterias crecen en el lumen de la célula de la madera e inician su ataque en la capa S3. (Greaves,1968).

La madera deteriorada por erosión, se torna muy oscura y muestra ruptura en las capas superficiales, efecto similar al producido por la pudrición café ó la pudrición suave. Este tipo de deterioro se traduce en severas pérdidas de la dureza (Paajanen,1988).

TUNELEADO: En éste caso, la bacteria penetra en la capa S2 donde ocurre la mayor parte de la degradación. La división celular bacteriana produce un incremento en el número de microorganismos, algunas de las cuales pueden iniciar un proceso de tuneleado en nuevas direcciones. Esta actividad genera un patrón de túneles unidos entre sí. (Blanchette,1990)

La madera que presenta ataque considerable por tuneado bacteriano se torna ligeramente descolorida, usualmente de un color café o amarillo claros. Sin embargo, en algunos casos un deterioro más extenso genera una consistencia butirácea ó granular. (Blanchette,1990).

CAVITACIÓN: Similar al fenómeno anterior, la cavitación es un proceso que se lleva a cabo dentro de la pared celular. Cavidades angulares de varios tamaños son generadas dentro de la capa S2 (Nilsson,1984). Al parecer son iniciadas por una o más bacterias que penetran en la pared celular para formar cavidades pequeñas. En contraste con los dos fenómenos anteriores, la cavitación no ha sido reproducida satisfactoriamente en el laboratorio. (Blanchette,1990).

Por lo que respecta a la cavitación, un buen ejemplo de ataque bacteriano de éste tipo se ha encontrado solamente en un número limitado de postes tratados en Nueva Zelanda (Nilsson,1984). No existen detalles reportados sobre la apariencia macroscópica y la influencia sobre la dureza en la madera (Blanchette, 1990).

Estudios sobre el ataque bacteriano en la madera, indican que los carbohidratos son preferencialmente degradados, y éste fenómeno resulta en una acumulación de la lignina. (Kim, 1987).

D.- CELULASAS.

Celulasa es el nombre común de las enzimas que hidrolizan los enlaces glucosídicos de la celulosa. Hay tres grupos de celulasas:

a) Una fracción conocida como C_1 , cuya acción todavía no esta bien definida; ésta enzima es absolutamente necesaria para la degradación de celulosa cristalina, como el algodón.

b) β -1,4 glucanasas, las cuales degradan celulosa modificada, como celulosa soluble (carboximetilcelulosa). Hay dos tipos, las endo- β -1,4 glucanasas cuya acción es similar a la α -amilasa, y las exo- β -1,4 glucanasas cuya acción es similar a la glucoamilasa.

c) Las β - glucosidasas actúan sobre oligosacáridos, particularmente celobiosa (Nickel,1988).

A pesar de la abundancia de los microorganismos que pueden utilizar la celulosa como fuente de carbono, sólo unos pocos producen las enzimas con suficiente actividad celulolítica para degradar celulosa organizada hasta azúcares solubles; otros, a pesar de crecer sobre celulosa producen filtrados con poca actividad lo que se debe a que no se encuentran presentes todos los componentes activos para degradar celulosa cristalina a glucosa (García,1983).

En lo que respecta al sistema enzimático completo, se puede considerar el siguiente mecanismo sobre la degradación enzimática de la celulosa (Pettersen,1975):

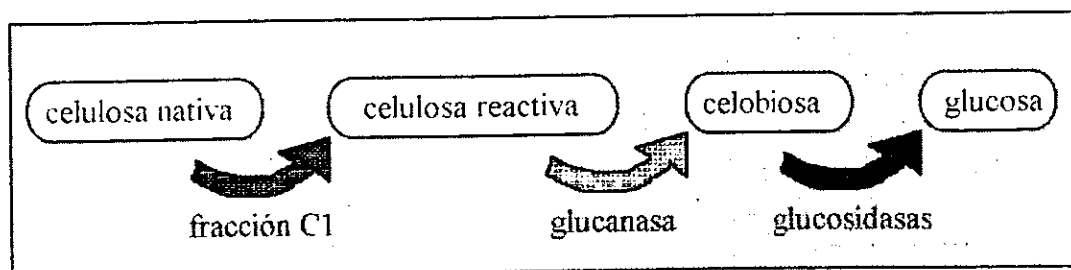
a) Las regiones de baja cristalinidad en la fibra de celulosa son atacadas por endoglucanasas y se forman cadenas terminales libres.

b) Las exoglucanasas principian la degradación de las cadenas terminales por la remoción hidrolítica de celobiosa.

c) La celobiosa es hidrolizada a glucosa por la acción de la β -glucosidasa.

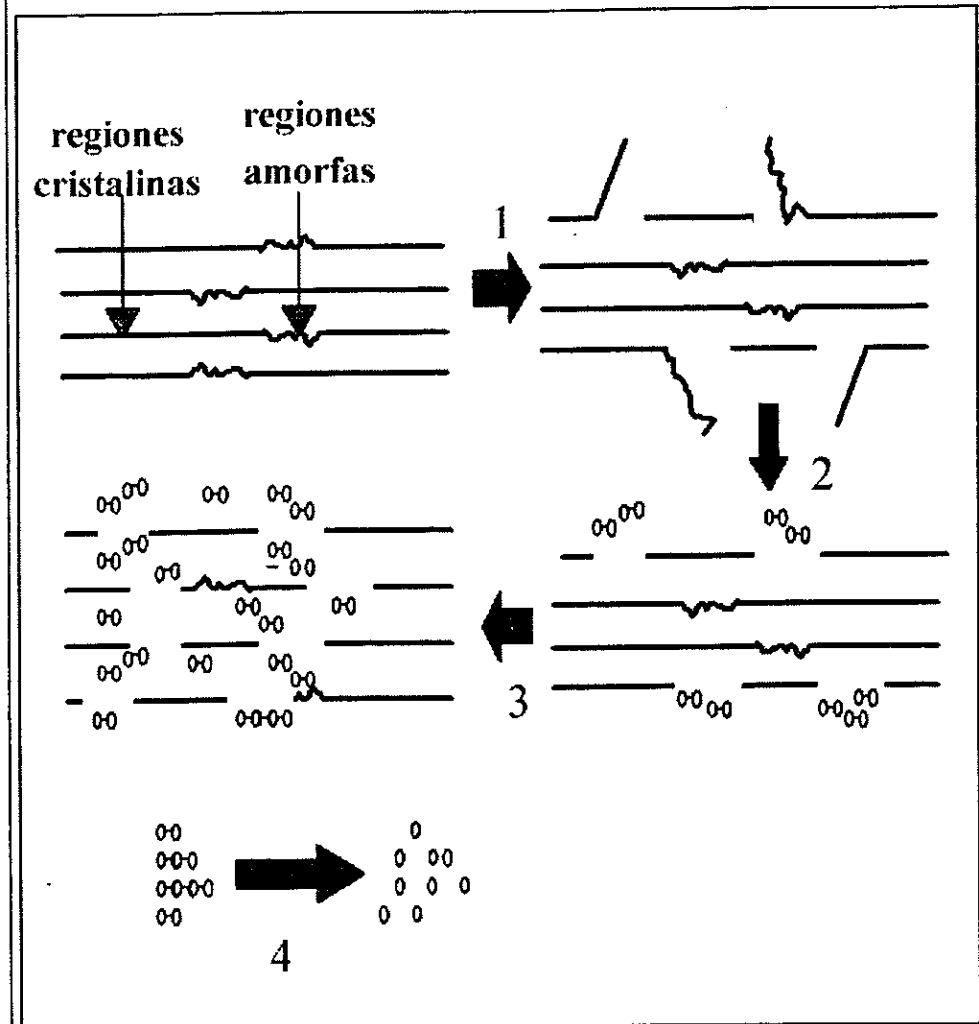
Las figuras 7 y 8 muestran la acción de las celulasas y el mecanismo de degradación de la celulosa. respectivamente.

FIGURA 7. Degradación enzimática de la celulosa.



Acción enzimática de las celulasas:

La fracción C1 de las celulasas es capaz de transformar la celulosa cristalina a celulosa amorfa reactiva, la cual es atacada por las glucanasas para dar oligosacáridos, sustratos para las glucosidasas

FIGURA 8. Acción de las celulasas

REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ACCIÓN DE LAS CELULASAS: Las endoglucanasas forman cadenas terminales libres (1), que a su vez son atacadas por las exoglucanasas, generando oligosacáridos tales como celobiosa (2). Un efecto sinérgico de ambas enzimas ocasiona que las fibras de la celulosa sean reducidas a oligosacáridos (3), sustratos para las β -glucosidasas que los degradan a glucosa (4)

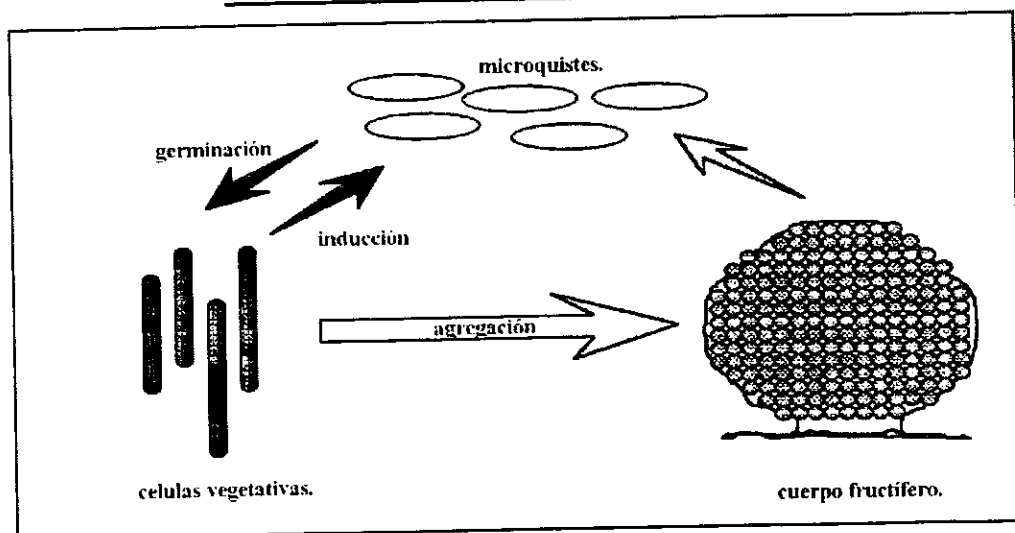
E.- BACTERIAS CELULOLITICAS.

i. Myxococcales.

El orden *Myxococcales* corresponde a bacterias Gram negativas deslizantes que forman cuerpos fructíferos y que se encuentran clasificadas en la sección 24 del Manual de Bergey (McCurdy, 1984). Se trata de bacilos unicelulares de menos de 1.5 μm de diámetro, que pueden ser flexibles y con extremos puntiagudos (células tipo I) ó cilindricos y más rígidos con extremos romos, redondeados (células tipo II). Son capaces de realizar un movimiento de deslizamiento lento cuando se encuentran en contacto con una superficie sólida ó una interface agua-aire (pero no en suspensión) a una velocidad de más de 10 μm /minuto pero carecen de organelos locomotores detectables. Estos organismos producen típicamente una cubierta extracelular de polisacáridos en la que las células se encuentran embebidas, ésta es depositada en el medio y a través de la misma se deslizan (McCurdy, 1984; Dworkin, 1993)

La única y principal característica visible a simple vista de las Myxobacterias, es su habilidad para formar cuerpos fructíferos bajo condiciones físicas y nutricionales adecuadas. (Dworkin, 1966; Dworkin, 1977; Dobson, 1979a). (Ver figura 9)

FIGURA 9: Ciclo de vida de Myxobacterias.



Las Myxobacterias son microorganismos quimiorganótrofos, estrictamente aerobios, la producción de energía es un proceso respiratorio, nunca fermentativo. Típicamente producen enzimas extracelulares que hidrolizan macromoléculas tales como proteínas, ácidos nucleicos, ésteres de ácidos grasos y varios polisacáridos, incluyendo celulosa. Son capaces de lisar otros microorganismos procariontes y eucariontes. Carecen de pigmento fotosintético, pero han sido detectados algunos pigmentos carotenoides. En consecuencia las colonias de myxobacterias son generalmente de colores brillantes. El mol% G + C del ADN se encuentra en el rango de 67 a 71 por ciento. En el siguiente cuadro se resumen las principales características de éste orden, según la clasificación del Manual de Bergey. (McCurdy, 1984)

TABLA I. CLASIFICACIÓN DE MYXOBACTERIAS.*

CARACTERÍSTICAS	CLASIFICACIÓN
I.- Células vegetativas productoras de microquistes:	
a) Microquistes esféricos ú ovales	Familia I. <i>Myxococcaceae</i>
b) Microquistes en forma de bacilo	
1.- Sin esporangio	Familia II. <i>Archangiaceae</i>
2.- En esporangio	Familia III. <i>Cystobacteraceae</i>
II.- Células vegetativas de diámetro uniforme, con extremos redondos.	Familia IV. <i>Polyangiaceae</i>

* (FUENTE: MANUAL DE BERGEY)

Dentro de los *Myxococcales*, la familia que contiene géneros celulolíticos es *Polyangiaceae*, en particular el género *Polyangium*, especie *cellulosum*, que tiene capacidad de atacar la madera. (Peterson, 1969)

Polyangium cellulosum es un bacilo celulolítico de 0.8-1.2 por 3.0-10.0 micras que forma esporangios de entre 20 y 30 micras de diámetro. El color varía de amarillo pálido a diferentes tonos de rosa, naranja, rojo y café con reflejos de gris a negro. Las mixosporas son similares a las células vegetativas y de 1.0 a 3.0 micras de largo. El crecimiento sobre papel filtro en medio mineral es lento, apareciendo en un periodo de 3 a 14 días. El rango de temperatura de crecimiento es de 20 a 37 °C, aunque el rango óptimo es de 28 a 32 °C. El microorganismo se aisló por primera vez de suelos polacos y rusos pero ha sido encontrado en suelos de Norteamérica y Europa. Ha sido asociado a suelos de cultivo así como en zonas áridas y semiáridas de Estados Unidos y México (Brockman, 1976). El mol % G + C del ADN es 69 (Bd) (McCurdy, 1984).

ii. Cytophagales.

El orden *Cytophagales* corresponde a la sección 23 del Manual de Bergey donde se clasifican las bacterias deslizantes no fotosintéticas que no forman cuerpo fructífero. Esta sección corresponde a microorganismos Gram negativos morfológicamente diversos que incluyen cocos, bacilos y espiroquetas sencillos o filamentos que al igual que los *Myxobacterales* presentan deslizamiento sin haberseles identificado organelos de locomoción. (Larkin, 1984).

En el caso particular de los *Cytophagales* se trata de células en forma de bacilos que crecen sin agrupación y de tamaño de menos de 10 a más de 100 µm que pueden formar filamentos. Estos microorganismos raramente son multicelulares. Presentan movilidad por deslizamiento o pueden ser inmóviles. Las colonias son usualmente amarillas, naranjas ó hasta rojas debido a la producción de pigmentos no difusibles. En presencia de sulfuros,

éstos microorganismos no depositan azufre. El mol% de G + C del ADN se encuentra en el rango de 30 a 66 (Bd, Tm) (Larkin, 1984).

En éste Orden se encuentra la familia *Cytophagaceae*. Los microorganismos que pertenecen a ésta familia son capaces de degradar la celulosa. Son células en forma de bacilos, quimiorganótrofos, aerobios, facultativos y anaerobios obligados. Las quinonas respiratorias son exclusivamente menaquinonas (Kleinig, 1977). El patrón de ácidos grasos es dominado por 2- y 3-hidroxiácidos. Los representantes típicos de ésta familia son los bacilos aerobios estrictos, no fermentativos, Gram negativos de colonias amarillas. Probablemente todas degradan algunos tipos de biomacromoléculas tales como gelatina, almidón, celulosa, pectina, agar y quitina; son de vida libre y de hábitats marinos y terrestres. El mol% de G + C del ADN varía de 30 a 40.

Estas bacterias pueden ser pleomórficas en cultivos simples. Se deslizan pero pueden existir estados no móviles. Aunque son pigmentadas, a menudo varía el color de las colonias de amarillo, raramente rosas o rojas; sin embargo, debido a los pigmentos unidos a la célula, a menudo muestran un cambio de color de amarillo a rojo, café ó púrpura cuando las colonias son sumergidas en una solución de álcali, generalmente KOH, ésto debido a pigmentos del tipo flexirrubina. Son muy frecuentes en suelo, agua dulce, plantas de tratamiento de agua y hábitats costeros. Algunas son patógenas para los peces; otras se han especificado como alergénicas para el hombre; otras especies viven en la cavidad bucal y en ocasiones pueden invadir el cuerpo y transformarse en patógenas para el hombre (Larkin, 1984).

La familia *Cytophagaceae* está formada por varios géneros, dos de los cuales son de interés para éste trabajo debido a que algunas de sus especies tienen capacidad de degradar celulosa. Tal es el caso de los géneros *Cytophaga* y *Sporocytophaga*.

En el género *Cytophaga* no se distinguen células latentes morfológicamente diferenciadas; son bacilos de menos de 15 micras de longitud, estrictamente aerobios, rara

vez anaerobios facultativos; especies de vida libre en hábitats marinos y terrestres y que pueden colonizar peces; tienen la capacidad de lisar células de eucariontes y/o procariontes (*cytos* – del griego célula; *phagos* – del griego devorar).

Por otro lado, el género *Sporocytophaga* corresponde a bacilos degradadores de celulosa que generan microquistes diferenciados; la celulosa, la celobiosa y la glucosa, así como en ocasiones la manosa, son las únicas fuentes conocidas de carbono y energía para estos microorganismos; catalasa positivos, aerobios estrictos; su temperatura óptima de crecimiento es de 30 ° C; el mol % de G + C es de 36 (Larkin, 1984).

Las especies reportadas como celulolíticas en estas familias son :

1.- FAMILIA *Cytophagaceae* :

C. hutchinsonii

C. aurantiaca

2.- FAMILIA *Sporocytophagaceae* :

S. myxococcoides

Sin embargo, la capacidad celulolítica no se ha determinado en las siguientes especies:

C. salmonicolor

C. agarovorans

S. cauliformis

S. congregata

S. ellipsospora

S. ochracea

iii. Otros microorganismos celulolíticos

Las bacterias y los hongos son los dos principales grupos de microorganismos que degradan la celulosa, aún cuando existen algunas especies de algas como *Tolypothrix*

byssoidea, que también pueden hacerlo. Dentro de las bacterias que se consideran como celulolíticas se pueden mencionar: *Cellulomonas sp.*, *Bacteroides succinogenes*, *Butyvirbio fibrisolvens*. (García,1983)

La digestión de materiales celulósicos es una importante función de microorganismos que habitan el tracto de herbívoros, especialmente de los rumiantes. En él se encuentran principalmente bacterias del género *Cellvibrio* y *Ruminococcus*. (Hungate, 1966).

Algunos estudios sugieren que los Actinomicetos, los cuales frecuentemente son encontrados colonizando la madera, tienen la habilidad de atacarla. (Safo-Samph,1988). Tal es el caso de *Streptomyces antibioticus*, *Thermomonospora fusca*, y *Streptomyces thermodiastaticus* (García,1983)

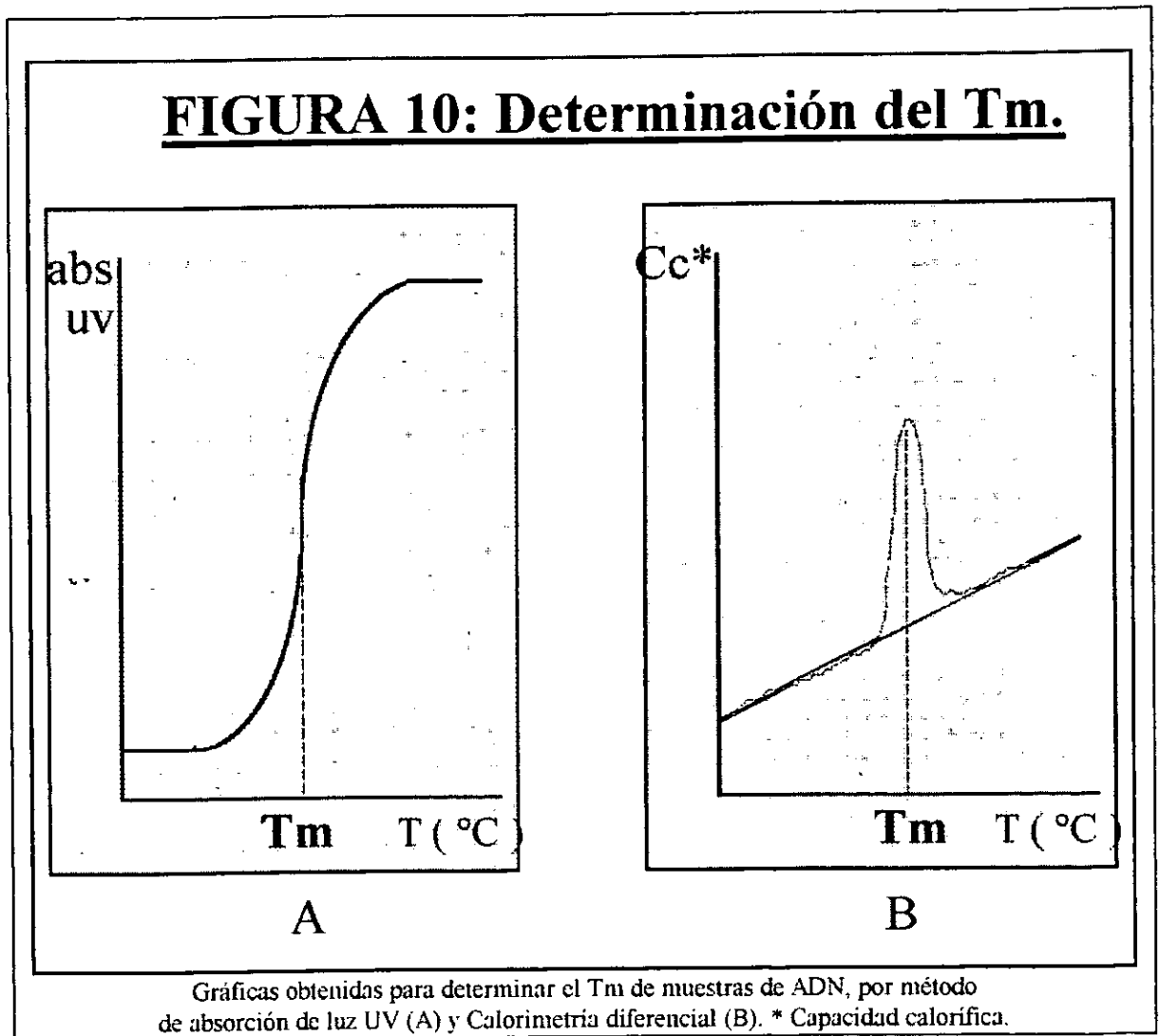
Por otro lado, algunas especies de los géneros *Clostridium* (tal es el caso de *C. thermocellum* y *C. thermohydrosulfuricum*) [Ng,1981], y *Pseudomonas* (como *Ps. fluorescens* var *cellulosa*) [Yamane,1970], también se han reportado como bacterias celulolíticas

F.- DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE BASES DEL ADN.

Soluciones neutras de ADN sometidas a calentamiento presentan cambios en algunas de sus propiedades tales como viscosidad, coeficiente de extinción y rotación óptica dentro de un rango pequeño de temperatura (Doty,1957; Chargaff, 1955). Estos cambios reflejan una transición en la configuración de la doble hélice y puede ser caracterizado por la temperatura al punto medio de ésta transición, simbolizado por *Tm* (Marmur,1959). Por otro lado, Mandel (1970) correlaciona la composición de los ácidos nucleicos bacterianos con su temperatura de fusión.

Uno de los métodos más convenientes para seguir ésta transición es la medición de la absorción ultravioleta como una función de la temperatura, como se observa en la figura 10A (Neumann,1969). Los estudios calorimétricos han dado una idea general de la magnitud

de las energías involucradas en el mantenimiento de los biopolímeros (Ross,1971). Por ejemplo, se ha usado la calorimetría diferencial de barrido con el fin de determinar el T_m en muestras de ADN obteniéndose al graficar la energía absorbida en función de la temperatura [figura 10B] (Neuman,1969; Marky,1982). Ross (1971) reporta la metodología para realizar el estudio de calorimetría de ácidos nucleicos, obteniéndose gráficas como la mostrada en la figura 10, que reciben el nombre de *termogramas*.



G.- IMPORTANCIA DE LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN LA IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE BACTERIAS DESLIZANTES.

La identificación de bacterias deslizantes se basa en pruebas fisiológicas y bioquímicas. Sin embargo, existen algunas investigaciones para realizar éste proceso por métodos inmunológicos (Grilione,1968) y, por otro lado, se han reportado estudios de proteínas membranales, así como menaquinonas y espectros de ácidos grasos, con fines de diferenciación. (Callies, 1978; Rosenfelder,1974)

Aunado a esto, la separación de las familias de los Myxobacterales y el resto de las bacterias deslizantes en la octava edición del Manual de Bergey se basa en el hecho de que sólo las primeras tienen capacidad de formar cuerpos fructíferos, así como en la composición de bases en los ácidos nucleicos de ambos grupos de bacterias, de acuerdo a las observaciones de Marmur (1963) y Mandel (1965).

CAPITULO III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La presencia de una capa mucoide y estructuras similares a cuerpos fructíferos en unos dinteles localizados en una excavación en Tlatelolco, D.F., dio pie a la sospecha de la presencia de bacterias deslizantes, lo cual se confirmó mediante los estudios realizados en colaboración con la Coordinación Nacional de Restauración del Patrimonio Cultural del INAH y el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM (Mainou,1993)

Ante tal situación se consideró importante estudiar algunas características bioquímicas y fisiológicas de esas bacterias involucradas en la bioalteración y el daño consecuente de piezas de gran valor histórico y cultural como son los dinteles de Tlatelolco.

CAPITULO IV. METODOLOGÍA

A.- HIPÓTESIS.

Las bacterias deslizantes son responsables del biodeterioro de las piezas arqueológicas de madera.

B.- OBJETIVOS.

- a) Aislar e identificar las bacterias involucradas en el deterioro de los dinteles Prehispánicos de Tlatelolco.
- b) Estandarizar el método de calorimetría térmica diferencial para el estudio de la composición de bases en el ADN de éstos microorganismos.
- c) Probar el efecto de sustancias bactericidas sobre las bacterias aisladas.

C.- FASE EXPERIMENTAL .

i. Muestreo de la madera .

Las muestras usadas en éste estudio fueron, tanto trozos de madera que se desprendían de los dinteles por si mismas durante el tiempo que estuvieron sumergidas en la solución del biocida, así como la solución misma en que estaban sumergidas las piezas.

Las muestras de madera fueron tomadas con pinzas de disección y transportadas al laboratorio en bolsas estériles dentro de las cuales se colocaron los trozos de madera con un poco de la solución biocida contenida en la tina de inmersión correspondiente al mismo dintel.

Por otro lado, las muestras de solución en la que estaban sumergidos los dinteles, fueron tomadas de la superficie del líquido en tubos de ensayo de 13 por 100 mm, estériles.

ii. Aislamiento de Myxobacterias y Cytophagas .

Las muestras de madera de cada dintel se sembraron en medio CYT agar (ver anexo II) incubando por un tiempo de 72 horas a temperatura ambiente, al término del cual se identificaron aquellas colonias que presentaban "swarming". Este medio es diferencial para bacterias deslizantes. (Reinchenbach, 1981).

Posteriormente, las cepas que presentaron "swarming" fueron resembradas en medio VY/2 agar (ver anexo II), incubando a 30 °C durante 72 horas. El medio VY/2 agar funciona también como medio de conservación de las cepas y fomenta, además, la formación de cuerpos fructíferos en Myxobacterias (Reinchenbach, 1981).

Por último, las colonias se resembraron en medio STAN 4 agar en cuya superficie se colocó una capa de papel filtro Whatman #1 (ver anexo II), incubando por un período de 5 a 6 días a temperatura ambiente, con el fin de identificar las cepas celulolíticas, así como aquellas que eran capaces de formar cuerpos fructíferos (Mc Curdy, 1969).

Las colonias obtenidas fueron resembradas por aislamiento en medio CYT agar con el fin de mantenerlas viables (Reinchenbach, 1981).

iii. Identificación de Microorganismos.

a) Morfología colonial:

Las características generales estudiadas fueron: forma de la colonia y del borde, aspecto, color, olor y consistencia (Konnenamn, 1989).

Por otro lado, se estudió la presencia de "swarming" y la formación de cuerpos fructíferos como características macromorfológicas específicas propias de éstos microorganismos (McCurdy, 1967; Reinchenbach, 1981)

b) Características microscópicas:

Las características micromorfológicas estudiadas fueron: forma, reacción a la tinción de Gram, formación de esporas ó quistes, pleomorficidad y tamaño (McCurdy, 1969).

c) Pruebas Bioquímicas:

Las pruebas bioquímicas realizadas fueron, en primer lugar, aquellas sugeridas por McCurdy (1969). Estas son: reacción de la flexirrubina, absorción de rojo congo, catalasa, degradación de macromoléculas (agar, almidón [medio AMB], gelatina, pectina y quitina), producción de H₂S, y sensibilidad a antibióticos.

Por otro lado, se realizaron algunas de las pruebas sugeridas en el Manual de Bergey (Larkin, 1984; McCurdy, 1984), tales como: fuente de carbono, fermentación de carbohidratos, concentración máxima de NaCl tolerada, utilización de citrato, presencia de lecitinasa, hemólisis de glóbulos rojos de carnero.

Se realizaron algunas pruebas adicionales con el fin de identificar el comportamiento de éstos microorganismos frente a tales pruebas. Estas fueron: producción de fluoresceína y prueba de oxidación y fermentación.

iv. Determinación de la composición de bases del ADN.

El aislamiento de los ácidos nucleicos se realizó por el método reportado por Maldonado (1995). Este consiste en una lisis de la pared celular con lisozima en pH alcalino (solución I), seguida de choque osmótico con solución alcalina de dodecilsulfato de sodio (solución II), precipitación de proteínas con solución amortiguadora de acetato (solución III) y purificación con una mezcla de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). Es importante equilibrar el fenol para evitar que el ADN se incorpore en la fase orgánica durante su purificación (Maldonado,1995). El ADN es identificado con el reactivo de la difenilamina (Seibert,1957). La preparación de soluciones y el método para equilibrar el fenol se reportan en el anexo III.

La técnica se detalla a continuación:

1.-Realizar dos transferencias de 24 horas del microorganismo en cuestión en medio 2xYT. Preparar un cultivo de toda la noche en 6.0 ml de medio 2xYT e incubar a 37 °C con agitación.

2.- Centrifugar el cultivo a 10000 rpm por 2 minutos.

3.- Resuspender el sedimento bacteriano en 200 µl de solución I previamente enfriada, en tubo Eppendorf y dejar reposar 3 minutos en hielo.

3.- Adicionar 400 µl de solución II y mezclar.

4.- Agregar 300 µl de solución III previamente enfriada a 4°C. Cerrar el tubo y mezclar con el vortex suavemente, para dispersar la solución III a través del lisado bacteriano. Incubar el tubo a 4°C por 5 minutos

5.- Centrifugar y transferir el sobrenadante a un tubo limpio.

6.- Agregar 1 volumen de fenol:cloroformo. Mezclar con el vortex. Centrifugar 3 minutos. Recuperar la fase acuosa y transferirla a un tubo limpio.

7.- Precipitar el ADN agregando 0.1 volumen de acetato de sodio 1M y 2 volúmenes de etanol absoluto previamente enfriado a -20°C. Mezclar con el vortex. Centrifugar a

10000 rpm por 5 minutos. Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 2.5 volúmenes de etanol al 70 %. Eliminar el etanol e invertir el tubo sobre una toalla de papel. Permitir que el etanol se evapore a temperatura ambiente durante 10 minutos.

8.- Resuspender el ADN en 20 μ l de TE a pH 7.6

9.- La identificación se realizó haciendo reaccionar 10 μ l de la solución de ADN con 2 mililitros de reactivo de difenilamina. (Seibert, 1957).

En los estudios de calorimetría del biopolímero ADN, se requiere una velocidad de calentamiento lenta (menos de 0.05 $^{\circ}$ C/min) para mantener el sistema en condiciones de equilibrio (Cheng, 1989). Sin embargo, considerando que la temperatura debe subir un total de 120 $^{\circ}$ C, el tiempo requerido para el proceso de una muestra es de alrededor de 40 horas. En consecuencia, y puesto que se han estudiado velocidades de calentamiento más altas (0.98 $^{\circ}$ C/min) (Marky, 1982), se realizó un estudio previo para determinar la velocidad más adecuada que proporcione resultados confiables.

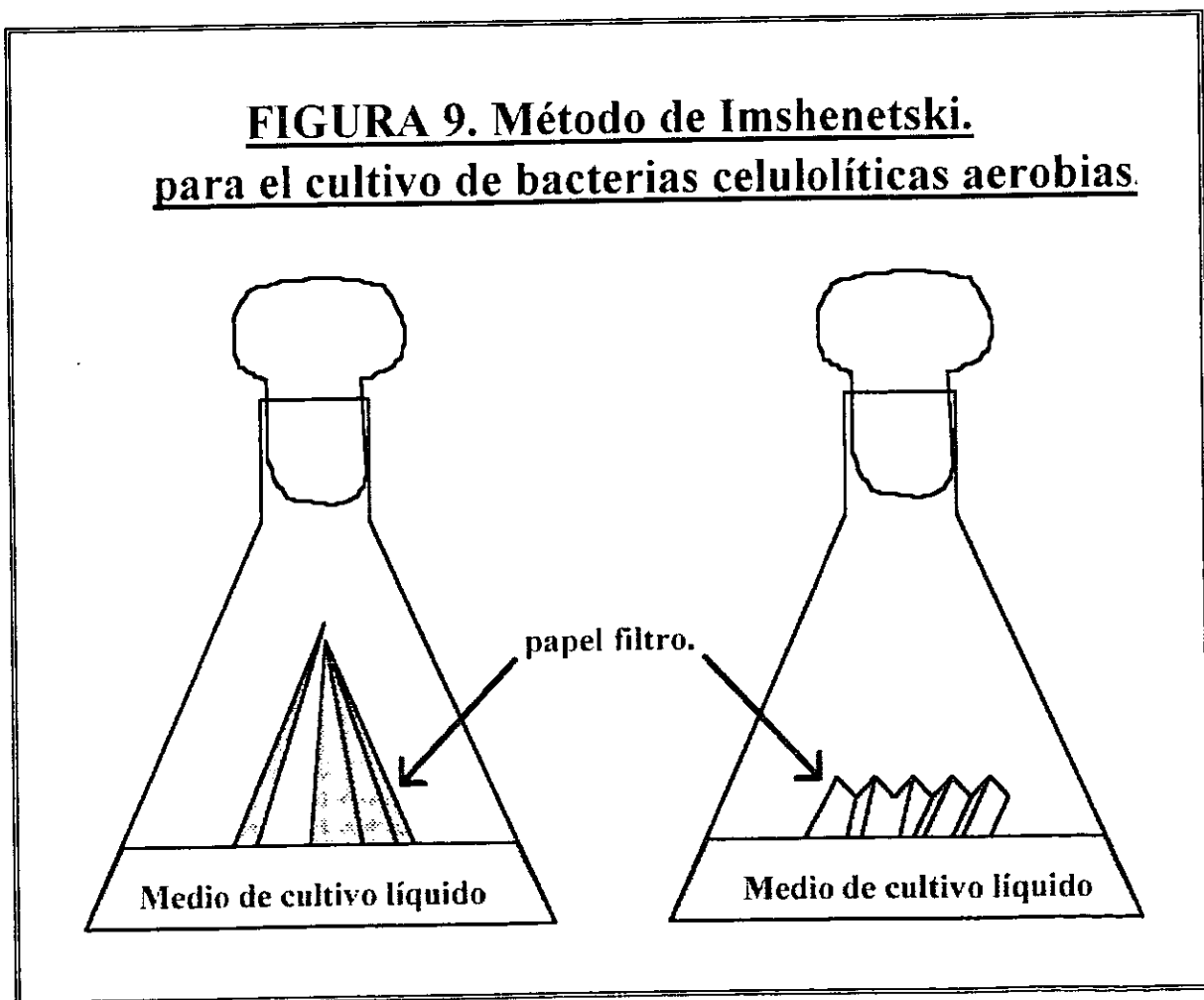
El equipo usado para determinar el porcentaje de G+C fue un Calorímetro Diferencial de Barrido General V4.1C DuPont 2000, a panel cerrado con una velocidad de calentamiento de 0.2 $^{\circ}$ C/min corriendo las muestras desde 20 hasta 140 $^{\circ}$ C; la impresora del equipo graficó los valores de energía absorbida en función de la temperatura, obteniéndose los termogramas de donde se determinó el T_m ó punto de fusión. La correlación del punto de fusión con el porcentaje de G+C se realizó con la fórmula siguiente reportada por Mandel (1970):

$$\% G + C = \frac{T_m - 69.3}{0.41}$$

v. Reto microbiano.

Se realizaron diluciones del bactericida hasta llegar a una concentración 1:20000. que es la concentración que se sugirió para su uso. Se sembraron las cepas en matraces Erlenmeyer con 50 ml de medio Stan 4 y Stan 5 (Ver anexo II) con papel filtro, de acuerdo al método reportado por Imshenetski (1953), incubando por agitación durante 5 días a 200 rpm y temperatura de 30°C. La figura 9 representa el sistema recomendado por Imshenetski (1953), en el que se puede observar cómo el papel filtro queda parcialmente sumergido en el medio de cultivo. El medio de cultivo líquido asciende por capilaridad a través del papel. Si éste sistema se incuba con agitación, la oxigenación favorece el crecimiento de bacterias celulolíticas aerobias.

FIGURA 9. Método de Imshenetski.
para el cultivo de bacterias celulolíticas aerobias.



CAPITULO V. RESULTADOS

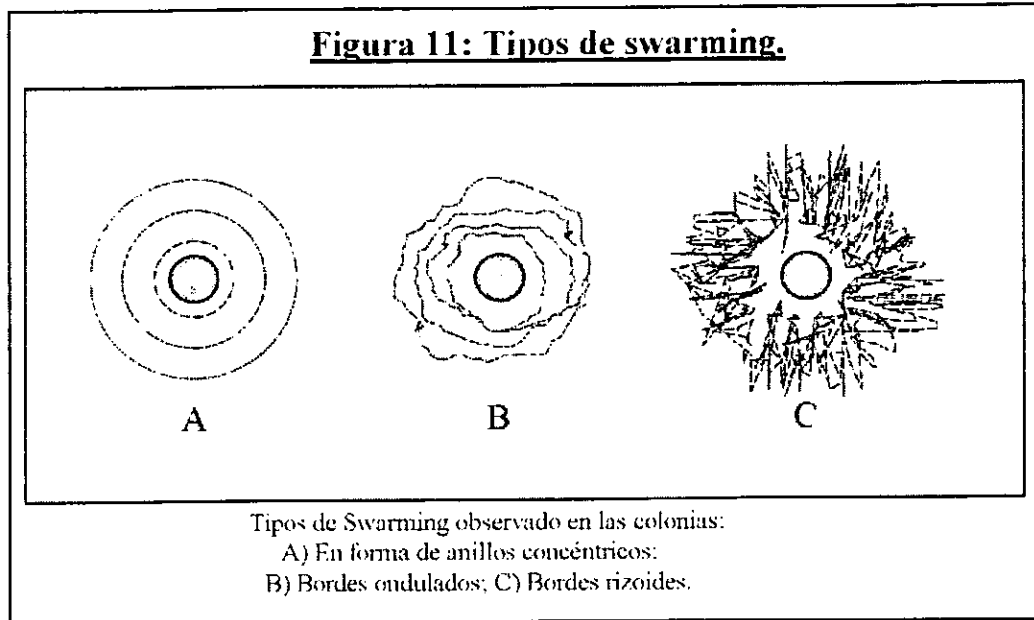
A.- CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS.

Las muestras tomadas presentaban una coloración parda oscura, de consistencia frágil y blanda que podían partirse fácilmente con la espátula, sobre todo a lo largo de la veta de la madera. El líquido en el que estaban sumergidos los dinteles mostraba en su superficie una capa blanca, delgada y translúcida en la cual se observaban estructuras redondas blancas opacas y pequeñas de 1 a 2 mm de diámetro. Además el líquido contenía gran cantidad de partículas cafés en suspensión, las cuales al microscopio se observaron como partículas amorfas sobre las que había abundante crecimiento bacteriano.

B.- AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.

Para aislar a los microorganismos, las muestras se inocularon inicialmente en Medio CYT agar. Alrededor de ellas, se formaron colonias bacterianas de pigmentos amarillo y naranja no difusibles y colonias no pigmentadas, las cuales se extendían a lo largo de toda la superficie del medio de cultivo. La mayoría de las colonias presentaron *swarming* que variaba desde anillos concéntricos alrededor de la colonia, bordes ondulados y hasta rizoides, según se observa en la figura 11. No se observaron cuerpos fructíferos.

El líquido en que estaban sumergidos los dinteles, una vez inoculado en el medio CYT agar, dio lugar a colonias bacterianas muy similares a las descritas anteriormente, pero su crecimiento fue más abundante, especialmente sobre las partículas en suspensión y en sus alrededores.



Al resembrar en VY/2 agar, se desarrollaron colonias que mostraron la misma coloración, presentaron *swarming*, aunque menos abundante que el obtenido en el medio anterior, y un halo más claro que el medio de cultivo que se hizo evidente por un cambio de coloración del medio de un café claro a un amarillo casi transparente.

En el medio Stan 4 agar las colonias eran más pequeñas y el papel filtro se tornó translúcido en torno de las colonias. El crecimiento bacteriano en este medio fue más lento, y resultó evidente después de 5 días de incubación a temperatura ambiente.

Se aislaron 56 cepas de las cuales se seleccionaron 9, las más representativas, éstas se sometieron a posteriores estudios. Para su selección, se consideró la presencia de *swarming* y/o formación de cuerpos fructíferos, así como la reacción al Gram y su acción celulolítica, pero para las cepas 1 y 6 sólo se consideró su fuerte acción celulolítica.

C.- IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS.

La tabla 2 muestra las características macro y micromorfológicas de las cepas estudiadas, y la tabla 3 resume los resultados de las pruebas bioquímicas.

La cepa 1 es un bacilo aerobio Gram positivo y esporulado, catalasa positivo, sin agrupación. Al revisar el Manual de Bergey (Claus, 1984), las características que presenta éste bacilo corresponden a la familia Bacillaceae.

La cepa 2 presenta características de bacilo celulolítico Gram negativo aerobio, oxidasa y catalasa positivo, que produce fluoresceína además de un pigmento difusible verdoso y que utiliza todas las fuentes de carbono probadas, y degrada la pectina. Estas características son típicas del género *Pseudomonas* (Palleroni, 1984).

La cepa Ec4 corresponde a un bacilo celulolítico aerobio Gram negativo no esporulado, sin agrupación, que presenta colonias no pigmentadas pero con deslizamiento abundante en forma de anillos concéntricos, lo cual sugiere fuertemente una bacteria deslizante de la familia Cytophagaceae (Larkin, 1984).

La cepa 5 corresponde a un bacilo celulolítico, aerobio, Gram negativo de 2 a 3 μm de largo sin agrupación, no esporulado, que produce pigmento amarillo no difusible y con deslizamiento abundante en forma de olas. Estas características también sugieren una bacteria deslizante (Reichenbach, 1981).

Por lo que corresponde a la cepa 6, las características de cocos aerobios celulolíticos Gram negativos en tetradas o pares, de 3 a 4 μm de diámetro e inmóviles, catalasa positivo, que forman colonias amarillas de pigmento no difusible, son propias del género *Azotobacter* (Tchan, 1984).

La cepa 13 corresponde a un bacilo celulolítico aerobio, oxidasa positivo, que produce colonias no pigmentadas y que utiliza todas las fuentes de carbono probadas además de ser sensible a ampicilina, antibiótico que ataca bacterias Gram negativas. Estas características sugieren una bacteria como *Pseudomonas aeruginosa* (Burdon, 1971).

TABLA 2. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE LAS CEPAS ESTUDIADAS.

CEPA	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS.
1	Colonias lisas, redondas y brillantes, de 0.5 a 1 mm de diámetro, elevadas con pigmento naranja no difusible. No presentan swarming; borde liso.	Bacilos Gram (+), esporulados. esporas redondas subterminales, de 4 μ m de largo. sin agrupación. Aerobios.
2	Colonias amarillo claro, redondas, de 2 a 3 mm de diámetro, elevadas, pigmento difusible verdoso, bordes lisos. No presentan swarming.	Bacilos Gram (-), de 3 a 4 μ m de largo. sin agrupación.
Ec4	Colonias lisas, redondas, brillantes, translúcidas, no pigmentadas, de 2 a 3 mm de diámetro, elevadas. Presentan swarming de 1 a 2 mm de ancho en forma de anillos concéntricos.	Bacilos Gram (-), de 4 μ m de largo, no esporulados, sin agrupación
5	Colonias lisas, redondas, brillantes, de 2 a 3 mm de diámetro, elevadas, con pigmento amarillo claro no difusible. Swarming abundante de 4 a 5 mm de ancho en forma de olas.	Bacilos Gram (-), de 2 a 3 μ m de largo sin agrupación. No esporulados. Aerobios
6	Colonias redondas, lisas, brillantes, de 3 a 4 mm de diámetro. de aspecto butiráceo. elevadas con pigmento amarillo no difusible. Bordes lisos. no presentan swarming.	Cocos Gram (-), en pares o tetradas. de 3 a 4 μ m de diámetro. Aerobios.
13	Colonias lisas, brillantes, redondas, planas, translúcidas, no pigmentadas. swarming de 1 a 2 mm de ancho en forma de anillos concéntricos.	Bacilos Gram (-) de 2 a 3 μ m de largo sin agrupación.
A2	Colonias lisas, redondas y brillantes de 1 a 2 mm de diámetro, elevadas con pigmento amarillo no difusible. Presentan swarming de hasta 2 mm de ancho, en forma de anillos concéntricos.	Bacilos pleomorfos Gram (-), sin agrupación, de 0.8 a 1.6 μ m de largo por 0.5 a 0.7 μ m de ancho.
C1	Colonias lisas, redondas, brillantes, de 2 a 3 mm de diámetro, elevadas, con pigmento amarillo claro no difusible. swarming de 3 a 4 mm de ancho en forma de anillos concéntricos.	Bacilos Gram (-), de 2 a 3 μ m de largo sin agrupación. Aerobios
A4	Colonias lisas, redondas, brillantes, de 2 a 3 mm de diámetro, no pigmentadas. elevadas, translúcidas. Presentan swarming de 1 a 2 mm de ancho en forma de anillos concéntricos.	Bacilos pleomorfos Gram (-), de 0.8 a 1.6 μ m de largo por 0.3 a 0.5 μ m de ancho. Aerobios.

Medio de cultivo empleado: CYT agar, 48 hrs / 37 °C.

TABLA 3. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

	1	2	Ec4	5	6	13	A2	C1	A4
CITRATO	-	-	-	+	-	-	-	-	+
LECITINASA	*	-	-	-	-	-	-	-	-
HEMOLISIS♣	*	-	+	-	-	-	+	-	-
CATALASA	+	-	-	-	+	-	-	+	+
FLEXIRRUBINA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ROJO CONGO	+	-	+	+	-	+	+	-	-
SWARMING	-	+	+	+	-	+	+	+	+
PRODUCCIÓN DE H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FLOURESCENCIA	-	+	-	-	-	-	-	-	-
OF	O	O	O	F	O	O	O	O	O
CONC. MAX. NaCl♥	5	5	5	5	7	3	5	7	5
FUENTE DE CARBONO									
ACETATO	(+)	-	+	+	(+)	(+)	-	+	+
ALMIDON	+	+	+	+	+	+	-	+	+
CELOBIOSA	+	+	+	+	+	+	-	+	+
GLUCONATO	+	+	+	(+)	+	(+)	-	+	+
GLUCOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LACTOSA	+	-	-	◇	+	+	-	+	+
LISINA	+	-	-	+	◇	+	-	+	◇
SACAROSA	+	+	+	◇	+	+	-	+	+
SORBITOL	(+)	+	◇	+	+	+	-	+	+
SUCCINATO	+	+	-	+	+	(+)	-	+	+
DEGRADACION DE :									
AGAR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ALMIDÓN (3 DIAS)	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ALMIDÓN (10 DIAS)	+	-	+	-	+	+	-	+	+
GELATINA	-	-	-	+	-	-	-	-	-
PECTINA	-	+	-	-	-	-	-	-	+
QUITINA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SENSIBILIDAD A :									
CLORANFENICOL	+	+	+	+	+	-	+	-	+
KANAMICINA	+	+	+	+	+	+	-	+	+
AMPICILINA	+	-	+	-	+	+	+	-	-
ERITROMICINA	*	-	+	+	+	-	+	-	-
ESTREPTOMICINA	*	-	+	-	+	+	+	+	+
TETRACICLINA	+	+	+	+	+	-	+	+	+

NOTAS:

◇ significa que las cepas muestran comportamiento variable. * implica prueba anulada ó no realizada. Los paréntesis indican en qué fuente de carbono existió mejor crecimiento. + para sensibilidad a antibióticos significa inhibición. O ó F significa metabolismo oxidativo ó fermentativo. ♥ concentración dada en % de peso en volumen. ♣ de glóbulos rojos de carnero.

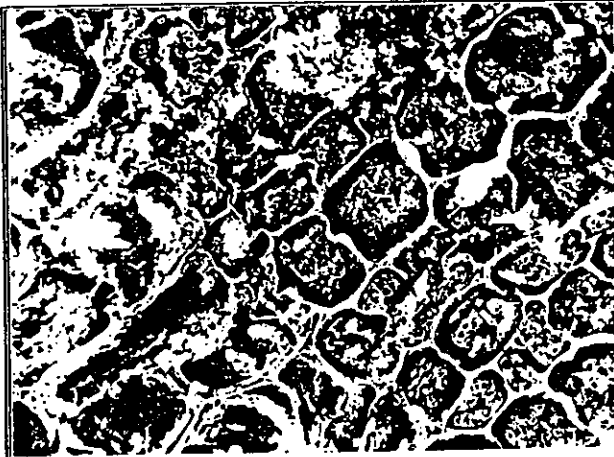
La cepa A2 corresponde a un bacilo pleomorfo celulolítico Gram negativo aerobio, de pigmento amarillo no difusible, no esporulado, sin agrupación, y que presenta deslizamiento abundante en forma de anillos concéntricos. Esto habla, en primera instancia, de una bacteria deslizante según las observaciones sugeridas por Reichenbach (1981). Y, de acuerdo al Manual de Bergey (1984), éstas características sugieren fuertemente un bacilo de la familia *Cytophagaceae*.

La cepa C1 sólo se diferencia de la 2 en no ser pectinolítica y absorber el rojo congo, además de soportar una mayor concentración de cloruro de sodio. La producción de fluoresceína y la utilización de todas las fuentes de carbono usadas sugieren un bacilo del género *Pseudomonas* (Konneman, 1989).

La cepa A4 es un bacilo pleomorfo celulolítico aerobio que presenta deslizamiento abundante en forma de anillos concéntricos, rojo congo negativo, catalasa positivo, amilolítico y pectinolítico, cuyas características lo identifican como miembro del género *Sorangium*, especie *cellulosum*, según el Manual de Bergey (McCurdy, 1984).

D.- ESTUDIOS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA.

En el corte transversal de la madera de los dinteles se observó el aspecto esponjoso de las paredes secundarias de las traquéidas, seriamente atacadas por bacterias. Las traquéidas perdieron su forma original. Se observa gran cantidad de bacterias y al parecer el ataque bacteriano alcanza también la pared primaria. La pared secundaria está completamente separada de la pared primaria. Los efectos de erosión, cavitación y tuneado son de tal grado que el lumen se encuentra colapsado al 100 %. En un corte longitudinal radial, las paredes están cubiertas de microorganismos, así como por una película mucosa de naturaleza proteica. Por último, en un corte tangencial, la separación de las traquéidas es evidente; las bacterias crecen a partir del interior de las traquéidas, rompiendo las paredes y trayendo como consecuencia la erosión y tuneado de las estructuras (Ver figura 12).



A) Corte Transversal



B) Corte Longitudinal



C) Corte Tangencial

FIGURA 12: Aspectos de la madera deteriorada vista con el microscopio electrónico de barrido. A) Corte transversal. B) Corte longitudinal, C) Corte tangencial.

Por otro lado, fue posible la observación, por microscopía electrónica, de cuerpos fructíferos formados en la madera; sus características sugieren la presencia de miembros de la familia Poliangium (Manual de Bergey, 1984). La fotografía se muestra en la figura 12D.



D) Cuerpo Fructífero

E.- ESTUDIOS DE CALORIMETRÍA TÉRMICA DIFERENCIAL .

La velocidad de calentamiento que proporcionó resultados confiables fue la de 0.2 °C por minuto. La figura 13 muestra el termograma del DNA de *Ps. aeruginosa* donde se obtiene una temperatura de fusión (T_m) de 94.14 °C. Por otro lado, el termograma de la figura 14 muestra las propiedades calorimétricas del DNA de la cepa A2, con un T_m de 86.86 °C. El termograma de la figura 15, perteneciente a la cepa Ec4, muestra un mínimo a 81.61 °C, y, por último, la figura 16 que corresponde al termograma del DNA de la cepa A4, muestra un mínimo a una temperatura de 100.48 °C. Con éstos valores de T_m se calculó el % de G + C, como se muestra en la tabla 4.

TABLA 4. CALCULO DEL % G + C¹

¹ CEPA	CALCULO DEL % G + C	% G + C
control	$\% G - C = (94.14 - 69.3) / 0.41$	60.58 %
A2	$\% G - C = (86.86 - 69.3) / 0.41$	42.83 %
Ec4	$\% G - C = (81.61 - 69.3) / 0.41$	30.02 %
A4	$\% G - C = (100.48 - 69.3) / 0.41$	76.05 %

1. ¹ FUENTE: Mandel, 1970.

FIGURA 13: TERMOGRAMA DEL DNA DE LA CEPA CONTROL

Sample: DSC File: A: DNAA2
 Size: 19.9000 mg Operator: MP
 Method: DNA A 0.2 C/min Run Date: 24-Aug-95
 Comment: H=0.2C/ MIN ATM. = AIRE PANEL CERRADO DE ALUMINIO

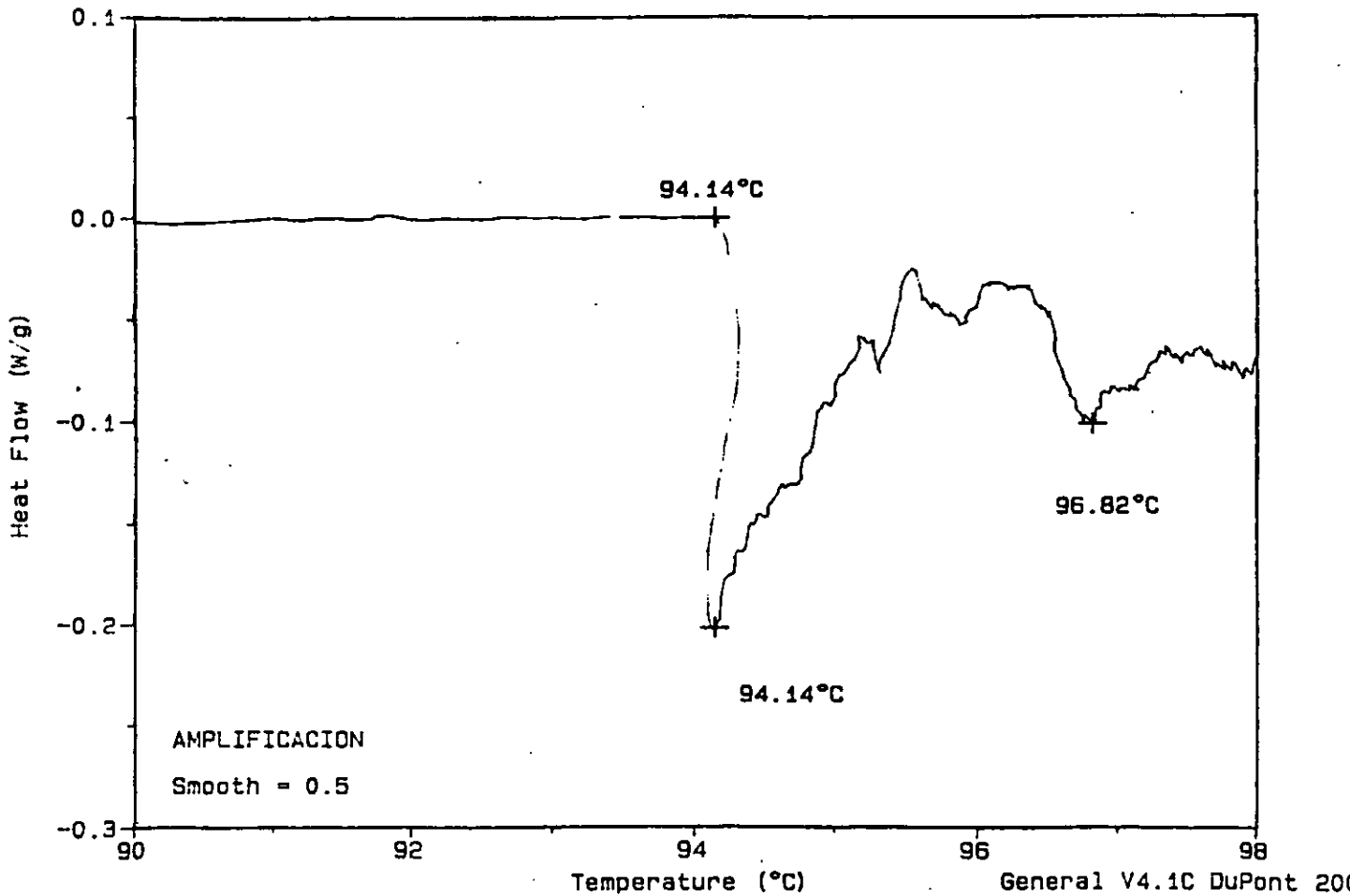


FIGURA 14: TERMOGRAMA DEL DNA DE LA CEPA A2

Sample: DNA A2
 Size: 18.9000 mg
 Method: DNA A 0.2 C/min
 Comment: H=0.2C/ MIN ATM. - AIRE PANEL CERRADO DE ALUMINIO

DSC

File: A: DNAA2
 Operator: MP
 Run Date: 24-Aug-95 18:37

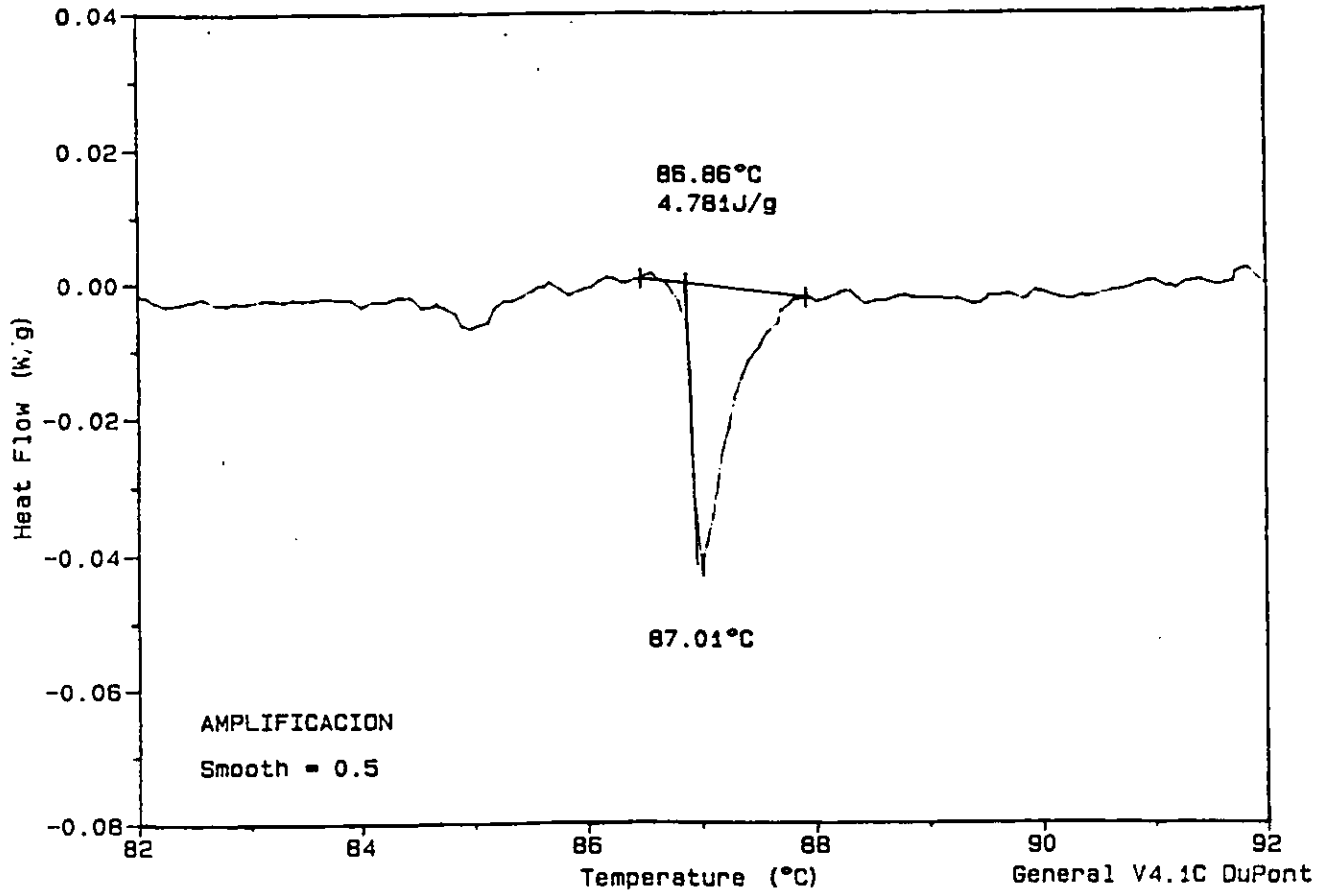


FIGURA 15: TERMOGRAMA DEL DNA DE LA CEPA Ec4

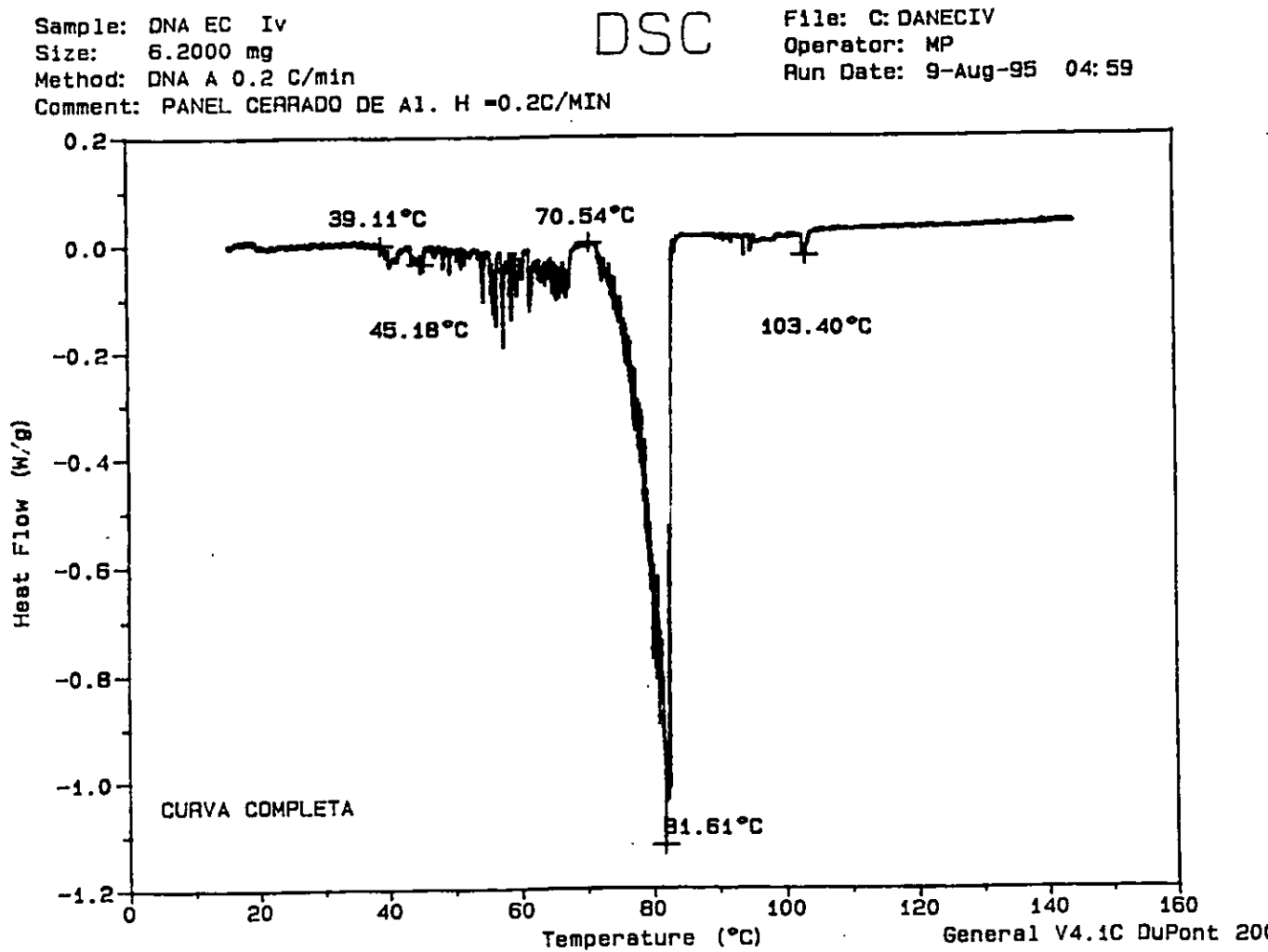
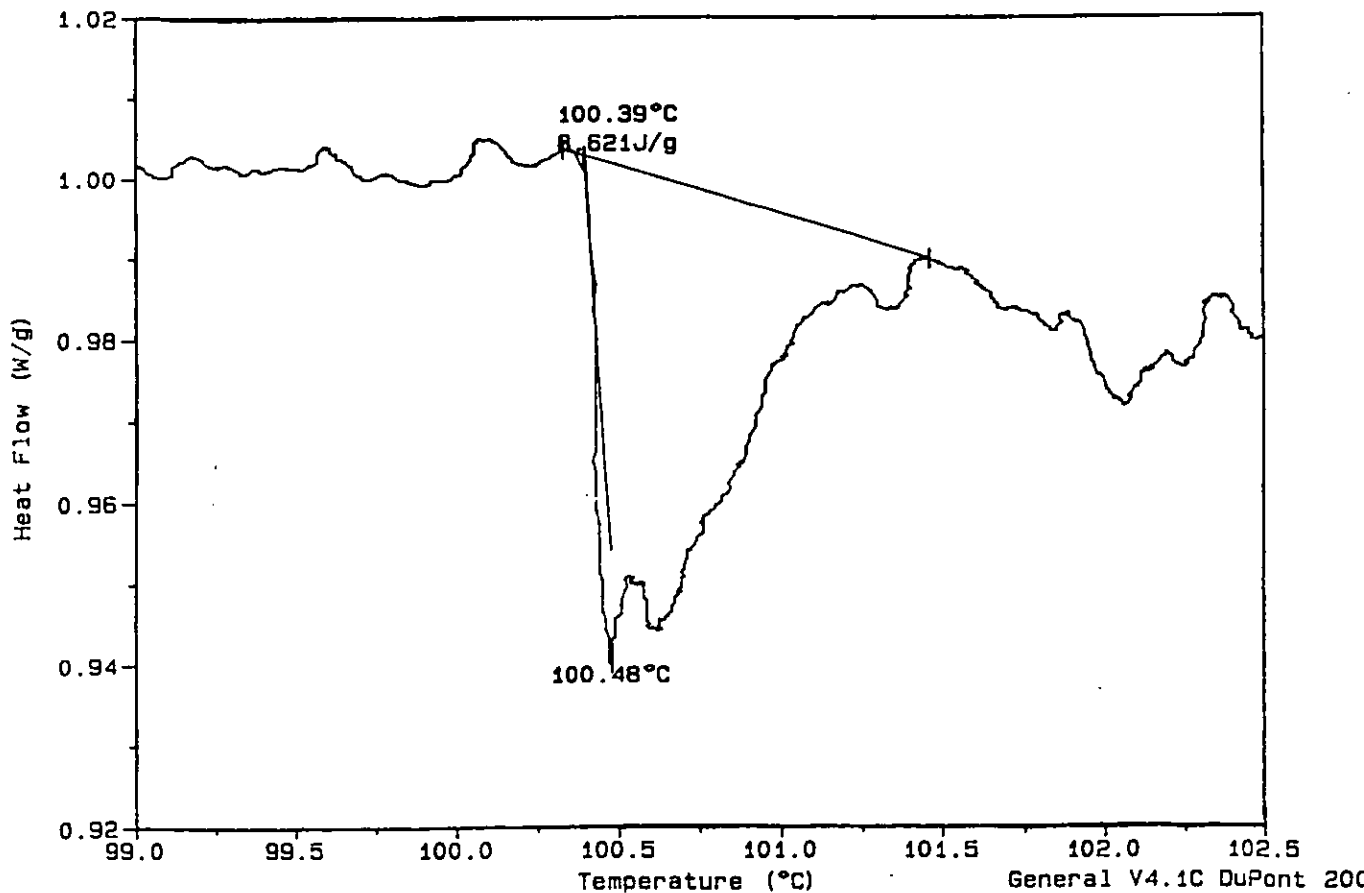


FIGURA 16: TERMOGRAMA DEL DNA DE LA CEPA A4

Sample: DNAA4
Size: 7.9000 mg
Method: DNA A 0.2 C/min
Comment: H=0.2 C/ MIN ATM. = AIRE PANEL CERRADO DE ALUMINIO

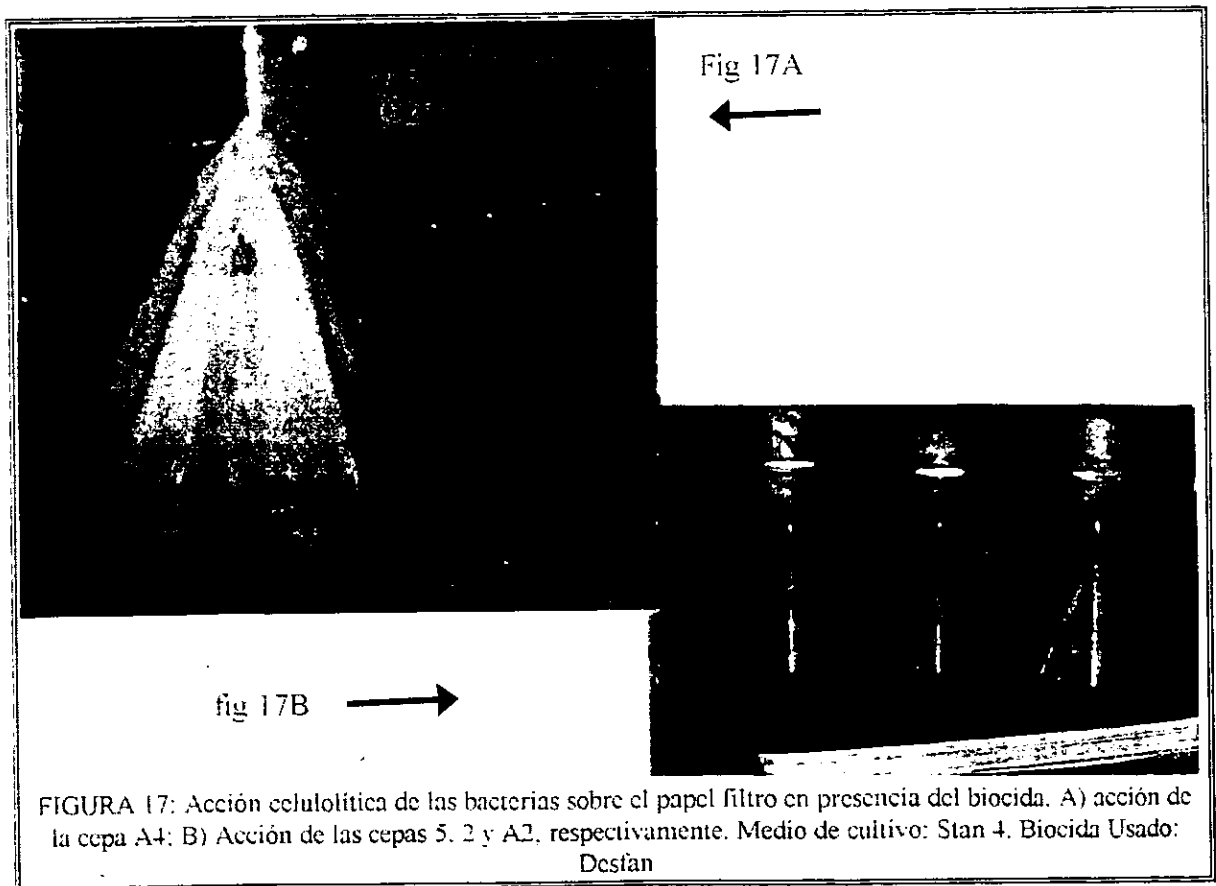
DSC

File: A: DNAA4
Operator: MP
Run Date: 22-Aug-95 00:24



F.- RETO MICROBIANO.

No se observó efecto del biocida sobre las cepas A4, 5,2,y A2. La figura 17A muestra el matraz que contiene la cepa A4^{2*}, fuertemente celulolítica que fue capaz de crecer en presencia del biocida. Se observa una zona color naranja donde la degradación del papel es evidente, llegando incluso a perforarlo. Esta zona del papel también se observó con el microscopio electrónico de barrido; en éste se observan bacilos pleomorfos, de 0.8 a 1.6 μm de largo por 0.3 a 0.5 μm de ancho que crecen abundantemente sobre el papel filtro, además de una capa mucoide que cubre la superficie del papel (Ver figura 18). Por otro lado, las cepas 5, 2 y A2 también crecen sobre el papel filtro en presencia del biocida, como se muestra en la figura 17b. Las demás cepas no crecen en presencia del biocida.



2. * Esta cepa corresponde al matraz 5 con inhibidor, por tal motivo se denominó también 5C/I



FIGURA 18: Aspecto microscópico de la acción celulolítica de la cepa A4, visto con microscopio electrónico de barrido

CAPITULO VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

La bioalteración de la madera se fundamenta en la presencia de bacterias celulolíticas, partículas en suspensión en el líquido en que están sumergidas las piezas y discontinuidad de las estructuras celulares de la madera.

La consistencia frágil y blanda, así como el color pardo de las muestras indican la presencia de erosión de la madera debido a bacterias, lo cual se puede apreciar en los estudios de microscopía electrónica. Según Paajanen (1988), la madera deteriorada por erosión se torna oscura y muestra ruptura en las capas superficiales lo que se traduce en severas pérdidas de la dureza. Por otro lado, un deterioro bacteriano más extenso debido al efecto de tuneado, genera una consistencia butirácea ó granular (Blanchette, 1990), lo cual explica la presencia de partículas en suspensión en el líquido en que se encontraban los dinteles. La coloración parda oscura de la madera, así como la pérdida de su rigidez característica, implican una serie de aspectos relacionados entre sí, dentro de los cuales se pueden mencionar (Paajanen, 1988): a) el deterioro causado por microorganismos que atacan las membranas, aumentando de ésta manera la porosidad y favoreciendo la anegación de las dinteles, y b) la alteración de tipo erosión causada por microorganismos que degradan la

pared celular de las células de la madera. Esto ha traído como consecuencia un marcado incremento de la porosidad, lo que se traduce en el aumento de la permeabilidad, aunada a una disminución de la dureza de la madera (Blanchette, 1990).

El hecho de que las piezas estuvieran sumergidas en una solución acuosa, tuvo como consecuencia un A_w alto, y esto es un factor que propicia la proliferación de procariontes (Atlas, 1990). Se puede decir que la alteración de la madera se debe, en gran parte a la fuerte acción celulolítica observada en las bacterias aisladas. Sin embargo, la anegación de las piezas también ha sido un factor que favorece el deterioro (Mainou, 1993). Por otro lado, la presencia de bacterias pectinolíticas, podrían ser otro factor adicional que favorezca éste deterioro, debido a que tanto la pectina como la celulosa son componentes básicos de la madera (Atlas, 1990).

Por lo que respecta a las bacterias deslizantes, se ha descrito que éstas se encuentran habitualmente en materiales en descomposición, (en particular en los procesos de pudrición de la madera), y que probablemente las bacterias deslizantes colonicen tales sustratos a partir del suelo que los rodea. (Reichenbach, 1993). Sin embargo, también se ha descrito que éstas bacterias pueden ser encontradas en agua dulce, y que pueden sobrevivir en ella debido a la formación de cuerpos fructíferos, e incluso se han propuesto como indicadores de contaminación del agua (Bernátová, 1977). En México, el estudio de las bacterias deslizantes se ha realizado en suelos áridos del norte del país, correlacionándose con el clima (Brockman, 1976), pero es poca la información sobre bacterias deslizantes como causantes del biodeterioro de la madera.

La presencia de *swarming* en las colonias aisladas, así como de la capa mucoide sobre los dinteles y sobre la superficie del líquido, proporcionaron un primer indicio de la presencia de bacterias deslizantes como causantes del deterioro (Mainou, 1993). Sin embargo, se encontraron bacterias que presentaron otras características micromorfológicas, tal es el caso de las cepas 1, 2, 6, 13 y C1 que no corresponden a los *Cytophagales* ó

Myxobacterales pero que si presentan capacidad celulolítica. En un principio las características de las cepas 2, 13 y C1, hicieron pensar en bacterias deslizantes, sin embargo, con base en los estudios se determinó que éstas cepas no corresponden a *Cytophagales* ni *Myxobacterales*, sino a la familia *Pseudomonadaceae*.

No se detectaron cuerpos fructíferos, a pesar de que se había descrito la presencia de éstos sobre las piezas (Mainou, 1993). Por otro lado, Dobson (1979), menciona que ésta capacidad se pierde cuando las bacterias carecen de pili, organelo que probablemente está relacionado con la comunicación intercelular. Cabe señalar que el CYT agar es un medio con baja concentración de peptonas, (0.1%), lo que hace al medio útil para la observación de swarming ó deslizamiento, característica propia de bacterias deslizantes. Sin embargo, muchas cepas pierden la habilidad de formar cuerpos fructíferos si se aíslan de colonias que presentan *swarming* (Reichenbach, 1981). Por otro lado, aunque algunas bacterias flageladas pueden crecer sobre CYT agar (como fue el caso de las cepas 2, 13 y C1) otras características macromorfológicas adicionales deben considerarse como guías para identificar a las bacterias deslizantes, sin embargo, esto requiere de cierta experiencia. Por tal motivo las pruebas bioquímicas, y en especial los estudios de calorimetría del ADN, cobran importancia (Reichenbach, 1981).

La capa mucoide que presentan las piezas, y que puede ser de naturaleza polisacarídica, puede proporcionar un medio para su deslizamiento, al parecer debido a una disminución de la tensión superficial entre la célula y la superficie sólida, lo cual es suficiente para el deslizamiento (Brock, 1991).

Por otro lado, la presencia de pigmento es importante en la identificación de éstas bacterias, ya que la mayoría de ellas presentan color amarillo ó naranja (Kleinig, 1977).

El *swarming* en VY/2 agar es más ligero en comparación con el mismo en el CYT agar, a pesar de ser un buen medio para demostrar el crecimiento en forma de *swarming*. (Reichenbach, 1981). Aunque, por otro lado, Reichenbach (1993a) menciona que la mayoría

de las bacterias deslizantes pueden crecer exclusivamente sobre productos de lisis y pueden ser cultivadas sobre medios que contienen por ejemplo, levaduras ó bacterias esterilizadas en autoclave.

En el medio STAN 4 agar con papel filtro se identificaron microorganismos que son celulolíticos, ya que las bacterias deslizantes usualmente degradan compuestos poliméricos tales como celulosa, agar, quitina, pectina y proteínas (Dworkin,1977). Sin embargo, éste medio también fue útil para el aislamiento de las cepas 1 y 6, que presentaban gran capacidad celulolítica a pesar de no pertenecer a los Myxobacterales.

Por lo que respecta a las pruebas bioquímicas se puede decir lo siguiente:

Aunque la prueba de la catalasa se consideró positiva para las bacterias deslizantes (McCurdy,1969), en el Manual de Bergey se reportan datos variables de acuerdo a la especie (Larkin,1984). En el resultado obtenido de las pruebas realizadas en el estudio se puede verificar que la presencia de catalasa es variable.

En el estudio de las fuentes de carbono, cabe resaltar el hecho de que la cepa 2 no utiliza la celobiosa a pesar de ser celulolítica. Esto implica que el microorganismo degrada la celulosa obteniendo sus nutrientes de ésta degradación, pero que no es capaz de aprovechar los oligosacáridos que produce éste proceso (García,1983).

La presencia de bacterias que degradan pectina, tales como la A2 y la 5C/I, aunada a la presencia de bacterias celulolíticas, puede conducir a un pronunciado deterioro de la madera, debido a que mientras las primeras atacan las pectinas presentes en la lámina media, la bacterias celulolíticas pueden atacar la celulosa presente en las paredes primaria y secundaria

A pesar de que McCurdy (1969) menciona que la sensibilidad a antibióticos es una prueba de identificación y diferenciación de bacterias deslizantes, no se considera en la clasificación del Manual de Bergey (Larkin,1984).

La cepa 1 muestra un bacilo aerobio Gram positivo y esporulado, catalasa positivo, sin agrupación. Al revisar el Manual de Bergey (1984), las características que presenta éste bacilo corresponden a la familia Bacillaceae, género *Bacillus*.

Por otro lado, la cepa 2 presenta características de bacilo celulolítico Gram negativo aerobio, oxidasa y catalasa positivo, que produce fluoresceína además de un pigmento difusible verdoso y que utiliza todas las fuentes de carbono probadas, y degrada la pectina. Estas características son típicas del género *Pseudomonas* (Palleroni, 1984). Por otro lado, Rodina (1972) menciona que una de las especies que presentan éstas características es *Ps. fluorescens*.

La cepa Ec4 muestra un bacilo celulolítico aerobio Gram negativo no esporulado, sin agrupación, que presenta colonias no pigmentadas pero con deslizamiento abundante en forma de anillos concéntricos, lo cual sugiere fuertemente una bacteria deslizante de la familia Cytophagaceae.

La cepa 5 corresponde a un bacilo celulolítico, aerobio, Gram negativo de 2 a 3 μm de largo sin agrupación, no esporulado, que produce pigmento amarillo no difusible y con deslizamiento abundante en forma de olas. Estas características también sugieren una bacteria deslizante.

Por lo que corresponde a la cepa 6, las características de cocos aerobios celulolíticos Gram negativos en tetradas o pares, de 3 a 4 μm de diámetro e inmóviles, catalasa positivo, son propias del género *Azotobacter* (Tchan, 1984).

La cepa 13 corresponde a un bacilo celulolítico aerobio, oxidasa positivo, que produce colonias no pigmentadas y que utiliza todas las fuentes de carbono probadas además de ser resistente a la ampicilina, antibiótico activo contra bacterias Gram negativas (Burdon, 1986). Estas características sugieren *Pseudomonas aeruginosa*.

La cepa A2 muestra un bacilo pleomorfo celulolítico Gram negativo aerobio, de pigmento amarillo no difusible, no esporulado, sin agrupación, y que presenta deslizamiento

abundante en forma de anillos concéntricos. Esto habla, en primera instancia, de una bacteria deslizante según las observaciones sugeridas por Reichenbach (1981). Y, de acuerdo al Manual de Bergey (1984), éstas características sugieren fuertemente un bacilo de la familia *Cytophagaceae*. Al comparar con los cuadros reportados en la literatura (Larkin, 1984), se concluye que éste microorganismo presenta gran semejanza con *Cytophaga aurantiaca*.

La cepa C1 sólo se diferencia de la 2 en no ser pectinolítica y absorber el rojo congo, además de soportar una mayor concentración de cloruro de sodio. La producción de fluoresceína y la utilización de todas las fuentes de carbono usadas sugieren un bacilo del género *Pseudomonas*.

La cepa A4 es un bacilo pleomorfo celulolítico aerobio que presenta deslizamiento abundante en forma de anillos concéntricos, rojo congo negativo, catalasa positivo, amilolítico y pectinolítico, cuyas características lo identifican como miembro del género *Sorangium*, según el Manual de Bergey (McCurdy, 1984).

El estudio de calorimetría del ADN demuestra los siguientes resultados:

El % G+C del DNA reportado para *Ps. aeruginosa*, es de 58 (Atlas, 1990), lo cual representa una temperatura de fusión (T_m) de 93.08 °C, según la fórmula de Mandel (1969). Sin embargo, la T_m reportada para el microorganismo mencionado es de 94.14 °C (60.58 % G-C), lo que indica un error de 1%.

El resultado del estudio de Calorimetría de la cepa A2 corrobora la afirmación de que este microorganismo corresponde al género *Cytophaga* especie *aurantiaca* al reportar un 42.83 % G-C, siendo que el reportado en la literatura es de 42 % (Larkin, 1984). Los resultados de las pruebas bioquímicas pueden servir de parámetro para la identificación de este microorganismo, sin embargo el estudio de calorimetría es más específico y confiable.

Marmur (1963) reporta un % G+C de 68 a 71 para Myxobacterales y de 69% para la familia Sorangiaceae. De acuerdo a las pruebas bioquímicas y las características fisiológicas (McCurdy, 1984), la cepa A4 puede ser clasificada como miembro de ésta familia. Sin

embargo, el % G+C reportado por el estudio de calorimetría es de 76.05%, lo que representa un error de más de 9 %. Debido a problemas técnicos la prueba no se repitió para confirmar los resultados.

El resultado obtenido en los estudios de calorimetría del DNA de la cepa 4, corroboran que ésta bacteria pertenece al grupo de las Cytophagales por su % G+C que es igual a 30.02 %. Cabe resaltar que, aunque el % de G+C reportado para el orden Cytophagales varía de acuerdo a los diferentes autores, éste comprende un rango de entre 29 y 50 (Atlas,1990; Mandel,1965; Marmur,1963; McCurdy,1967) y el Manual de Bergey acepta un valor de entre 30 y 50 % de G+C (Larkin,1984). Sin embargo, las pruebas bioquímicas no corresponden a alguna especie en particular; esto se puede deber a que en el Manual de Bergey no se han reportado los resultados para muchas de las pruebas utilizadas para la identificación de varias especies. Considerando ésta situación, la especie que más se aproxima es *C. hutchinsonii*.

Los estudios de calorimetría térmica diferencial proporcionan datos muy importantes sobre la composición de los ácidos nucleicos, ya que no sólo pueden ser usados en la determinación de la temperatura de fusión del ADN, sino también en la medición de la energía involucrada en los enlaces entre purinas y pirimidinas, así como entre nucleótidos (Marky,1982). Se sugiere el uso de calorímetros muy sensibles para éstas determinaciones (Ross,1971), pero el estudio demuestra que se pueden obtener valores muy aproximados para determinar la Tm usando otro tipo de calorímetros.

El desfan no presenta actividad biocida ya que existió crecimiento de varias de las cepas en el papel filtro colocado en el sistema recomendado por Imshenetskii (1953). Según Rodina (1972), la degradación del papel filtro por bacterias presenta diferentes etapas que se resumen a continuación: Si existe desarrollo de bacterias celulolíticas, aparecen áreas de varios colores de acuerdo a la especie, primero en aquellas zonas cercanas al medio de cultivo y donde la oxigenación es favorable. Después el papel filtro es gradualmente

degradado hasta generar zonas de ruptura. Por último, el papel puede llegar a formar una masa informe.

Es necesario estudiar otras sustancias con actividad biocida para determinar cuál es la más adecuada para contrarrestar el crecimiento de las bacterias que pueden causar daño a los dinteles. Sin embargo, es aún más necesario hallar la manera de conservar pronto las piezas antes de que el deterioro sea de tal magnitud que imposibilite la apreciación de su valor cultural. (Mainou,1993)

Considerando que las bacterias deslizantes tienen un gran potencial en la producción de antibióticos (Arias, 1979; Arai,1977), enzimas de restricción (Reichenbach,1981), una sustancia antitumoral (Arai,1980) y varios metabolitos secundarios (Reichenbach,1993b), es importante el estudio más amplio de éstos microorganismos en nuestro país, donde las zonas forestales pueden representar una fuente muy importante para el aislamiento de *Myxobacterales* y *Cytophagales* (Peterson,1969).

CAPITULO VII. CONCLUSIONES

1.- Se aislaron e identificaron 9 cepas de bacterias con capacidad celulolítica: una perteneciente al género *Bacillus sp.*, otra perteneciente al género *Azotobacter sp.*, tres pertenecientes al género *Pseudomonas* (especies *aeruginosa* y *fluorescens* y otra no identificada), una perteneciente al género *Sorangium* (especie *cellulosum*), y tres pertenecientes al género *Cytophaga*. Estas últimas se identificaron como las especies *C. aurantiaca* y *C. hutchinsonii*, pero la tercera no se pudo identificar por falta de datos reportados en la literatura y a que no se realizó el estudio de calorimetría.

2.- La Bioalteración de los Dinteles se debe, principalmente, a la presencia de bacterias celulolíticas.

3.- Los estudios de calorimetría térmica diferencial con el Calorímetro Diferencial de Barrido usado muestran una aproximación a los valores reportados en la literatura para las cepas estudiadas; sin embargo, el método no puede ser usado en estudios más precisos debido a su baja sensibilidad.

4.- La sustancia Biocida Desfan, no presenta actividad bactericida ó bacteriostática suficiente para detener el crecimiento de las bacterias celulolíticas presentes en la Bioalteración de los dinteles.

5.- No se obtuvieron cuerpos fructíferos, pese a que se había reportado su presencia.

6.- El medio de cultivo CYT agar es útil en el aislamiento de bacterias deslizantes, sin embargo, también es posible aislar bacterias que presentan deslizamiento sin pertenecer al grupo de las Myxobacterias, así como otras bacterias heterótrofas.

CAPITULO VIII. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Arai, T., K. Takahashi, y A. Kubo. 1977. New antibiotics, saframycins A,B,C,D and E. J. Antibiot. 30:1015-1018
- 2 Arai, T., K. Takahashi, S. Nakahara y A. Kubo. 1980. The structure of a novel antitumor antibiotic, saframycin A. *Experientia* 36:1025-1027.
- 3 Arias, J. M., C. Rodríguez y E. Montoya. 1979. Biological activity of an antibiotic produced by *Myxococcus coralloides*. *Microbios* 24:123-131
- 4 Arroyo, B.P. 1994. Estudio del crecimiento de hongos de la pudrición blanca y su aplicación en la biodegradación de un colorante azo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM México
- 5 Atlas, R. M. (ed) 1990. Ecología microbiana, en *Microbiología: Fundamentos y aplicaciones*. Cap. 21. pp. 705-753. Cía. Editorial Continental, S.A. de C. V., México.
- 6 Atlas, R. M. (ed) 1993. Handbook of Microbiological Media. pp 209-210,820-838 CRC Press, Florida
- 7 Bernátová, V. 1977. Occurrence of myxobacteria in surface water. *Folia Microbiol.* 22:468
- 8 Blanchette, R.A., T. Nilsson, G. Daniel y A. Abad. 1990. Biological Degradation of Wood, en *Achaelological Wood. Properties, Chemistry and Preservation*. pp 141-174. Advances in Chemistry Series 225. ACS. Washington, D.C.
- 9 Brock, T.D. y M. T. Madigan. (ed). 1991. *Biology of the microorganisms*. Cap. 19. pp 746-752. Prentice Hall, New Jersey,
- 10 Brockman, E. R. 1976. Myxobacters from Arid Mexican Soil. *Appl. Env. Microbiol.* 32 : 642 - 644
- 11 Burdon, K. L. y R. P. Williams. 1971. *Microbiología*. p.125. Publicaciones cultural, México.
- 12 Callies, E. y W. Mannheim. 1978. Classification of the *Flavobacterium-Cytophaga* complex on the basis of respiratory quinones and fumarate respiration. *Inter. J. Sys. Bacter.* 28:14-19

- 13 **Campos C. y Ma. Gutierrez, R. M.** 1977. Estudio de viabilidad para la producción de proteínas unicelulares a partir de desechos celulósicos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM
- 14 **Chargaff, E. y Davidson, J. N.** (ed)1955. *The Nucleic acids: Chemistry and Biology*. Vol. I, cap. 7, pp. 243-265. Academic press inc. publishers. New York.
- 15 **Cheng, S. Z. D.**1989. Thermal Characterization of macromolecules. *J. Appl. Polymer. Sci.* **43**:315
- 16 **Clauss, D. y R.C.W. Berkeley.** 1984. Bacillus en *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.ed. Krieg, N.R. y Holt, J.G. Vol. II. pp 1105-1139. Baltimore: Williams & Wilkins Co.
- 17 **Daniel, G. y T. Nilsson.** 1986. Int. Res. Group Wood Preserv.. Document IRG/WP/1283.
- 18 **Dobson, W. J. y H. D. McCurdy.** 1979a. The function of fimbriae in *Myxococcus xantus*: I. Purification and properties of *M. xantus* fimbriae. *Can. J. Microbiol.* **25**:1152-1160.
- 19 **Dobson, W. J., H. D. McCurdy y T. H. MacRae** 1979b. The function of fimbriae in *Myxococcus xantus*: II. The role of fimbriae in cell-cell interaction. *Can. J. Microbiol.* **25**:1359-1372
- 20 **Dworkin, M.**1977. The Myxobacterales. en *Handbook of Microbiology*. Ed. Larkin A.I. y Lechevalier H.A. Vol. I. pp.131-144 CRC press. U.S.A.
- 21 **Dworkin, M.**1993. *Cell Surfaces and Appendages en Myxobacteria*. ed. Dworkin M. y Kaiser D. Cap 3, pp. 63-84. American Society for Microbiology.
- 22 **Dworkin, M.**1966. Biology of myxobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **20**:75
- 23 **Fujita, M. y Harada, H.** 1991. Ultrastructure and formation of wood cell wall, en *Wood and Cellulosic Chemistry*. ed David N. y Nobuo Shirashi. Marcel Dekker inc. U.S.A.
- 24 **Gallegos, M. R.** 1981. La putrefacción blanda en vegetales y su relación con *Erwinia carotovora*. Monografía de actualización. Facultad de Química, UNAM
- 25 **García, V.** 1985. Estudio sobre la actividad Fungicida de derivados de éter corona contra hongos que pudren la madera. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM México.
- 26 **García, K.O.**1983. Producción microbiana de celulasas y su utilización en la sacarificación de materiales celulósicos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM
- 27 **Grattan, D. W.** (ed)1987. Waterlogged Wood, en *Conservation of Marine Archaeological Objets*. Cap. 3, pp 55-67. Butterworths inc.
- 28 **Grilione, P.L.** 1968. Serological reaction of some higher myxobacteria. *J.Bacter.* **95**:1202-1204
- 29 **Hedges, J. I.**1990. The Chemistry of Archaeological Wood, en *Archaeological Wood. Properties, Chemistry and Preservation*. Ed Rouell R.M. y R.J. Barbour. pp112-140 Advances in Chemistry Series 225. ACS. Washington, D.C.
- 30 **Hungate, R. E.**1966. The rumen and its Microbes. p 39. Academic press: New York.

- 31 **Imshenetskii, A. A.** 1953. Mikrobiologiya Tselliulozy [Microbiology of Cellulose]. Izd. An. SSSR, M. 1-439. (Publishing House of the USSR Academy of Sciences, Moscow. pp 1-439)
- 32 **Kleinig, H. y H. Reichenbach.** 1977. Carotenoid glucosides and menaquinones from the gliding bacterium *Herpetosiphon giganteus* Hp a2. Arch. Microbiol. **112**:307-310
- 33 **Koneman, E.W., S.D. Allen, V.R. Dowell y H.M. Sommers.(ed)** 1989. *Diagnóstico Microbiológico*. Pp139-144. Ed. Médica Panamericana, S. A. México.
- 34 **Larkin, J. M.** 1984. Nonphotosynthetic, nonfruiting, gliding bacteria, en *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*. ed. Krieg, N.R. y Holt, J.G. Vol. III. Cap 23. Baltimore: Williams & Wilkins Co.
- 35 **Lechuga, C., M. Carballal y M. Flores.** 1993. Boletín de la Subdirección de Salvamento Arqueológico. Año I. Número 2. pp 23-25. México.
- 36 **Mainou, L.M., y E. Sandoval.** 1993. Dinteles de Tlatelolco: Problemática y Planteamiento Metodológico para su Conservación. Tesis de Licenciatura E.N.C.R.M.I.N.A.H. México.
- 37 **Maldonado R., M. Espinoza, A. Espinoza. J. Quintana y S. Uribe. (Ed)** 1995. *Técnicas de aplicación en Biología Molecular. Manual del curso*. Facultad de Bioanálisis. Universidad Veracruzana. México.
- 38 **Mandel, M., L. Igambi, J. Bergendahl, M. L. Dodson y E. Scheltgen.** 1970. Correlation of Melting Temperature and Cesium Chloride Bouyant density of Bacterial Deoxyribonucleic acid. J. Bacter. **101**: 333-338.
- 39 **Mandel, M., y E.R. Leadbetter.** 1965. Deoxyribonucleic acid base composition of myxobacteria. J. Bacter. **90**:1795-1796.
- 40 **Marky, L. A. y K. Breslaver.** 1982. Calorimetric determination of Base-Stacking enthalpies in Double-Helical DNA molecules. Biopol. **21**:2185-2194.
- 41 **Marmur, J., S. Falkow y W. Mandel.** 1963. New approaches to bacterial taxonomy. Ann. Rev. Microbiol. **17**:329 - 372.
- 42 **Marmur, J. y P. Doty.** 1959. Heterogeneity in Deoxyribonucleic Acids. Nature, **183**: 1427-1431.
- 43 **McCurdy, H. D.** 1969. Studies on the Taxonomy of the Myxobacterales. I.Record of Canadian isolates and Survey of Methods. Can. J. Microbiol. **15**: 1453-1461
- 44 **McCurdy, H. D.** 1984. Fruiting Glidding Bacteria: The Myxobacteria en *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*. ed. Krieg, N.R. y Holt, J.G. Vol. III. Cap 24. Williams & Wilkins Co. U.S.A.
- 45 **McCurdy, H. D. y S. Wolf,** 1967. Studies on the taxonomy of fruiting Myxobacterales, Bacteriol. Proc., p. 39
- 46 **Murphy, G. y E.S. Ward.** 1989. Sequencing of double-stranded DNA, en *Nucleic Acids sequencing: a practical approach*. P.100-101. ed Howe, C. J. y S. E. Ward. IRL press, Oxford.
- 47 **Neumman, E. y T. Ackermann.** 1969. Thermodynamic Investigation of the Helix-Coil Transition of a Polyribonucleotide system. J. Phys. Chem. **73** : 2170 - 2178.

- 48 **Ng, T. K. , A. Ben-Bessat y J.G. Zeikus.** 1981. Ethanol production by thermophilic bacteria - fermentation of cellulosic substrates by cultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. Appl. Env. Microbiol, **41** : 1337.
- 49 **Nickel C. R.** 1988. Enzimología aplicada a los alimentos, en *Bioquímica e Inmunología*, Vol II, Cap. 12, p. 241. Facultad de Medicina, UNAM México.
- 50 **Paajanen, L. Y H. Viitanen.** 1988. Int. Res. Group Wood Preserv. Document IRG/WP/1370.
- 51 **Palleroni, N. J.** 1984. Pseudomonadaceae en *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*. ed. Krieg, N.R. y Holt, J.G. Vol. I. pp 141-199. Baltimore: Williams & Wilkins Co.
- 52 **Peterson, J. E.** 1965. A group of strongly cellulolytic Myxobacteria previously unreported in North American Soils. Am. J. Bot. **52** : 636.
- 53 **Peterson, J. E.** 1969. Isolation, cultivation and maintenance of the myxobacteria, en *Methods in microbiology*, vol. 3B. pp 185 - 210. Academic Press. London.
- 54 **Petterson L.G.** 1975. Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose.. Ed. M. Bailey, T. Menari & M. Linko. pp 319-326. Aulanko, Finlandia.
- 55 **Pine, S. H., J.B. Hendrickson, D.J. Cram y G.S. Hammond.** 1988. *Química Orgánica*. McGraw-Hill. México.
- 56 **Pinzón, L. M.** 1972. Ensayo de Preservadores para madera contra hongos que causan la pudrición. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM México.
- 57 **Reichenbach, H., y M. Dworkin.** 1981. Introduction to the gliding bacteria, en *The Procarvates. A Handbook on Habitats, Isolation and identification of Bacteria*. Ed Reichenbach, H. Cap.19-21. Springer Verlag.
- 58 **Reichenbach, H.** 1993a. Biology of the Myxobacteria: Ecology and Taxonomy en *Myxobacteria II*. ed. Dworkin M. y Kaiser D. Cap 2, pp13-61. American Society for Microbiology.
- 59 **Reichenbach, H. y H. Gerhard.** 1993b. Production of Bioactive metabolites. en *Myxobacteria II*. ed. Dworkin M. y Kaiser D. Cap 16, pp347-397. American Society for Microbiology..
- 60 **Ribero, W. L.** 1990. Diagnóstico del deterioro e identificación de maderas empleadas para pintura sobre tabla en la época colonial. Tesis de Licenciatura. E.N.C.R.M.I.N.A.H. México.
- 61 **Rodina, A. G.** 1972. Methods in Aquatic Microbiology. Cap. 6 pp 181-250. University Park Press, Baltimore & Butterworth, London.-U.S.A.
- 62 **Rosenfelder, G., O. Lüderitz y O. Westphal.** 1974. Composition of lipopolysaccharides from *Myxococcus fulvus* and other fruiting and non-fruiting myxobacteria. Europ. J. Biochem. **44**:411-420.
- 63 **Ross, P. D.** 1971. Calorimetry of Nucleic Acids, en *Procedures in Nucleic Acid Research*. Vol. II. Harper & Row publishers. New York, U.S.A.
- 64 **Safo-Sampah, S. y W.W. Wilcox.** 1988. For. Prod. J. **38**,42-46
- 65 **Seibert, F. B.** 1957. Colorimetric Analysis of sugars. Methods in enzymology. Vol III, pp. 99-101

- 66 **Shimada, M., M. Takahashi.** 1991. Biodegradation of Cellulosic Materials, en *Wood and Cellulosic Chemistry*. ed. David N. y Shirashi N. Marcel Dekker inc. pp 621-663. U.S.A.
- 67 **Stanier, R. Y.** 1942. The Cytophaga group: a contribution to the biology of the myxobacteria. *Bacteriol. Rev.* **6**:143-196.
- 68 **Stryer, L.** 1994. *Biochemistry*. 3rd Edition. Vol II. p-339. Standford University Press. Baltimore, U.S.A.
- 69 **Sutherland, J. W. y S. Thomson.** 1975. Comparison of polysacharides produced by Myxococcus strains. *J. Gen. Microbiol.* **89**:124-132.
- 70 **Tchan, Y.** 1984. Azotobacteraceae en *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*. ed. Krieg, N.R. y Holt, J.G. Vol. I. pp 291-234. Williams & Wilkins Co. U.S.A.
- 71 **Vélez, F. A.** 1982. Caracterización de 22 cepas de hongos Basidiomicetos causantes de pudrición en la madera. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM México.
- 72 **Vivanco, R. U.** 1994. Estudio comparativo de pruebas para determinar tipo de pudrición de hongos xilófagos. Tesis de Licenciatura. E.N.E.P. Iztacala. UNAM México.
- 73 **Yamane, K., H. Suzuki y K. Nisizawa.** 1970. Purification and properties of extracellular and cell-bound cellulase components of *Pseudomonas fluorescens* var *cellulosa*. *J. Biochem.* **67**:19

CAPITULO IX. ANEXOS.

A.- ANEXO I: DESCRIPCION DE LOS DINTELES PREHISPANICOS DE TLATELOLCO.

El Dintel con la clave de la CNRPC 149/92 (central), está ofrecido al Sol. En su centro se encuentra el disco solar y en medio de él un geroglífico de 4 movimiento. A cada uno de sus lados se encuentra un sacerdote ricamente ataviado con una túnica larga hasta las rodillas y con gran penacho, ambos llevan en su mano izquierda una bolsa de tabaco o copal ofreciéndola al Sol. Se observan chalchihuites alrededor, que representan el cielo que los rodea.

La talla de Dintel identificado con la clave de CNRPC 148/92, representa a los sacerdotes ataviados con largas túnicas y portando collares de oro, cobre o concha. Sus penachos son horizontales y tienen chalchihuites en la base. El resto se compone de plumas de quetzal. En la mano izquierda portan una ofrenda, probablemente tabaco. En el centro se encuentra representado el dios Tláloc (dios de la lluvia), que se encuentra en un campo estrellado.

La escena del tercer Dintel, identificado con la clave 150/92, por la CNRPC, se desarrolla igualmente en un campo estrellado. El personaje central es Tláloc, se observa claramente su anteojera, la voluta de la palabra florida y el rayo que sostiene con la mano. Su tocado es muy rico, presenta una doble pieza horizontal ricamente adornada con oro y piedras preciosas. Los personajes que se encuentran a cada lado de Tláloc son sacerdotes, cada uno de los cuales posee la voluta de la palabra en alabanza al dios, sujetan con la mano un casacabel grande o doble (omichicahuastli), y tienen una túnica larga hasta las rodillas y un collar muy rico.

B.- ANEXO II. COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS²

MEDIO MINERAL MAS CELULOSA

Composición por litro:	
Celulosa en polvo	1.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1 g
FeCl ₃	0.02 g

pH 7.0 -7.5 a 25°C

AGAR VY/2.

Composición por litro:	
Agar	15.0 g
Levadura para panificación	5.0 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.0 g
Cianocobalamina	0.5 mg

pH 7.2 ± 0.2 a 25°C

AGAR CYT

Composición por litro:	
Agar	15.0 g
Digerido pancreático de caseína	1.0 g
Extracto de levadura	0.5 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g

pH 7.2 ± 0.2 a 25°C

AGAR AMB

Composición por litro:	
Agar	15.0 g
Digerido pancreático de caseína	2.5 g
Almidón soluble	5.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.25 g

pH 7.2 ± 0.2 a 25°C

AGAR STAN 4

Composición por litro:	
Solución B	650.0 mL
Solución A	350.0 mL

SOLUCION A

Composición por 350 mL:	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.0 g
KNO ₃	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0 g
Solucion de elementos traza	1.0 mL

SOLUCION B:

Composición por 650 mL:	
Agar	10.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g

SOLUCION DE ELEMENTOS TRAZA:

Composición por litro:	
EDTA	8.0 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1 g
CoCl ₂	0.02 g
KBr	0.02 g
ZnCl ₂	0.02 g
CuSO ₄	0.01 g
H ₃ BO ₃	0.01 g
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.01 g
BaCl ₂	5.0 mg
LiCl	5.0 mg
SnCl ₂ ·2H ₂ O	5.0 mg

AGAR SP6

Composición por litro:	
Agar	15.0 g
Digerido pancreático de caseína	3.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Agua de mar artificial	1.0 L

pH 7.2 ± 0.2 a 25°C

AGUA DE MAR ARTIFICIAL.

Composición por litro:

NaCl	24.7 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6.3 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	4.6 g
CaCl ₂	1.0 g
KCl	0.7 g
NaHCO ₃	0.2 g

NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.01 g
BaCl ₂	5.0 mg
LiCl	5.0 mg
SnCl ₂ ·2H ₂ O	5.0 mg

MEDIO 2xYT

Composición por 1000 mL

Bactotripton	16.0 g
Bactoextracto de levadura	10.0 g
NaCl	5.0 g

Mezclar, ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5
N. Esterilizar en autoclave 20 min a 15 lb

AGAR STAN 5

Composición por litro:

Solución B	650.0 mL
Solución A	350.0 mL

SOLUCION A

Composición por 350 mL:

CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0 g
Solución de elementos traza	1.0 mL

SOLUCION B:

Composición por 650 mL:

Agar	10.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g

SOLUCION DE ELEMENTOS TRAZA:

Composición por litro:

EDTA	8.0 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1 g
CoCl ₂	0.02 g
KBr	0.02 g
ZnCl ₂	0.02 g
CuSO ₄	0.01 g
H ₃ BO ₃	0.01 g

C.- ANEXO III. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.**i. OBTENCIÓN DE FENOL EQUILIBRADO: (Maldonado,1995).**

1.- El fenol congelado a -20°C dejarlo que se caliente a temperatura ambiente y posteriormente fundirlo a 68°C .

2.- Al fenol fundido adicionarle un volumen de Tris:HCl 0.5 M pH 8.0 y mezclar vigorosamente. Permitir que se separen las dos fases y eliminar la fase acuosa (Fase superior).

3.- Repetir 2 ó 3 veces más el paso 2 con la fase orgánica hasta que el pH sea mayor de 7.8. (medir el pH con papel indicador de pH).

4.- Después de ser equilibrado y la fase acuosa ha sido eliminada, agregar 0.1 ml de Tris:HCl 0.1 M a pH 8.0 conteniendo 0.2% de β -mercaptoetanol. La solución de fenol debe ser almacenada en un frasco ámbar a -20°C .

ii. FENOL:CLOROFORMO:ISOAMILICO (25:24:1).

Mezclar el fenol con el cloroformo y el alcohol isoamilico en proporción fenol:cloroformo:isoamilico de 25:24:1. La mezcla debe ser almacenada en un frasco ámbar a -20°C .

iii. SOLUCIONES PARA LA OBTENCIÓN DE ADN.**SOLUCION I.**

Glucosa	50 mM
Tris:HCl	25 mM(pH 8.0)
EDTA	10 mM(pH 8.0)

Esterilizar la solución 15 min a 10 lb y mantenerla a 4°C . Agregar 10 $\mu\text{g/ml}$ de lisozima antes de usar.

SOLUCION II.

NaOH	0.2 N
Dodecilsulfato de sodio	1 %

SOLUCION III.

Acetato de potasio	5,0 M
Acido acético glacial	11,5 ml
Agua desionizada	28,5 ml

CAPITULO X. TABLA DE CONTENIDOS.

CAPITULO I. INTRODUCCION	1
<hr/>	
CAPITULO II. GENERALIDADES	3
<hr/>	
A.- ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LOS DINTELES DE TLATELOLCO.	3
B.- CONSTITUCIÓN DE LA MADERA	4
I. ESTRUCTURA FÍSICA DE LA MADERA	4
II. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS	6
C.- ALTERACIÓN DE LA MADERA HÚMEDA.	11
I. FENÓMENOS FÍSICOQUÍMICOS.	11
II. BIOALTERACIÓN DE LA MADERA	12
III. EFECTO BACTERIANO EN LA ALTERACIÓN DE LA MADERA.	12
D.- CELULASAS.	14
E.- BACTERIAS CELULOLÍTICAS.	17
I. MYXOCOCCALES.	17
II. CYTOPIAGALES.	19
III. OTROS MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS	21
F.- DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE BASES DEL ADN.	22
G.- IMPORTANCIA DE LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN LA IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE BACTERIAS DESLIZANTES.	24
<hr/>	
CAPITULO III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
<hr/>	
CAPITULO IV. METODOLOGÍA	26
<hr/>	
A.- HIPÓTESIS.	26
B.- OBJETIVOS.	26
C.- FASE EXPERIMENTAL .	27
I. MUESTREO DE LA MADERA .	27
II. AISLAMIENTO DE MYXOBACTERIAS Y CYTOPIAGAS .	27
III. IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS.	28
IV. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE BASES DEL ADN.	29
V. RETO MICROBIANO.	31
<hr/>	
CAPITULO V. RESULTADOS	32
<hr/>	
A.- CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS.	32
B.- AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.	32
C.- IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS.	34

D.- ESTUDIOS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA.	37
E.- ESTUDIOS DE CALORIMETRÍA TÉRMICA DIFERENCIAL .	39
F.- RETO MICROBIANO.	44
<u>CAPITULO VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.</u>	46
<u>CAPITULO VII. CONCLUSIONES</u>	54
<u>CAPITULO VIII. BIBLIOGRAFÍA</u>	56
<u>CAPITULO IX. ANEXOS.</u>	61
A.- ANEXO I: DESCRIPCION DE LOS DINTELES PREHISPANICOS DE TLATELOLCO	61
B.- ANEXO II. COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS²	63
C.- ANEXO III. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.	65
I. OBTENCIÓN DE FENOL EQUILIBRADO: (MALDONADO,1995).	65
II. FENOL:CLOROFORMO:ISOAMILICO (25:24:1).	65
III. SOLUCIONES PARA LA OBTENCIÓN DE ADN.	65