



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas

“Evaluación de la capacidad de microorganismos asociados a *Magnolia dealbata* Zucc. para producir compuestos con actividad biológica”.

# TESIS

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A:

BIOL. SILVIA MARGARITA GUZMÁN TRAMPE



TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:

DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCA

DR. ALFONSO OCTAVIO DELGADO SALINAS

MÉXICO, D.F.

ABRIL, 2012



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.



**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 05 de marzo de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **GUZMAN TRAMPE SILVIA MARGARITA** con número de cuenta **099112619** con la tesis titulada **"EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS A MAGNOLIA DEALBATA ZUCC. PARA PRODUCIR COMPUESTOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA"**, realizada bajo la dirección del **Dr. Sergio Sánchez Esquivel**:

Presidente: DR. ALFONSO OCTAVIO DELGADO SALINAS  
Vocal: DR. MANUEL JIMENEZ ESTRADA  
Secretario: DRA. MARTHA LIDIA MACIAS RUVALCABA  
Suplente: M. EN B. BEATRIZ RUIZ VILLAFAN  
Suplente: DRA. ANA LUISA ANAYA LANG

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 27 de Marzo de 2012.

*M. del Coro Arizmendi*

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Sergio Sánchez Esquivel en el laboratorio de Microbiología Industrial de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por:

Dr. Alejandro Manuel García Carranca	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Alfonso Octavio Delgado Salinas	Instituto de Biología, UNAM
Dr. Sergio Sánchez Esquivel	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Este trabajo fue apoyado por la beca de CONACYT (327973)

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por su apoyo incondicional y la amistad brindada durante el desarrollo de esta tesis. Gracias por su entusiasmo y cariño.

Agradezco al Dr. Alejandro Manuel García Carranca por sus comentarios en los tutoriales así como por brindarme un espacio en su laboratorio para desarrollar los experimentos de citotoxicidad.

Agradezco al Dr. Alfonso Delgado Octavio Salinas por sus comentarios en los tutoriales y revisión de esta tesis. Por sus divertidas charlas.

Agradezco a la Dra. Martha Lidia Macías Ruvalcaba por enseñarme el correcto camino del fraccionamiento químico, por su amabilidad y apoyo.

Agradezco a la M. en B. Beatriz Ruíz Villafán por todo el apoyo y las enseñanzas invaluable, por tu cariño y toda tu infinita paciencia. Te quiero mucho.

Agradezco al M. en C. Angel Josabad Castro por toda tu invaluable ayuda para montar las técnicas de citotoxicidad. Gracias por tu tiempo y compañía.

Agradezco a la M. en M. Victoria Grosso Becerra por ser una experta en Pseudomonas y apoyarme tanto con la realización de este trabajo.

Agradezco a la M. en C. Mariana Ávalos García por acompañarme en este sendero de los metabolitos secundarios. Gracias por empaparme con tu experiencia y apoyarme. Por tu amistad y cariño vecinita.

A la M. en C. Brenda Sánchez Salazar por todo tu apoyo incondicional, por enseñarme y acompañarme. Por tu valiosa amistad. Y por qué no? por las perisureadas. Te quiero mucho.

Agradezco al M. en C. Alfonso Troyo por su apoyo en la colecta del material.

Agradezco al M. en C. Álvaro Campos por su apoyo en la colecta del material biológico.

Agradezco a la M. en C. Yolanda Hornelas por su apoyo con las fotografías de MEB.

Agradezco a la M. en C. Ana Isabel Bieler Antolín por su apoyo en la toma de fotografías.

Agradezco a la Biol. Ana María Manterola Morales por todo su apoyo, por emprender esta aventura conmigo y siempre aportar buenos momentos.

Agradezco al equipo de dealbatos Diana Lemus, Allan y Anita porque gracias a ustedes hemos formado un equipo de trabajo muy divertido.

# AGRADECIMIENTOS



Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1 Metabolitos secundarios	3
1.2 Metabolitos secundarios de microorganismos	5
1.3 Metabolitos secundarios de microorganismos asociados a plantas	8
1.3.1 Epífitos	9
1.3.2 Rizófitos	9
1.3.3 Endófitos	10
1.4 Selección de la planta para el aislamiento de microorganismos productores de moléculas bioactivas	11
1.5 Las Magnolias como modelo de estudio	15
1.5.1 Sección <i>Rhytidospermum</i>	16
1.5.2 <i>Magnolia dealbata</i> Zucc.	16
1.6 El grupo de las Pseudomonas	18
1.6.1 El grupo de pseudomonas fluorescentes	18
1.7 Necesidad por encontrar nuevas moléculas	19
2. Objetivos	22
3. Materiales y Métodos	23
3.1 Aislamiento de poblaciones de microorganismos asociados a la especie <i>Magnolia dealbata</i> Zucc.	23
3.1.1 Colecta del material biológico	23
3.1.2 Caracterización de las cepas	24
3.2 Evaluación del potencial para producir compuestos con actividad biológica de los microorganismos asociados a <i>M. dealbata</i> Zucc.	24
3.2.1 Determinación de la actividad antibacteriana	25
3.2.2 Actividad de honokiol y magnolol	26
3.2.3 Determinación de actividad citotóxica	26
3.3 Identificación de los microorganismos que presentaron actividad antibiótica	28
3.3.1 Identificación molecular	28
3.3.2 Análisis por microscopía electrónica de barrido	28
3.3.3 Caracterización bioquímica	29
a. Producción de pigmentos	29
b. Separación de sideróforos	30
c. Producción y extracción de piocianinas	30
d. Índice de emulsificación	31
e. Producción de ramnolípidos	31
f. Termoestabilidad	31
g. Cinéticas de crecimiento	32
3.4 Fraccionamiento químico biodirigido del extracto orgánico de la cepa de <i>Pseudomonas</i> 28A	32

3.4.1	Cromatografía en capa fina (TLC) preparativa	32
3.4.2	Purificación por columna	33
4.	Resultados y su Discusión	35
4.1	Aislamiento de poblaciones de microorganismos asociados a la especie <i>Magnolia dealbata</i> Zucc.	35
4.1.1	Colecta del material	35
4.1.2	Caracterización de las cepas	36
4.2	Evaluación del potencial para producir compuestos con actividad biológica de los microorganismos asociados a <i>M. dealbata</i> Zucc.	36
4.2.1	Determinación de la actividad antibacteriana	36
4.2.2	Actividad de honokiol y magnolol	38
4.2.3	Determinación de actividad citotóxica	42
4.3	Identificación de los microorganismos que presentaron actividad antibiótica	45
4.3.1	Identificación molecular	45
4.3.2	VITEK	46
4.3.3	Caracterización bioquímica	46
	a. Producción de pigmentos	47
	b. Separación de sideróforos	48
	c. Producción y extracción de pirocianinas	49
	d. Índice de emulsificación	50
	e. Producción de ramnolípidos	50
	f. Termoestabilidad	51
4.4	Fraccionamiento químico biodirigido del extracto orgánico de la cepa de <i>Pseudomonas</i> 28A	51
4.4.1	Cromatografía en capa fina (TLC) preparativa	52
4.4.2	Purificación por columna	52
4.4.3	HPLC	53
4.5	Moléculas bioactivas de pseudomonas	54
5.	Conclusiones	55
	Prospectivas	56
	Bibliografía citada	57
	Suplemento 1	62
	Anexo 1	66
	Anexo 2	67

## Resumen

Las plantas y los microorganismos sintetizan el mayor porcentaje de metabolitos secundarios con actividad biológica. Recientemente se ha incrementado la búsqueda de metabolitos con actividad biológica en microorganismos endófitos y asociados a plantas. En el presente trabajo se aislaron 107 microorganismos, 55 bacterias, 47 hongos y 5 levaduras del árbol endémico de México, *Magnolia delabata* Zucc. Se probó la actividad antibiótica de las cepas aisladas mediante antibiosis contra cepas sensibles de *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Staphylococcus epidermidis*, encontrándose 14 patrones de inhibición sobre las mismas. Se eligieron ocho cepas bacterianas debido a que inhibieron a más de tres de las cepas sensibles. Utilizando diversas técnicas moleculares y bioquímicas (ADNr 16S, MEB, API, VITEK), se determinó que las ocho cepas pertenecían al género *Pseudomonas* con capacidad fluorescente. Ninguna de las cepas es *Pseudomonas aeruginosa* ya que no presentaron producción de piocianinas. Se realizaron ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares HeLa, MCF-7, HepG2 y HaCaT utilizando sobrenadantes libres de células de las cepas 14A, 24 y 28A de *Pseudomonas* las cuales mostraron una fuerte actividad citotóxica. La actividad citotóxica no parece deberse a la presencia de sideróforos pues fueron eliminados del sobrenadante. Se observó que la cepa 28A produce un surfactante no aniónico, mismo que tiene un índice de emulsificación del DIESEL de 50%. Por último, el fraccionamiento químico biodirigido del extracto orgánico del medio de crecimiento de la cepa 28A, permitió establecer que la actividad biológica se concentra en las fracciones metanólicas, es decir el o los compuestos bioactivos son de naturaleza polar.

## Abstract

Plants and microorganisms synthesize most of biologically active secondary metabolites. The search for these metabolites has recently augmented with a special emphasis on endophytes associated to plants. During this research we isolated 107 microorganisms from the endemic tree *Magnolia dealbata* Zucc., of which 55 were found to be bacteria, 47 fungi and 5 yeasts. The isolated strains were tested for antibiotic activity against *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Staphylococcus epidermidis* using the Kirby-Bauer assay on which fourteen inhibition patterns were found. Eight strains were selected due to their capacity to inhibit three of the sensible strains. Using molecular and biochemical tests (DNAr 16S, SEM, API, VITEK) the strains were characterized as fluorescent *Pseudomonas*. None of the isolated strains produced pyocyanins which eliminated the possibility of having *Pseudomonas aeruginosa*. We performed cytotoxic assays on cell lines HeLa, MCF-7, HepG2 and HaCaT using cell-free supernatants obtained from *Pseudomonas* strains 14, 24 and 28A, which showed a strong cytotoxic activity. This activity was not caused by siderophores due to the fact that they were eliminated from the supernatant. The strain 28A was observed to produce a non anionic surfactant with an emulsification index E<sub>24</sub> of 60% in 24 h. Due to the polarity of the compounds produced by *Pseudomonas* 28A, bioactivity is concentrated in the methanolic extract.

## 1. Introducción

### 1.1 Metabolitos secundarios

Los productos naturales se definen como compuestos químicos, usualmente derivados del carbono y son productos del metabolismo de los seres vivos. Las sustancias provenientes del metabolismo primario tales como esteroides, ácidos lipídicos, nucleótidos, aminoácidos y ácidos orgánicos, entre otros, son conocidas como metabolitos primarios y son generalmente comunes a todos los seres vivos. Mientras que todas aquellas moléculas que derivan del metabolismo secundario son conocidas como metabolitos secundarios.

El número de metabolitos secundarios ha sido estimado en ca.1,000,000, del 50 al 60% son producidos por plantas y el 5% por microorganismos. De estos, alrededor de 45% son producidos por actinomicetos, el 37% por hongos y 10% por bacterias unicelulares (Demain y Sánchez, 2009). En la Tabla 1 se muestran las principales fuentes de productos naturales, así como el número de compuestos conocidos y bioactivos de cada una de ellas (Bérdy, 2004).

Tabla 1. Principales fuentes de metabolitos secundarios, número de compuestos conocidos y bioactivos de cada especie (modificada de Bérdy, 2004)

Fuente	Compuestos conocidos	Compuestos bioactivos
Productos naturales	> 1,000,000	200,000 a 250,000
Plantas	600,000 a 700,000	150,000 a 200,000
Algas, líquenes	3,000 a 5,000	1,500 a 2,000
Plantas superiores	500,000 a 600,000	ca.100,000
Reino animal	300,000 a 400,000	50,000 a 100,000
Protozoarios	> 100	100 a 200
Invertebrados	ca. 100,000	¿?
Animales marinos	20,000 a 25,000	7,000 a 8,000
Insectos/gusanos	8,000 a 10,000	800 a 1,000
Vertebrados	200,000 a 250,000	50,000 a 70,000
Microorganismos	20,000 a 50,000	ca. 28,000
Bacterias	5,000 a 9,000	ca. 3,800
Actinomicetos	10,000 a 22,000	ca. 10,100
Hongos	15,000 a 25,000	ca. 8,600

El término metabolito secundario fue empleado en biología por primera vez en el año 1891 por Kossel y posteriormente modificado por Czapek en 1921 quien en su tratado de bioquímica de plantas se refirió a estos compuestos como productos finales del metabolismo primario que presentan modificaciones secundarias y son de baja abundancia <1%. En la actualidad se sabe que son moléculas de bajo peso molecular <3000 D, que poseen una amplia variedad estructural y funcional, están restringidos a ciertos grupos taxonómicos, no participan directamente en el crecimiento, desarrollo y reproducción y son generalmente referidos como productos naturales bioactivos (Bourgaud, 2001).

Los productos naturales bioactivos se definen como aquellos que poseen un efecto biológico sobre otro organismo (Bérdy, 2004) Presentan diversas actividades biológicas que han llevado al descubrimiento de nuevas drogas, antibióticos, insecticidas, fungicidas, herbicidas, parasiticidas, antihistamínicos, antitumorales y antidepresivos entre muchos otros. Sin embargo, existe también una diversidad de metabolitos secundarios que son de interés industrial, tales como los saborizantes, los colorantes, pegamentos, fibras, ceras y perfumes (Cragg y Newman *et al.*, 2007)..

La producción de los metabolitos secundarios se da generalmente a partir de la combinación de elementos procedentes de las rutas del acetato malonato, ácido shikímico y del ácido mevalónico. De acuerdo con Dewick (2009) existe una clasificación de ocho diferentes núcleos base a partir de los cuales se componen todos los metabolitos secundarios, estos se listan a continuación:

1. C<sub>1</sub>. Compuesto de un solo átomo de carbono, usualmente en forma de grupo metilo.
2. C<sub>2</sub>. Unidad de dos carbonos, puede ser sustituida por acetyl-CoA. Puede ser un grupo acetilo aunque frecuentemente forma parte de cadenas largas de alquilos o en sistemas aromáticos.
3. C<sub>5</sub>. El isopreno, unidad que proviene de mevalonato.
4. C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>. Se refiere a la unidad de fenilpropanoides que es obtenida a partir de L-fenilalanina o L-tirosina, derivados de la ruta del Shikimato.
5. C<sub>6</sub>C<sub>2</sub>N. Derivado de L-fenilalanina o L-tirosina.

Indol.C<sub>2</sub>N. Derivado de L-triptofano.

6. C<sub>4</sub>N. Usualmente encontrada como pirrolidina heterocíclica y derivada de el aminoácido no protéico L-ornitina.
7. C<sub>5</sub>N. Se produce igual que la unidad C<sub>4</sub>N, pero ocupa como precursor L-lisina en lugar de L-ornitina, se encuentra comúnmente como un sistema de anillos de piperidinas.

Recientemente se ha descubierto que los genes necesarios para la biosíntesis de policétidos, péptidos no ribosomales y terpenoides se encuentran agrupados en clusters que ocupan sitios específicos del cromosoma. Generalmente, los genes de bacterias y hongos involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios se encuentran agrupados en 30-60 kb del ADN (Bills *et al.*, 2002).

## **1.2 Metabolitos secundarios de microorganismos**

El uso de microorganismos se remonta a 8000 años atrás en procesos de fermentación de bebidas y alimentos, aunque no se tuviera conciencia de que este proceso se debía a estos microscópicos aliados (Demain y Sánchez, 2009). Si bien el primer metabolito obtenido a partir de un microorganismo fue el ácido micofenólico del hongo *Penicillium brevicompactum* en 1896 por Gosio (Zhang y Demain, 2005), fue hasta principios del siglo XIX con el descubrimiento de la penicilina por Fleming en 1928 que se dió inicio a la investigación exhaustiva y utilización de los metabolitos secundarios de origen microbiano (Knight *et al.*, 2003).

A mediados del siglo XX se suscitó un auge en los compuestos con propiedades bactericidas y fungicidas, la mayor parte de estos (50% a 60%) han sido aislados de *Streptomyces* Waksman and Henrici seguidos por las bacterias unicelulares *Bacillus* spp. Cohn. y *Pseudomonas* Mig. Sin embargo, en décadas recientes se ha dado un incremento de hasta el 50% en los compuestos obtenidos por hongos. En el grupo de hongos en general, los filamentosos producen hasta el 60% de los metabolitos aislados, lo que representa ca.6,400 compuestos, y de entre ellos, los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium* producen 900, 950 y 350 respectivamente (Tabla 2). Desde 1970 la obtención de nuevos antibióticos a partir de microorganismos se ha duplicado cada 10 años, estimándose la producción de unos 22,000 metabolitos secundarios bioactivos para el año 2002 (Bérdy, 2004).

Tabla 2. Resumen de los metabolitos bioactivos totales con respecto a la fuente de la cual se obtienen para el 2002 según Bérdy.

<b>Metabolitos secundarios bioactivos producidos por microorganismos</b>			
<b>Fuente</b>	<b>Metabolitos bioactivos</b>		<b>Metabolitos bioactivos totales</b>
	<b>No actividad antiobiotica</b>	<b>Actividad antiobiotica s/+ otra bioactividad</b>	
<b>Bacteria</b>	<b>900</b>	<b>2,900</b>	<b>3,800</b>
Eubacteriales	580	2,170	2,750
<i>Bacillus sp.</i>	65	795	860
<i>Pseudomonas sp.</i>	185	610	795
Mixobacterias	10	400	410
Cianobacterias	340	300	640
<b>Actinomicetos</b>	<b>1,400</b>	<b>8,700</b>	<b>10,100</b>
<i>Streptomyces sp.</i>	1,080	6,550	7,630
Actinomicetos poco comunes	220	2,250	2,470
<b>Hongos</b>	<b>3,700</b>	<b>4,900</b>	<b>8,600</b>
Hongos microscópicos	2,680	3,770	6,450
<i>Penicillium/Aspergillus</i>	950	1,000	1,950
Basidiomicetes	950	1,050	2,000
Levaduras	35	105	140
Mohos	20	30	50
<b>Total</b>	<b>6,000</b>	<b>16,500</b>	<b>22,500</b>

Estos compuestos son de naturaleza química variable y poseen diferentes mecanismos de acción entre los cuales se encuentran diversos compuestos antibacterianos como las cefalosporinas, las penicilinas y los aminoglicósidos; compuestos antifúngicos como la anfotericina B y la equicocandina; antitumorales como la doxorubicina, el taxol, la actinomicina y las epotilonas (Höfle y Reichenbach, 2005; Kingston, 2005; Mauger y Lackner, 2005); parasiticidas como la avermectina y la monensina; hipocolesterolémicos como la lovastatina y la mevastatina; inmunosupresores como la rapamicina y las ciclosporinas (Cragg y Newman, 2007) herbicidas como la herbimicina; insecticidas como la cordicepina (Sánchez *et al.*, 2012); pigmentos como la prodigiosina, el licopeno y los carotenoides (Joshi *et al.*, 2003) y saborizantes entre otros.

Los océanos, los manglares y las marismas, contienen una diversidad incalculable de especies microbianas. El aislamiento de microorganismos marinos ha ido en aumento desde 1993. Para el año 2000, alrededor de 100 metabolitos obtenidos de hongos marinos, aislados de sustrato, algas o esponjas, fueron descritos (Höller *et al.*, 2000). Por otra parte, Kelecom (2002) señala un incremento del 619% en el número de reportes que describen metabolitos secundarios aislados de bacterias y hongos marinos. Así mismo Höller y colaboradores (2000) encontraron que de 681 hongos aislados, la mayor parte de estos presenta al menos, actividad antibacteriana. Debido a las condiciones del medio en el que habitan, las moléculas aisladas de estos microorganismos presentan estructuras complejas y abundancia de elementos como S (13%) y Cl (8%), el 56% son compuestos nitrogenados que están mayormente constituidos por aminas, amidas y alcaloides; 13% son derivados de terpenos como diterpenos, sesquiterpenos y carotenos; y el 30% provienen de la ruta del acetato malonato principalmente acetogeninas y macrólidos (Kelecom, 2002).

Sólo el 1% de los microorganismos son cultivados en condiciones estándar, por lo que el universo de moléculas por descubrir se encuentra en el 99% restante (Kellenberg, 2001). Se ha reportado que las cepas “no cultivables” se pueden recuperar mediante la adición al medio de cultivo de lactonas, factores de crecimiento, reductores del estrés oxidativo, así como a través de medios oligotróficos (pobres en compuestos orgánicos) (Knighth *et al.*, 2003). Para conocer la diversidad de microorganismos que no pueden ser cultivados, técnicas como PCR ambiental, metagenómica, o biología molecular con enzimas de restricción, han sido sugeridas (Kusari y Spiteller, 2011).

La mayor parte de los metabolitos secundarios se producen durante la idiofase de la curva de crecimiento. Generalmente, las condiciones ambientales y nutricionales para el crecimiento no son necesariamente las mismas para la producción de metabolitos secundarios, requiriéndose para la segunda situaciones de estrés. Diversos factores tales como el pH, compuestos nitrogenados, fuente de carbono y la temperatura pueden afectar negativa o positivamente la producción de metabolitos secundarios. Un ejemplo importante es la represión catabólica por carbono en el género *Streptomyces*, en donde la producción de más de un metabolito se ve reprimida en presencia de glucosa (Ruiz *et al.*, 2010).

Alrededor de 18,500 compuestos descritos tienen actividad antibiótica dentro de la cual se cuentan 12,000 con actividad antimicrobiana, de estos aproximadamente la

mitad actúan contra Gram-positivos, una cuarta parte contra Gram-negativos y el resto contra hongos; 5,000 tienen actividad antitumoral y otros 1,500 antiviral. Este tipo de compuestos engloba 11,500 moléculas entre las cuales se hayan: las de actividad farmacológica (inhibidores de enzimas, actividad inmunológica, actividad bioquímica) con ca.7,500 compuestos y aquellas que son útiles en el sector agrícola (insecticidas, herbicidas, pesticidas, hormonas, etc.) con ca.4,000 compuestos (Bérdy, 2004).

Finalmente, existen metabolitos secundarios que no necesariamente se consideran bioactivos, dentro de estos se encuentran los que participan en el ciclo de vida de los microorganismos y también aquellos que poseen efectos biofísicos como los biosurfactantes, agentes quelantes, formadores de canales y recolectores o almacenadores de minerales.

### **1.3 Metabolitos secundarios de microorganismos asociados a plantas**

Las plantas ofrecen una gran diversidad de hábitats para los microorganismos y esta es una razón importante por la cual los microorganismos y las plantas se encuentran frecuentemente interactuando. La planta como hábitat se puede dividir en filósfera (parte aérea), rizósfera (zona donde hay influencia del sistema de raíces) y endosfera (que comprende el sistema interno de transporte). En estos tres hábitats se encuentran interacciones de epífitos, rizófitos y endófitos que pueden ser benéficas o perjudiciales para los microorganismos o para la planta. Dependiendo del tipo de interacción esta puede ser clasificada en neutralismo, comensalismo, sinergismo, mutualismo, amensalismo, competencia o parasitismo (Montesinos, 2003).

Las plantas son también productoras de metabolitos secundarios, lo que suma complejidad a la interacción con sus microorganismos, dando como resultado una fuente abundante de moléculas bioactivas (Strobel *et al.*, 2004). Las relaciones microbio-planta pueden resultar sumamente ventajosa para ambos, mientras que el microbio obtiene nutrición y protección, la planta puede obtener hormonas de crecimiento, aumento en la tolerancia a estrés ambiental, resistencia a presiones de selección tales como herbivoría, infecciones por patógenos y parasitismo por nemátodos y aumento en la competitividad del individuo por efectos alelopáticos (Tan y Zou, 2001).

### 1.3.1 Epífitos

Todas las plantas en hábitats naturales tienen una microbiota epífita asociada habitando la parte aérea o filósfera de la planta que comprende tallo, ramas, hojas, flores y frutos. Esta interacción entre microorganismos y planta se ve altamente afectada por el estado biológico del hospedero que involucra la edad de la planta, el estado fisiológico de las hojas, y la presencia de daños en los tejidos. La filósfera es un hábitat que se encuentra cambiando constantemente debido a las alteraciones ambientales como sequías o nevadas, humedad, incidencia lumínica y radiación UV, entre otras. En condiciones de estrés, las comunidades de microorganismos tienden a desplegar una amplia variedad de moléculas bioactivas para incrementar la biodisponibilidad de recursos limitados o para inhibir el crecimiento de sus competidores. A menudo este despliegue de metabolitos secundarios desata una carrera armamentista en la que se puede ver involucrado el hospedero que produce metabolitos en defensa al daño o para detoxificación de los tejidos afectados (Lindow y Brandl, 2003).

Un ejemplo de epífito es el líquen este se encuentra formado por una asociación muy estable entre hongos y algas. Estas poblaciones son capaces de producir una gran diversidad de metabolitos secundarios bioactivos que presentan una amplia variedad de efectos entre los que se enumeran antibióticos, analgésicos, antivirales y citotóxicos (Boustie y Grube, 2005).

### 1.3.2 Rizófitos

Se ha observado que diferentes especies de los géneros que incluyen *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* y *Thiobacillus* entre otros, ejercen un control biológico en contra de microorganismos patógenos de suelo disminuyendo la población de los mismos a través de diferentes mecanismos (Compant *et al.*, 2005). Estas poblaciones benéficas han sido también conocidas como bacterias promotoras del crecimiento de plantas y se encuentran asociadas a la mayoría de las especies de plantas en donde colonizan la raíz y la rizósfera. Los microorganismos promotores de crecimiento en plantas se valen de diversos mecanismos para obtener este fin, los cuales son: competencia por un nicho ecológico o sustrato, producción de aleloquímicos

inhibitorios e inducción de resistencia sistémica en la planta hospedera (Choudhary y Johri, 2009).

La competencia entre microorganismos de la rizósfera se da a través de la producción de aleloquímicos bacterianos, entre estos se incluyen los secuestradores de hierro o sideróforos como las pioverdinas o piochelinas producidos por *Pseudomonas*, los antibióticos como los lipopéptidos cíclicos (*Pseudomonas*, *Bacillus* y *Streptomyces*), oligomicina (*Bacillus*), fenazinas (*Pseudomonas*), los compuestos volátiles, las enzimas líticas como quitinasas (*Serratia marcescens*) y de detoxificación. La inducción de resistencia sistémica ha sido estudiada principalmente en bacterias del género *Pseudomonas* y recientemente en especies del género *Bacillus*, y aunque se desconoce cuál es la ruta de activación de esta respuesta, estudios recientes han demostrado que esta activación envuelve la producción de compuestos volátiles que involucran las vías de etileno y ácido jasmónico (Compant *et al.*, 2005).

### 1.3.3 Endófitos

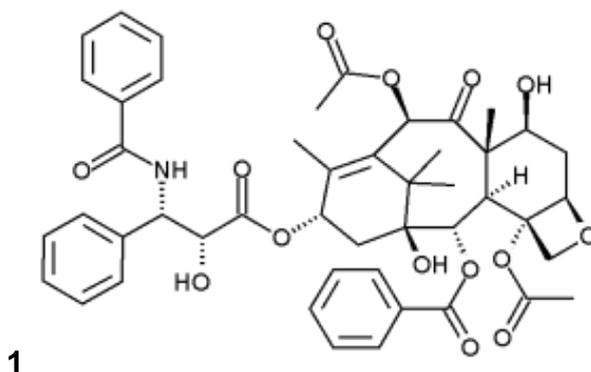
La necesidad de nuevos compuestos ha llevado a explorar una gran diversidad de fuentes, dentro de estas se encuentran cada vez con más frecuencia los microorganismos endófitos. Un microorganismo endófito es aquel que se encuentra viviendo dentro de los tejidos de las plantas. Estos microbios han mostrado gran capacidad de producir metabolitos de utilidad en la industria química, la agricultura y la medicina (Strobel y Daisy, 2003). Schulz y Boyle (2005) proponen que cualquier interacción con microbios endófitos será mutualista o simbiote, pero nunca neutra y que estos no causaran infección en sus hospederos siempre y cuando se mantenga el equilibrio entre la virulencia del endófito y la defensa del hospedero en lo que las autoras denominan “antagonismo balanceado”.

El mayor porcentaje de microorganismos endófitos que producen metabolitos bioactivos son hongos (Schulz *et al.*, 2002) (Tabla 3) aunque también se han reportado ejemplos de bacterias del género *Streptomyces* y *Pseudomonas*.

#### *Maravilloso Taxol*

El estudio de metabolitos de microorganismos endófitos ha ganado terreno gracias al antitumoral taxol **1**, comercialmente conocido como Paclitaxel, un diterpeno producido por las 11 especies del género *Taxus* o árbol del tejo que presenta una importante

actividad antitumoral (Strobel *et al.*, 1996a). Para finales de los 70's se determinó, gracias a los estudios realizados hasta esa fecha, que el mecanismo de acción del taxol era único ya que promueve la polimerización de los heterodímeros de tubulina, evitando que los cromosomas se separen conduciendo así al arresto de la mitosis (G2/M) (Cragg y Newman, 2007; Strobel y Daisy, 2003). En 1993 se descubrió que el hongo endófito de *Taxus brevifolia*, *Taxomyces andreanae* podía producir taxol al igual que su hospedero, industrialmente esto generó expectativas para producir mayor cantidad del compuesto a través de fermentaciones a gran escala (Stierle *et al.*, 1993; Strobel *et al.*, 1996b), aunque la producción de taxol en *T. andreanae* es baja (50 ng/L), comparada con la obtenida de cultivos de tejido vegetal añadiendo ácido jasmónico (115 mg/L). Además de *T. andreanae* existen otros hongos endófitos aislados del género *Taxus* que tienen la capacidad de producir taxol como *Fusarium lateritium* 130 ng/L, *Monochaetia* sp. 102 ng/L, *Pestalotia bacillia* 1081 ng/L, *Pestalotiopsis microspora* 500 ng/L y *Periconia* sp. 800 ng/L (Cragg y Newman, 2007).

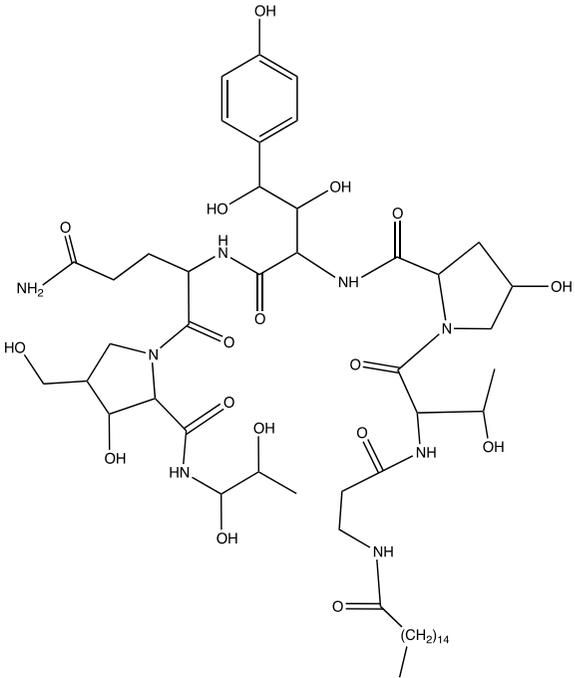


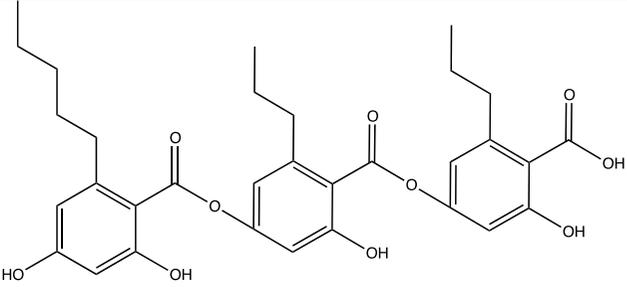
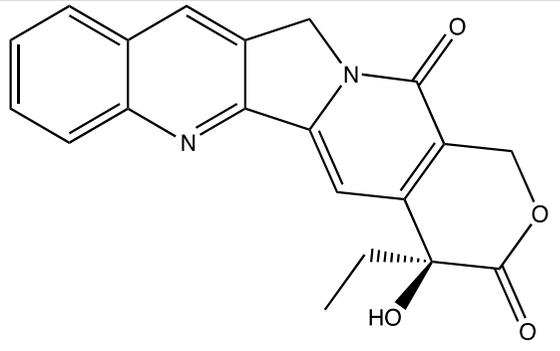
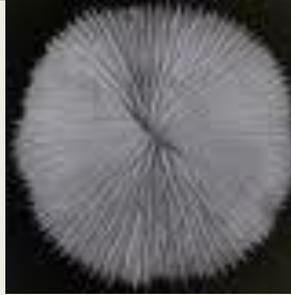
#### **1.4 Selección de la planta para el aislamiento de microorganismos productores de moléculas bioactivas**

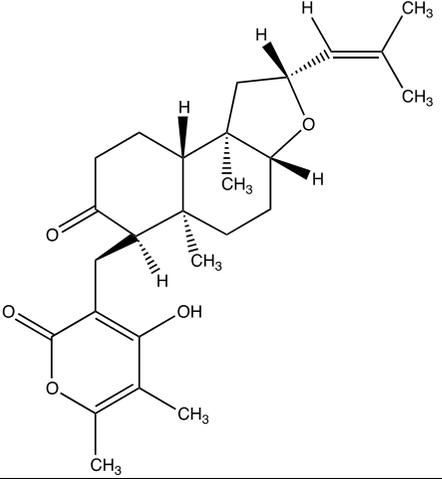
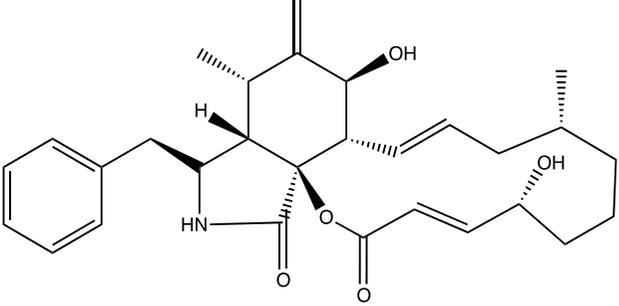
Aunque todas las plantas son posibles modelos de estudio, es preferible realizar un tamizaje para seleccionar el material vegetal y se ha propuesto tomar en cuenta lo siguiente: que sean plantas de ambientes únicos, sobre todo aquellas que tengan estrategias poco convencionales para sobrevivir o una biología distinta; plantas que tengan antecedentes etnobotánicos y que estén relacionados con el propósito de la investigación; plantas endémicas, que sean inusualmente longevas o que se encuentren

ocupando extensiones de tierra poco convencionales; y finalmente, plantas que crezcan en áreas de gran biodiversidad (Strobel y Daisy, 2003).

TABLA 3. Ejemplos de microorganismos endófitos que producen compuestos con actividad biológica, así como la estructura de la molécula y el mecanismo de acción. Tabla elaborada con información contenida en Tan y Zou (2001).

Tipo de actividad	Nombre del compuesto	Estructura	Endófito que lo produce	Planta hospedera
<b>Antibiótica</b>	Criptocandina		 <p><i>Pezicula cinnamomea</i></p>	 <p><i>Tripterygium wilfordii</i></p>

Tipo de actividad	Nombre del compuesto	Estructura	Endófito que lo produce	Planta hospedera
<b>Antiviral</b>	Ácido citónico A		<i>Cytonaema sp.</i>	 <i>Quercus sp.</i>
<b>Antitumoral</b>	Camptotecina		 <i>Entrophospora infrequens</i>	 <i>Nothapodytes foetida</i>

Tipo de actividad	Nombre del compuesto	Estructura	Endófito que lo produce	Planta hospedera
<b>Inmunosupresor</b>	Subglutinol B		 <p data-bbox="1417 502 1601 571"><i>Fusarium subglutinans</i></p>	 <p data-bbox="1727 502 2024 529"><i>Tripterygium wilfordii</i></p>
<b>Insecticida</b>	Citocalasina B		 <p data-bbox="1384 975 1635 1007"><i>Rhinocladiella sp</i></p>	 <p data-bbox="1727 959 2024 991"><i>Tripterygium wilfordii</i></p>

\* La especie de la que se aisló el endófito *Pseudomassaria* sp. que produce el compuesto L-783,281 no es mencionada en la referencia.

## 1.5 Las Magnolias como modelos de estudio

Se estima que el número de moléculas extraídas a partir de las plantas es cuatro veces mayor que en los microorganismos (Ramachandra y Ravishankar, 2002). Alrededor de 119 compuestos puros han sido extraídos de 90 especies de plantas. La medicina tradicional con plantas ha sido empleada desde hace miles de años y en la actualidad continua siendo fundamental en el descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas. China cuenta con el mayor número de plantas medicinales registradas con alrededor de 5,000 y México ocupa el quinto lugar en biodiversidad de plantas y el segundo lugar en cuanto a especies de plantas con antecedentes etnobotánicos con 4,500 especies (Cragg y Newman, 2007), esto sumado a las características geomorfológicas del territorio mexicano, lo convierte en sede de numerosas plantas candidatas para realizar la búsqueda de endófitos.

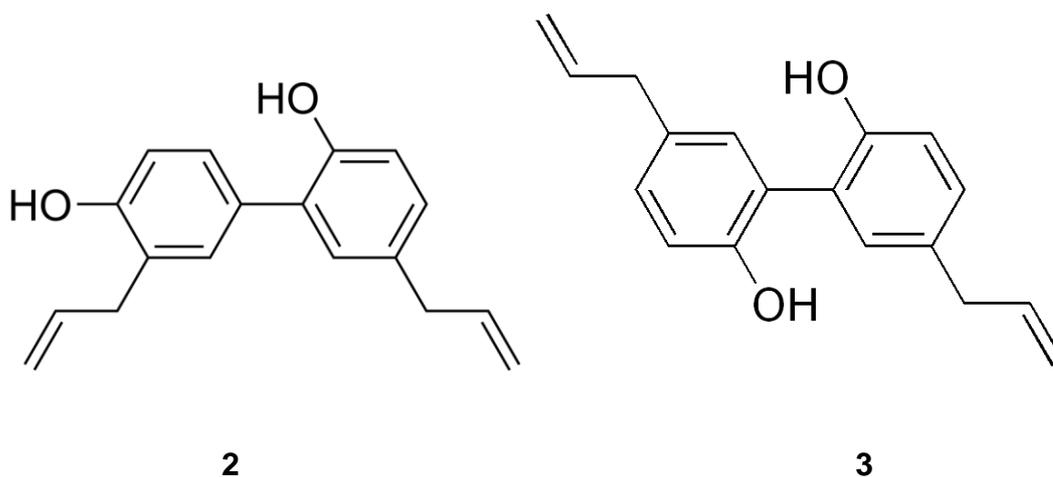
La “*Magnolia mejicana*” ha sido registrada como planta de uso medicinal desde los aztecas, se reporta que la planta además de ser considerada ornamental y emitir una fragancia cautivadora, posee propiedades medicinales para combatir afecciones respiratorias y circulatorias (Pijoan, 2003). Aunque los géneros *Magnolia* y *Liriodendron* también se encuentran en Norte América, se considera que el centro de diversificación de la familia está en Asia, y es por esta razón que la mayor parte de los reportes de actividad biológica son de estas regiones, estos mencionan que los extractos de diferentes partes de la planta se han empleado como laxantes, contra la fiebre tifoidea, el reumatismo y la tos y como analgésico, antidiarreico y antihelmíntico (Yung-Hsiang *et al.*, 2011; Kotani *et al.*, 2005). Estudios recientes muestran que la principal clase de productos naturales en el árbol son compuestos bifenólicos, diversos lignanos (fenilpropanoides) y lactonas (sesquiterpenos) (Schühly *et al.*, 2001).

*Magnolia* es un género monofilético de plantas que comprende 120 especies que pertenecen a la familia de las Magnoliaceae. El nombre del género se debe al botánico francés Pierre Magnol. Mantiene numerosos caracteres florales plesiomórficos, como los carpelos y los estambres arreglados en forma de espiral, ovario súpero y embriones pequeños con endospermo copioso. Presentan inflorescencias dioicas solitarias con flores terminales. Son árboles leñosos. Se distribuyen principalmente en bosques de zonas tropicales al este de Norte América y Asia (Judd *et al.*, 2010). El subgénero *Magnolia* se divide en ocho secciones las cuales son: *Magnolia*, *Gwillimia*,

*Talauma*, *Manglietia*, *Kmeria*, *Rhytidospermum*, *Auriculata* y *Macrophylla* de las cuales *M. dealbata* pertenece a la sección *Rhytidospermum*.

### 1.5.1 Sección *Rhytidospermum*

Las especies de la sección *Rhytidospermum*, *Magnolia obovata* (Kotani *et al.*, 2005), *Magnolia officinalis* (Yung-Hsiang *et al.*, 2011) y *Magnolia dealbata* Zucc. (Alonso-castro *et al.*, 2011) han mostrado la presencia de dos isómeros bifenólicos, honokiol (HK) **2** y magnolol (MG) **3** en extractos con disolventes polares (Kotani *et al.*, 2005). Ambos compuestos se encuentran mayoritariamente en corteza y raíz y poseen bioactividad como tranquilizantes, antitumorales (Bai *et al.*, 2003), antibacteriales, antidiabéticos y para el tratamiento de la epilepsia, enfermedades del corazón e hipertensión (Alonso-Castro *et al.*, 2011).



### 1.5.2 *Magnolia dealbata* Zucc.

*Magnolia dealbata* (Figura 4) popularmente conocida como Eloxochitl es endémica de México, recibe su nombre del botánico alemán Joseph G. Zuccarini quien en 1836 describiera la planta (IPNI, 2012. Recurso en red). Son árboles de 40 a 50 m de altura, de corteza café oscura con tricomas, las hojas miden hasta 20 cm desde el peciolo hasta la punta y presentan tricomas en el envés, las flores son sumamente vistosas, blancas y aromáticas. Se encuentra distribuida en los bosques de niebla (1,500-1,800 metros sobre el nivel del mar) en seis poblaciones heterogéneas de bosques de encinos: Oaxaca, Querétaro, Veracruz, Hidalgo y San Luis Potosí; es el único representante de la

sección *Rhytidospermum* en México. Debido a la baja abundancia de individuos en las poblaciones, es considerada como especie en peligro de extinción por la legislación mexicana en la NOM-059-SEMARNAT-2001 (Velazco-Macías, 2008), y en la categoría EN por el Red Data Book en 1994 (Gutierrez y Vóvides, 1997). Cuenta con registros de usos etnobotánicos para tratar problemas nerviosos, enfermedades del corazón, respiratorias y como diurético.

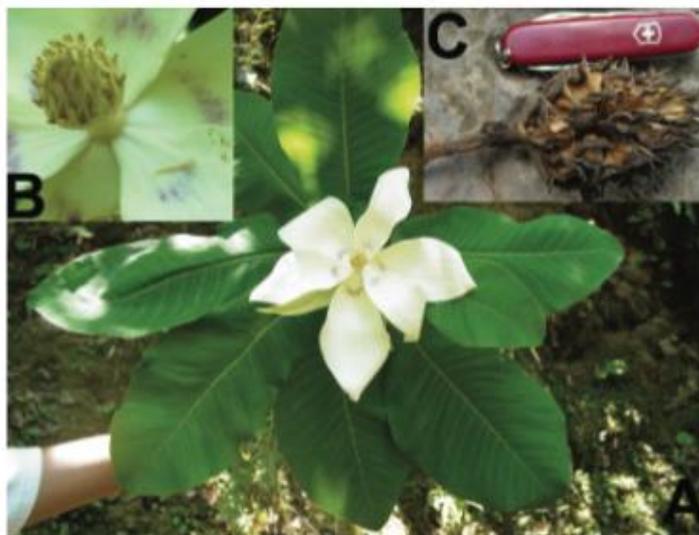


Figura 4. Fotografía de *Magnolia dealbata* Zucc. Se observa la flor, el fruto y las hojas de *M. dealbata* (Tomada de Velazco-Macías *et al.*, 2008). A. Flor de *Magnolia dealbata* con hojas. B. Acercamiento a la flor. C. Fruto seco.

Al igual que sus parientes, *M. dealbata* produce HK y MG. Se ha reportado que el contenido de HK en *M. dealbata* es 2.1 veces más alto que en *M. officinalis* y 23.5 veces mayor que el reportado para *M. obovata* (Alonso-Castro *et al.*, 2011). A pesar de los antecedentes, se han realizado pocos estudios cualitativos y cuantitativos experimentalmente de la bioactividad del HK y MG de *M. dealbata*. Jacobo-Salcedo y colaboradores (2011) demostraron que el HK y MG son activos contra las cepas de patógenos resistentes *Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter Iwoffii*, *Candida albicans* y *Candida tropicalis*, y que los efectos de toxicidad son relativamente bajos. También señalaron que la mezcla de HK + MG tiene un efecto aditivo para la inhibición de *C. albicans* y *C. michiganensis*, mientras que el efecto de los extractos puros es equiparable al del control positivo (Neomicina) para el caso de *P. aeruginosa*.

A pesar de que la planta se encuentra en peligro de extinción, tras la estandarización de las condiciones, se han establecido exitosamente técnicas de propagación *in vitro* conservando la producción de los metabolitos, a partir del crecimiento del callus de la hoja en medio Mueashige y Skoog (Domínguez *et al.*, 2009).

## **1.6 El grupo de las *Pseudomonas***

La familia de bacterias *Pseudomonadaceae* pertenece a las Gammaproteobacterias y agrupa ocho géneros. Estas bacterias son oxidasa positivas, no fermentativas, aeróbicas y quimioheterótrofas, se mueven a través de uno o más flagelos polares, no esporulan y como característica especial, todas metabolizan glucosa a través de la ruta Entner Doudoroff. El genoma varía de 4.6 a 7.1 Mb y el contenido de GC es de 57.8 a 66% (Palleroni, 1983).

Ocupan el segundo lugar dentro de las bacterias unicelulares en producción de metabolitos secundarios con alrededor de 800 (Bérdy, 2004). Estos poseen importantes funciones en la adquisición de nutrientes, defensa y competencia. Los miembros de este grupo se distinguen por la producción de pigmentos, factores de patogenicidad y diversos atributos fisiológicos (Edwin *et al.*, 1945).

### **1.6.1 El grupo de *pseudomonas fluorescentes***

Las *pseudomonas fluorescentes* engloban bacterias que habitan el suelo, agua y tejidos vivos de plantas o animales. Comprende a los grupos *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas aureofaciens* y los patógenos de plantas *Pseudomonas cichorii* y *Pseudomonas syringae* (Meyer y Abdallah, 1978). Son el grupo más estudiado dentro de las especies de *pseudomonas* debido a su gran capacidad para producir compuestos bioactivos. La característica distintiva de este grupo es la producción de pigmentos fluorescentes verde-azulados o verde-amarillo de estructura química variable, solubles en agua, generalmente sideróforos (Leisinger y Margraff, 1979). Dentro de estas se encuentra el grupo de *Pseudomonas aeruginosa* que particularmente produce piocianina, tiene termotolerancia, numerosos flagelos y son patógenos oportunistas de humanos

causando enfermedades nosocomiales de relevancia ya que presentan multirresistencia a una gran variedad de antibióticos (Stanier *et al.*, 1966; Meyer y Abdallah, 1978; Anzai *et al.*, 2000).

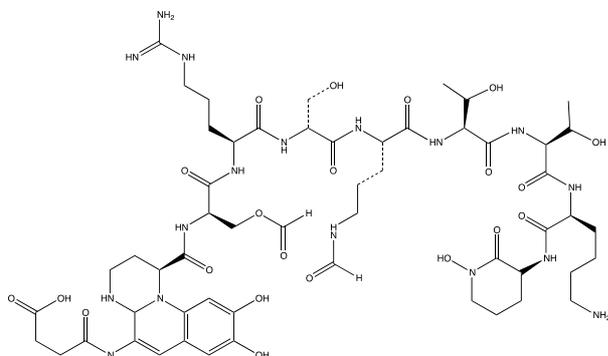
*Pseudomonas* como endófito ha sido descrita con anterioridad por Bérdy (2004) quien las reporta como bacterias asociadas a plantas que pueden vivir en o dentro de los tejidos de la planta. Las *pseudomonas* fluorescentes han establecido estrechas relaciones con las plantas, se han encontrado en la rizósfera, como patógenos y endófitos de las mismas. El despliegue de metabolitos bioactivos como consecuencia de las interacciones ecológicas ha culminado en la relación “mutualista-parásita” microbio-planta (James y Gutterson, 1986).

La producción de metabolitos secundarios por el grupo ha sido ampliamente reportado (Budzikiewicz, 1993; Gross y Loper, 2009). Ejemplos de compuestos producidos por las *pseudomonas* fluorescentes son: pigmentos como pioverdinas **5** y piochelinas; lipopéptidos dentro de los cuales se agrupan los surfactantes como los ramnolípidos **6** (Raaijmakers *et al.*, 2006); fenacinas como la piocianina **7**; pirroles como la pioluteorina **8**; aminoácidos y péptidos dentro de los cuales se engloban las toxinas faseolotoxina **9** y tabtoxina; pterinas como la putidolumacina **10**, derivados del indol como el ácido indolacético **11** y compuestos de diversa naturaleza química que incluyen a la pseudomicina y ácido pseudomónico **12**.

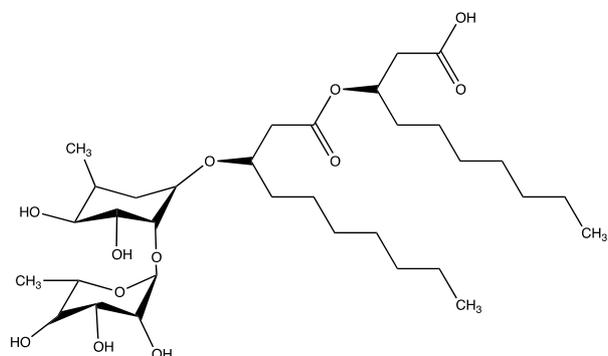
### **1.7 Necesidad por encontrar nuevas moléculas bioactivas**

Las farmacéuticas más importantes abandonaron la búsqueda de nuevas moléculas hace 15 años. Sin embargo, los antibióticos basados en productos naturales han tenido un repunte (Rokem *et al.*, 2007) debido al aumento de las cepas resistentes a más de un antibiótico, el surgimiento de nuevos patógenos, el incremento en la incidencia de enfermedades crónicas como la diabetes, hipertensión y cáncer, las neurodegenerativas como el Parkinson y Alzheimer, y las enfermedades virales como el SIDA. Todas estas afecciones a la salud representan un reto constante para todos los agentes quimioterapéuticos (Bérdy, 2004). El auge de la nueva era de los metabolitos anti-infectivos ha sido tal, que sólo de la venta de antibióticos hubo un incremento de 11 billones de dólares en el periodo de 2000 a 2007 (Demain y Sánchez, 2009).

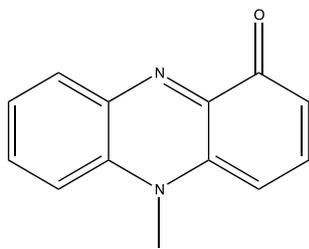
5



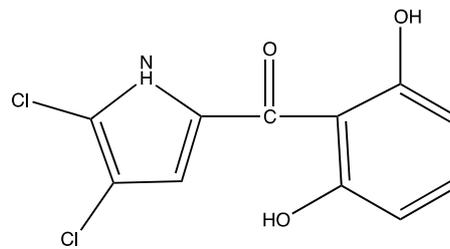
6



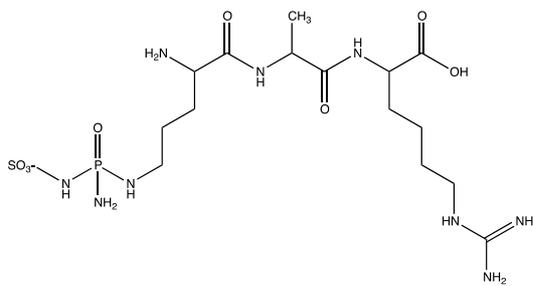
7



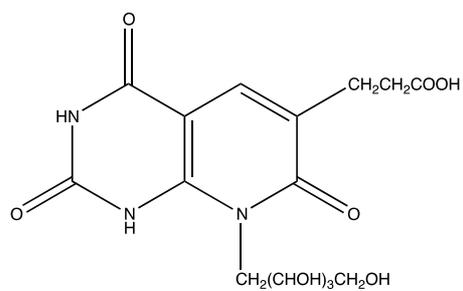
8



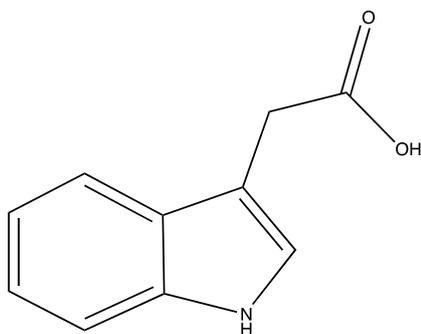
9



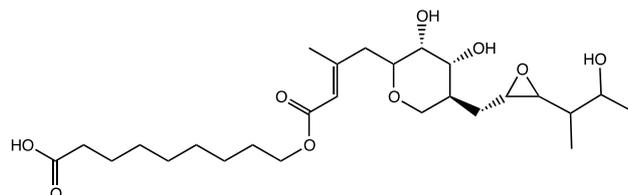
10



11



12



El avance en las tecnologías ha sido innegable, la síntesis química, librerías y el diseño de moléculas dirigidas a blancos específicos, han ayudado a mejorar la propiedades farmacocinéticas de los compuestos. Sólo la producción de penicilinas sintéticas excede las 60,000 toneladas y la mayor parte de esta se obtiene a partir de síntesis química. Herramientas de identificación novedosas así como la biología molecular, han permitido generar cepas de *Penicillium chrysogenum* que producen hasta 100,000 veces más penicilina que la descrita por Fleming a principios del siglo XIX (Rokem *et al.*, 2007).

A finales del siglo XX la eficiencia en la investigación de moléculas bioactivas disminuyó abruptamente, paradójicamente el número de nuevas moléculas continuaba en aumento principalmente debido a la síntesis de análogos de estructuras ya conocidas. En el periodo de 1981 a 2002 alrededor de la mitad de los fármacos estaban basados en las estructuras de productos naturales (Sánchez *et al.*, 2012), para el periodo de 2003 a 2006, cuatro de los nueve compuestos antifúngicos y antibacteriales recién aprobados derivaron de estos mismos. (Jesse *et al.*, 2009; y Cragg y Newman, 2007).

Las principales ventajas y desventajas del uso de productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos han sido enlistadas por Knight y colaboradores (2003), dentro de las primeras destacan: la diversidad química, la complejidad estructural y la potencia biológica así como el descubrimiento de nuevos mecanismos de acción y la utilidad de estas moléculas para la síntesis química de nuevos compuestos y librerías combinatoriales.

Es importante considerar que en la búsqueda de nuevos metabolitos, la suerte y la persistencia son elementos que juegan un papel importante, pero quizá el riesgo económico que implica el capital invertido, así como el tiempo que conlleva el proyecto de investigación son las principales desventajas en la búsqueda de moléculas bioactivas (Bills *et al.*, 2002). Los microbiólogos deben trabajar en conjunto con los ecólogos y biólogos para aislar la mayor cantidad posible de microorganismos y buscar las mejores condiciones de producción de los mismos (Demain y Sánchez, 2011).

## 2. Objetivos

### General

- Evaluar la capacidad de microorganismos asociados a *Magnolia dealbata* Zucc. para producir compuestos con actividad antibiótica y en su caso, caracterizar los mismos.

### Particulares

- Aislar poblaciones de microorganismos endófitos asociadas a la especie *Magnolia dealbata*.
- Evaluar el potencial de los microorganismos asociados a *M. dealbata* para producir compuestos con actividad antibiótica.
- Identificar y caracterizar los microorganismos capaces de producir actividad biológica.
- Fraccionamiento químico biodirigido del extracto orgánico

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1. Aislamiento de poblaciones de microorganismos asociados a la especie *Magnolia dealbata* Zucc.

##### 3.1.1 Colecta del material biológico

La colecta se realizó en septiembre del 2009 en el municipio de Coyopolan con las coordenadas 19° 21'05.9'' N y 97° 03'30.8'' W a 1591 m snm. y el ejemplar de respaldo voucher colectado por el M. en C. Álvaro Campos se encuentra depositado en el Herbario de la Estación de Biología Tropical de los Tuxtlas con el número de colecta 6469. Se colectaron muestras de corteza, raíz, hojas, ramas y frutos de dos árboles de distintos tamaños de 3 ½ y 12 m respectivamente de *Magnolia dealbata* Zucc. Se realizó un corte tangencial de la corteza y un corte transversal de la raíz procurando la profundidad suficiente para llegar a los tejidos vasculares (Fig. 13). Preliminarmente, la superficie a cortar se limpió con etanol al 70% y se pasó una flama. Las hojas y ramas se colectaron completas. Se trabajó con guantes. El material se transportó en una hielera y en bolsas de plástico selladas que contenían agua destilada esterilizada. Las muestras se procesaron al día siguiente, se lavó el material en el chorro de agua destilada, posteriormente con alcohol al 50 y 70% durante 30 min y se enjuagó con agua destilada. En campana de flujo laminar se realizaron cortes por duplicado del material de aproximadamente 3 cm de largo con navaja de afeitar para poder sembrarlo en cajas Petri con AN (Agar Nutritivo) y Czapek+cloranfenicol. Para el caso de la raíz y ramas se realizó un corte medio; la corteza se sembró del lado opuesto al tejido leñoso; el fruto fue cortado en diferentes fragmentos y para las hojas se realizaron cortes paralelos a la superficie foliar. El agua en la que se transportó el material también se inoculó en cajas petri. Todas las cajas se incubaron a 29°C.

Se aislaron y resembraron las colonias morfológicamente diferentes hasta obtener cultivos puros.



Figura 13. Fotografías de la colecta de fragmentos de la planta *in situ*. A) Corte realizado en la corteza y B) acercamiento de la corteza después del corte.

### 3.1.2 Caracterización de cepas

Con base en sus características macroscópicas se realizó una separación parcial de las cepas de hongos y de bacterias en microscopio estereoscópico. Las cepas bacterianas fueron analizadas mediante una tinción de Gram (Anexo 2) realizando observaciones por microscopía óptica..

## 3.2. Evaluación del potencial para producir compuestos con actividad biológica de los microorganismos asociados a *M. dealbata* Zucc.

En esta investigación se trabajó únicamente con las bacterias que presentaron actividad.

Con el fin de determinar si alguno de los microorganismos aislados poseía alguna actividad biológica, se realizaron ensayos de antibiosis. Para el crecimiento de las cepas de interés se utilizaron los medios líquidos: Caldo Nutritivo (CN), para las pruebas de antibiosis, King B (KB) para la producción de sideróforos, Proteose-Peptone y Ammonium Salts (PPGAS) para las extracciones con disolventes.

### 3.2.1 Determinación de actividad antibacteriana

Cada uno de los microorganismos aislados se inoculó como una línea al centro de la caja Petri conteniendo el medio agar nutritivo (AN). Las cajas inoculadas se incubaron a 29°C durante 24 h para bacterias y hasta por 168 h para hongos. Una vez crecidas las cepas se estriaron por duplicado con las cepas de los microorganismos prueba (Fig. 14). Los microorganismos prueba empleados fueron *Micrococcus luteus* Cohn (Gram positivo) ATCC 9341 y *Bacillus subtilis* Ehrenb (Gram positivo) ATCC 6633, se incubaron a 29°C en cajas de agar nutritivo y *Escherichia coli* Mig (Gram negativo) ATCC 11229 y *Saccharomyces cerevisiae* Meyen (levadura) ATCC 9763 que se incubaron a 37°C también en agar nutritivo. La incubación de los microorganismos se realizó durante 24 h.



Figura 14. Esquema de la prueba de antibiosis por estriado. Se muestra el microorganismo a evaluar en el centro de la caja. Se estriaron por duplicado las cepas de microorganismos prueba a cada lado del microorganismo a evaluar.

### 3.2.2 Actividad de honokiol y magnolol

Se colocó honokiol y magnolol puros en un biodisco, este a su vez se colocó al centro de una caja petri conteniendo 30 mL de AN. Por duplicado se estriaron las cepas de microorganismos prueba alrededor del biodisco. La caja se incubó a 4°C por 2 h y posteriormente a 37°C durante la noche.

### 3.2.3 Determinación de actividad citotóxica

Para determinar si el sobrenadante de caldo nutritivo de las bacterias seleccionadas 14A, 24A y 28A presentaban algún tipo de actividad citotóxica, se realizaron pruebas de viabilidad celular utilizando una sal de tetrazolio, que consisten en un método colorimétrico basado en la reducción del Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)2.5-difeniltetrazol (MTT) a formazan por las enzimas mitocondriales succinato deshidrogenasa. Se ocuparon las líneas celulares tumorales HeLa (cáncer cervicouterino), MCF-7 (cáncer de mama) y HepG2 (cáncer de hígado) en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). El bioensayo se realizó por triplicado empleando cajas de 96 pozos y 5,000 células por pozo. Como control positivo de citotoxicidad se colocaron 20 µL de Cis-Dicloro-Diamino-Platino (CDDP) 100 µg/mL. La actividad se evaluó utilizando seis pozos conteniendo 0.5 µL, 1 µL, 10 µL y 50 µL del sobrenadante concentrado de la cepa 14A, seis pozos conteniendo 0.5 µL, 1 µL, 10 µL y 50 µL de la cepa 24A. seis pozos conteniendo 0.5 µL, 1 µL, 10 µL y 50 µL de la cepa 28A y los respectivos controles: seis pozos con 20 µL de CDDP, seis con 20 µL de NB y 12 como controles negativos. Previamente el sobrenadante fue concentrado 10 veces en SpeedVac Concentrator Savant ISS110 (Thermo Scientific) (Fig. 15). Posterior a 48 h de incubación de la placas a 37°C, se colocaron en cada pozo 10 µL de MTT disuelto en Phosphate Buffered Saline (PBS) a una concentración de 5 mg/mL. Las cajas se incubaron durante 4 h. Finalmente las placas se revelaron agregando 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada pozo, se agitaron suavemente por 10 minutos y se midió la absorbancia a 540 nm.

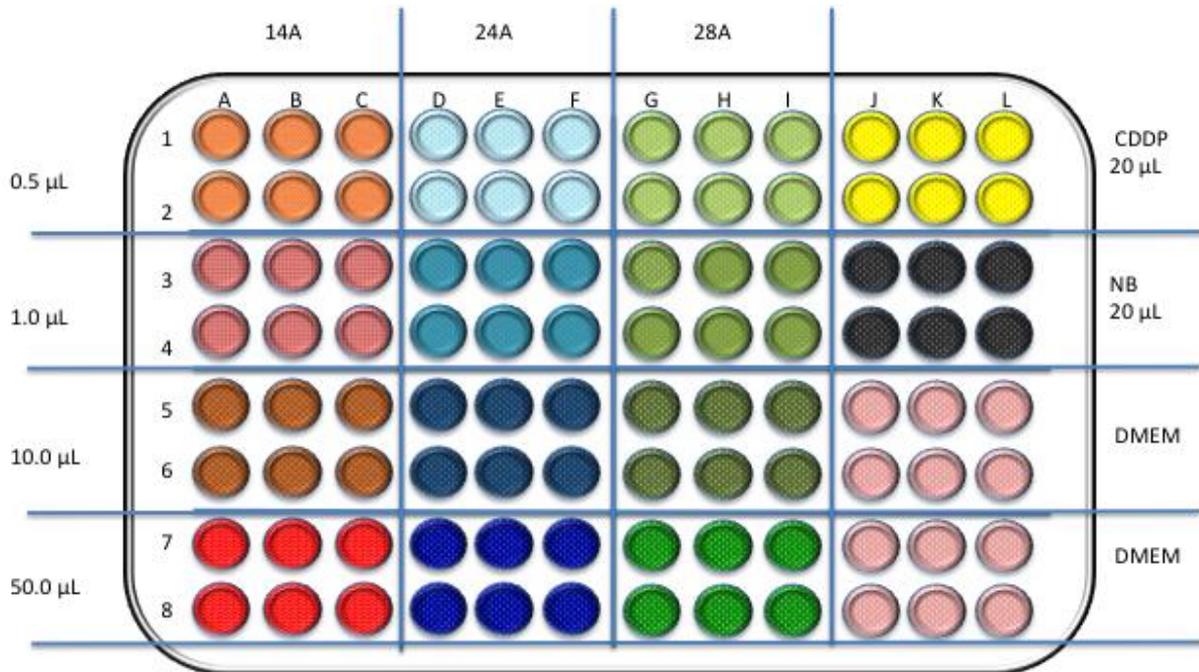


Figura 15. Diagrama de la colocación de las muestras para la prueba de 96 pozos de líneas celulares tumorales.

Con la finalidad de saber si los sobrenadantes también ejercían citotoxicidad sobre células normales, La prueba anterior se realizó para la línea celular de queratinocitos HaCaT. Un litro del medio PPGAS se inoculó con 0.1% del preinóculo de la cepa 28A precrecida en medio PPGAS y se incubó por 48 h a 180 rpm. El sobrenadante libre de células se fraccionó con MeOH y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> v/v obteniéndose tres fracciones, una en MeOH, otra en una mezcla 50:50 de MeOH: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y otra en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se eliminó el disolvente por destilación y las fracciones secas se recuperaron con agua miliQ ajustando la concentración a 200, 100 y 50 µg/mL. Se agregaron 10 o 20 µL de cada tratamiento a seis pozos conteniendo 5000 células y 20 µL de cisplatino a 100 µg/mL. Esta prueba se realizó por triplicado empleando como control positivo 20 µL de CDDP 100 µg/mL y el control negativo del medio DMEM.

### 3.3. Identificación de los microorganismos que presentaron actividad antibiótica.

#### 3.3.1 Identificación molecular

Debido al patrón de antibiosis mostrado, se seleccionaron 8 cepas bacterianas para su identificación, las cuales fueron: 1AC, 1AD, 1AE, 14A, 16A, 21A, 24A y 28A.

Para la identificación molecular por la secuencia de ADNr 16S se llevó a cabo una extracción de DNA genómico de todas las cepas según el método miniprep reportado por Ausubel y colaboradores (1994). Se amplificó por Polymerase Chain Reaction (PCR) el gen que codifica para el ADNr 16S utilizando los oligonucleótidos Fwd: 5'CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCATGGCTCAG 3' y Rev 5' CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT 3' (Weisburg *et al.*, 1991). La purificación del amplicón obtenido se realizó con el kit de extracción QIAEXII (Qiagen). Una vez purificado, el amplicón fue ligado a un vector para clonación de productos de PCR, en este caso el pGEM T-easy (Promega). La ligación obtenida fue transformada por electroporación en la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$ . Las cepas que mostraron la presencia del plásmido recombinante, fueron cultivadas para el aislamiento del plásmido y su posterior secuenciación. La secuencia obtenida fue comparada con las bases de datos de la NCBI utilizando el programa Basic Alignment Search Tool (BLAST).

Para las siguientes pruebas, el preinóculo de las cepas bacterianas 1AC, 1AD, 1AE, 14A, 16A, 21A, 24A y 28A se creció en medio KB por 24 h a 29°C con agitación a 180 rpm.

#### 3.3.2 Análisis por microscopía electrónica de barrido

Con el fin de realizar una identificación global de las cepas, se realizaron tinciones diferenciales de pared celular, en este caso usando la tinción de Gram. Las preparaciones de la tinción de Gram se observaron utilizando un microscopio óptico de campo claro marca Carl Zeiss.

Del mismo modo, se realizaron observaciones al microscopio electrónico de barrido. Para ello se incubaron por 12 h cultivos de las 8 cepas a identificar, se tomó 1 mL de sobrenadante y se colocó en un biodisco. Posteriormente las muestras se deshidrataron gradualmente con lavados sucesivos de etanol 30%, 50%, 70%, 96% y

100% durante 30 min. cada uno, por último se realizó un lavado con acetona por 30 min. Las muestras se deshidrataron a punto crítico con CO<sub>2</sub>, se bañaron con oro y se realizó un recubrimiento final con plata para observarlas al microscopio electrónico JEOL JSM-6360LV Scanning Electron Microscope (JEOL E.U.A.).

### 3.3.3 Caracterización bioquímica

Para determinar la utilización de distintas fuentes de carbono y la susceptibilidad a antibióticos de las cepas aisladas, se utilizó el equipo VITEK 2. Las ocho cepas se sembraron en cajas de agar nutritivo y se dejaron incubar 24 h a 29°C. El inóculo de cada cultivo se ajustó con solución salina a 0.5-0.63 en la escala de Mc-Farland. Se ocuparon tarjetas GN-fermentación de bacterias Gram-negativas y no fermentadoras y GP-cocos y bacilos no formadores de esporas.

#### *Producción de pigmentos*

Con el fin de establecer la presencia de cepas del género *Pseudomonas*, se decidió determinar la producción de pigmentos fluorescentes. Para esta determinación se inocularon matraces de 250 mL con 50 mL de medio KB con 0.1% de preinóculo, se incubaron a 29°C a 180 rpm durante la noche y una vez transcurrido el tiempo, se observaron con luz UV en un UVP Dual Intensity Transilluminator.

El mismo ensayo se realizó en medio sólido sembrando las cepas en cajas de medio KB con 1.5% de agar las cuales fueron incubadas a 29°C durante toda la noche y posteriormente se observaron con luz UV.

#### *Separación de sideróforos.*

Tomando en cuenta la posibilidad de que las cepas fueran capaces de producir sideróforos que pudieran interferir en las pruebas de citotoxicidad, se decidió separarlos de los sobrenadantes. Para reprimir la expresión de sideróforos se crecieron las cepas en medio KB y CN por 48 h a 29°C con agitación a 180 rpm. A tres matraces de 250 mL con 50 mL de medio KB y tres con CN se les agregó diferentes concentraciones de

Sulfato Ferroso y de Citrato Férrico (0.012%, 0.025% y 0.05%), respectivamente. Los controles consistieron en cultivos de CN y KB sin sulfato o citrato. Paralelamente se realizaron fermentaciones de las cepas por 48 h en medio KB y CN, el sobrenadante sin células se colocó en tubos falcón, por separado se les añadió 0.05% de Sulfato Ferroso o Citrato Férrico, los tubos se agitaron por inversión. En todos los casos, la presencia o ausencia de fluorescencia se observó mediante luz UV.

La separación de sideróforos se llevó a cabo a través de columnas de 1 mL en tubos eppendorf de 1.5 ml de sefaroosa quelada con  $\text{CuSO}_4$  (Anexo 2) de acuerdo a Xiao y Kisaalita, (1995). Se realizó un lavado con buffer HEPES 120 mM + NaCl 100 mM v/v y nueve lavados posteriores con buffer de acetatos 20 mM + 100 mM NaCl. Fracciones de 1 mL se observaron con luz UV y se les realizaron antibiogramas utilizando el método de difusión por agar (prueba de Kirby-Bauer) para evaluar la bioactividad de los metabolitos producidos de acuerdo al método Kirby-Bauer (Joklik et al., 1999) contra *M. luteus* y *B. subtilis*. Debido a que los sideróforos absorben a 400 nm, adicionalmente se realizó un barrido espectrofotométrico de 190 a 800 nm para cada fracción para verificar la presencia o ausencia de los mismos.

#### *Producción y extracción de piocianinas*

Con el objetivo de establecer si la cepa 28A era *Pseudomonas aeruginosa*, se decidió establecer la presencia de piocianinas. La cepa 28A se inoculó con 1% del preinóculo en matraces con 50 mL de medio KB por 24 h a 29°C con agitación a 180 rpm. Se agregó cloroformo a 5 mL de sobrenadante libre de células en proporción 2:3, se agitó y dejó reposar. Se acidificó el medio con 1 mL de HCl 0.2 N y se extrajeron las piocianinas. Para la cuantificación se midió la absorbancia a 520 nm.

#### *Índice de emulsificación*

Para determinar la presencia de agentes surfactantes en la cepa 28A, se calculó el índice de emulsificación de acuerdo con Coimbra y colaboradores (2008) dividiendo la altura total de la emulsión entre el volumen total de la mezcla y el resultado se multiplicó por cien. Se tomaron 2 mL de sobrenadante libre de células de la cepa 28A crecida en medio KB, se le agregó un volumen igual de DIESEL y se agitó en vortex durante dos

minutos. Posteriormente se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente, se observó la formación de la emulsión 24 h después.

### *Producción de ramnolípidos*

Para determinar la presencia de ramnolípidos en las cepas aisladas se elaboraron dos cajas de medio PPGAS suplementado con 2.5 mg/mL de azul de metileno y 200 µg/mL de Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB). Matraces de 50 mL de medio KB se inocularon con 1% del preinóculo de las cepas 1AB, 1AD, 1AE, 14A, 16A, 21A, 24A y 28A. Se colocaron en biodiscos 27 µL del sobrenadante sin células concentrado 10 veces. Las cajas se incubaron por 24 h a 29°C y se observó la formación de halos para cada caso. Se empleó como control positivo a la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

### *Termoestabilidad*

Los compuestos con actividad antibiótica, tienen diferentes estabilidades a la temperatura e indican de manera indirecta el tipo de compuesto del que podría tratarse. Para determinar la termoestabilidad de la actividad anitbiótica de las cepas 14A, 24A y 28A, éstas se inocularon con 1% del preonóculo en 50 mL de medio KB. Después de haber sido incubadas a 180 rpm durante 24 h, se tomó 1 mL del sobrenadante sin células y se sometió a un gradiente térmico de 57°C, 67°C, 77°C, 87°C, 92.5°C y 121°C (autoclave) por 20 min cada uno. Después del tratamiento se realizaron antibiosis contra *M. luteus* por el método Kirby-Bauer.

### *Cinéticas de crecimiento*

Para determinar el máximo de producción de la actividad biológica respecto al crecimiento de las cepas, se les realizaron cinéticas de crecimiento. Para ello, se realizó un preinóculo de las cepas 1AB, 1AD, 1AE, 14A, 16A, 21A, 24A y 28A los matraces se incubaron a 29°C durante 9 h con agitación a 180 rpm. Se inocularon matraces de 50 mL de CN con 1% de preinóculo, se incubaron durante 12 h a 29°C con agitación a 180 rpm. Se tomaron muestras de 3 mL cada 30 min desde el tiempo cero y hasta 12 h. Se

determinó el crecimiento por densidad óptica con 200  $\mu$ L de muestra, y por el método de Kirby-Bauer se determinó la antibiosis contra *M. luteus* de 1 mL de sobrenadante filtrado y concentrado 10 veces en SpeedVac.

### **3.4. Fraccionamiento químico biodirigido del extracto orgánico de la cepa de *Pseudomonas* 28A**

#### *3.4.1 Cromatografía en capa fina (TLC) preparativa*

Un matraz fernbach conteniendo 1L de CN se inoculó con 1% de preinóculo y se incubó por 48 h a 29°C y con agitación a 180 rpm. El sobrenadante sin células se liofilizó en un Labconco Freeze Dry System y se recuperó con 15 mL de MeOH. Se colocaron 11 mL del extracto en MeOH en una placa de TLC preparativa de 20X20 Sílica gel 60, de 2 mm. (Merck núm de catálogo 105745) y se eluyó con una mezcla de Hexano:MeOH 3:7. Se revelaron las bandas con luz UV y se dividieron en fracciones, después se rasparon las mismas y se colocaron en tubos falcon de 15 mL con 8 mL de agua milliQ. Los tubos se agitaron, se centrifugaron a 7000 rpm durante 20 min y se recuperó la fase acuosa. Las muestras obtenidas se concentraron en SpeedVac y por el método de Kirby-Bauer se determinó la antibiosis contra *M. luteus*.

Se purificaron las fracciones activas por medio de HPLC empleando un equipo Waters con una columna YCM C-18-ODS-A (poro de 250 x 4.6 y 120°A de apertura). La columna se eluyó con un gradiente isocrático de ácido acético al 1% - acetonitrilo, con flujo de 1 mL x min. Las corridas se realizaron por 30 min a 220 nm. Se realizó un fraccionamiento secundario según de acuerdo al perfil de cada cromatograma. Las subfracciones se dejaron secar y posteriormente se recuperaron en 100  $\mu$ L de agua milliQ y se posteriormente, hacer pruebas de antibiosis contra *M. luteus*.

Paralelamente se realizó un fraccionamiento primario por columna.

#### *3.4.2 Purificación por columna*

Se inoculó 1 L de medio CN con 0.1% del preinóculo de la cepa 28A, se incubó por 48 h a 29°C a 180 rpm. El sobrenadante libre de células se liofilizó, se pesó y se recuperó en 12 mL de MeOH (extracto crudo). El extracto orgánico (MeOH), se fraccionaron

mediante cromatografía en columna abierta empleando una columna de 65 x 1.5 cm empacada con Gel de sílice (gránulos de 0.2-0.5 mm Merck). La columna se eluyó con disolventes de diferente polaridad, utilizando: Hexano, CH<sub>3</sub>CN, MeOH y H<sub>2</sub>O en diferentes proporciones, obteniéndose un total de 36 fracciones de 25 mL cada una Tabla 4. Las fracciones se concentraron en una campana de extracción y se recuperaron con 500 µL de agua miliQ. Las actividad biológica de cada fracción se estableció utilizando la prueba de Kirby-Bauer ocupando a *M. luteus*. Se seleccionaron las fracciones primarias activas y la separación de sus compuestos se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con un equipo Waters empleando una columna YCM C-18-ODS-A (poro de 250 x 4.6 y 120°A de apertura). La elución se efectuó con un gradiente isocrático de ácido acético al 1% - acetonitrilo, con flujo de 1 mL x min. Las muestras se dejaron secar y se recuperaron en 100 µL de agua miliQ y se realizó la prueba de Kirby-Bauer ocupando a *M. luteus*. Se empleó como control 1L de medio CN sin inocular que fue sometido a las mismas condiciones en la columna

Se cargaron placas de cromatografía en capa fina (TLC) de Silicagel 60, F<sub>254</sub> (Merck num. de catálogo 105554) con 3 µL de cada eluato. Las placas se eluyeron con un gradiente de 50:50 An:H<sub>2</sub>O y se revelaron con UV y posteriormente con ácido sulfúrico al 10%.

Tabla 4. Fraccionamiento primario del extracto metanólico del sobrenadante de la cepa 28A.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones
Hexano	100	1-4
Hexano-CH <sub>3</sub> CN	75:25	5-8
Hexano-CH <sub>3</sub> CN	50:50	9-12* <sup>†</sup>
Hexano-CH <sub>3</sub> CN	25:75	13-16 <sup>†</sup>
CH <sub>3</sub> CN	100	17-20 <sup>†</sup>
CH <sub>3</sub> CN-MeOH	75:25	21-24 <sup>†</sup>
CH <sub>3</sub> CN-MeOH	50:50	25-28 <sup>†</sup>
CH <sub>3</sub> CN-MeOH	25:75	29-32* <sup>†</sup>
MeOH	100	33-36

\* Fracciones antibacterianas, <sup>†</sup> Fracciones citotóxicas.

## 4. Resultados y su Discusión

### 4.1. Aislamiento de poblaciones de microorganismos asociados a la especie *Magnolia dealbata* Zucc.

#### 4.1.1 Colecta del material

Coyopolan pertenece al municipio Ixhuacan de los Reyes y Coatepec, en el estado de Veracruz, México (Fig. 16). El clima es subtropical, con lluvia durante todo el año y temperatura media de 19.5°C. El tipo de vegetación predominante son bosques perennifolios conformados por ceibas, alamos y diferentes tipos de encinos, pastizales y selva. El mayor porcentaje de uso de suelo (25%) ha sido destinado para agricultura, mientras que el porcentaje restante se ocupa entre asentamientos urbanos y ganadería.



Figura 16. Mapa del municipio de Coyopola, Veracruz. El sitio de colecta de *M. dealbata* Zucc. se señala con un círculo verde.

Aunque es recomendable que se tomen muestras de más de un ejemplar, siendo el promedio 10 individuos vegetales, para el caso de *Magnolia dealbata* Zucc., únicamente se encontraron 2 individuos. El sitio de colecta fue seleccionado de acuerdo a la bibliografía (Vázquez-G, 1994), que menciona una abundancia de 4 a 10 individuos por población (Gutiérrez y Vóvidez, 1997) y al ejemplar voucher que con el número MEXU 770032 se encuentra en el Herbario del Instituto de Biología, UNAM. Una de las razones por la cuales no se encontró a *M. dealbata* en campo, se asocia a que los

comuneros y pobladores conservan individuos dentro de sus casas debido a que es considerada una planta ornamental preciada y está asociada con usos y costumbres muy arraigados de las comunidades (Gutiérrez y Vovides, 1997).

#### 4.1.2 Caracterización de cepas

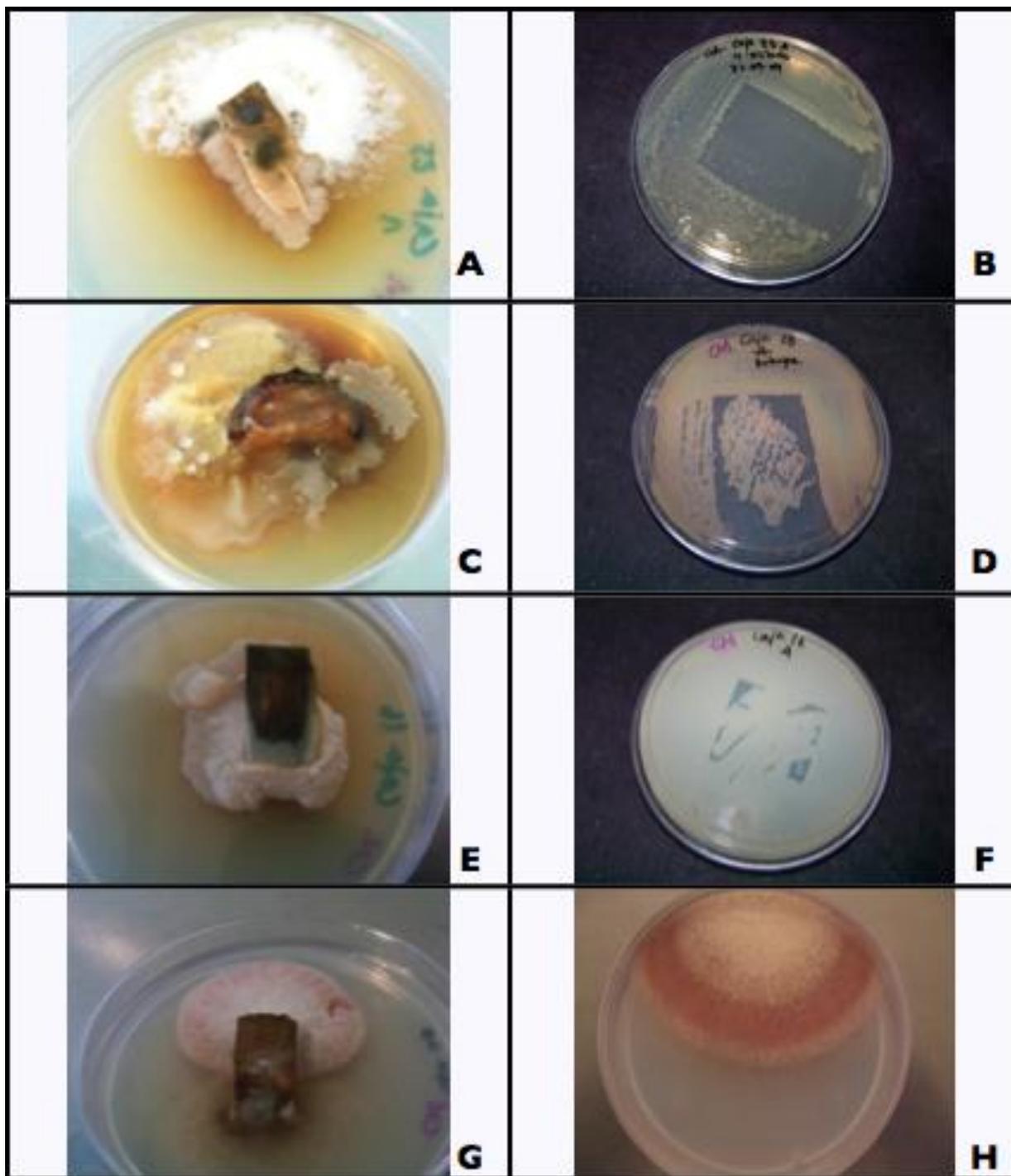
Las cajas inoculadas se mantuvieron incubando a 29°C el tiempo necesario para aislar todas las colonias fenotípicamente distintas (Fig. 17). Posterior a la separación de los biotipos de acuerdo a su morfología, se obtuvieron un total de 107 microorganismos (hongos y bacterias) de distintos fragmentos de la planta (Suplemento 1). El mayor número de microorganismos se obtuvieron de la raíz y del agua en la que se transportó el material, 47 cepas fueron hongos, 55 bacterias y 5 cepas que hasta el momento no han sido caracterizadas. Este total no es necesariamente una representación fiel de los microorganismos que se encuentran asociados a *Magnolia dealbata* Zucc., dado que se considera que hasta un 99% de los microorganismos no son cultivables en condiciones estándar (Demain y Sánchez, 2009). Respecto a la tinción de Gram, 17 cepas resultaron Gram positivas y 38 Gram negativas con diferentes morfologías 3 cocos y 52 bacilos. En medio Czapek se observó el crecimiento principalmente de hongos, debido a la adición de cloranfenicol al medio. Sin embargo, bacterias resistentes al cloranfenicol pertenecientes al género *Pseudomonas*, fueron aisladas del mismo (Palleroni, 1983).

### **4.2. Evaluación del potencial para producir compuestos con actividad biológica de los microorganismos asociados a *M. dealbata* Zucc.**

#### 4.2.1 Actividad antibacteriana

Las 107 cepas aisladas se utilizaron para realizar antibiosis por estriado. Los bioensayos con las 55 bacterias produjeron 14 diferentes patrones de inhibición (Fig. 18) sobre los microorganismos sensibles, 42 bacterias no presentaron inhibición y las 13 cepas restantes inhibieron diferencialmente a uno o más de los microorganismos sensibles, siendo el más sensible a todas las cepas aisladas *S. epidermidis*, seguido por *M. luteus* mientras que el menos sensible fue *E. coli*. La ausencia de actividad antibiótica por parte de los hongos y bacterias puede atribuirse a distintos factores; como son las condiciones

Figura 17. Fotografías de los cortes realizados en ramas (A), raíz (C) y corteza (E,G), así como un



ejemplo de microorganismo aislado en cada caso (B, D, F Y H).

de crecimiento, incluyendo medio de cultivo y temperatura, a las características químicas de los compuestos producidos o a que no se secreten metabolitos secundarios al medio..

En resultados paralelos de trabajos realizados por nuestro grupo de investigación, dos cepas aisladas de *M. dealbata* Zucc. mostraron actividad antagónica, la cepa 1B además de inhibir el crecimiento de *M. luteus*, *B. subtilis* y *E. coli* mostró actividad bactericida en contra de la cepa 2B aislada de *M. dealbata*. A través de métodos moleculares y bioquímicos se identificó a la cepa 1B como *Serratia marcescens* y la 2B como *Bacillus weihenstephanensis* (Manterola, 2011).

Bajo las condiciones de crecimiento dadas en este proyecto, ninguna de las cepas de hongos aisladas de *M. dealbata* presentó actividad. Sin embargo, después de su primo aislamiento y su crecimiento en medio Sabouraud dextrosa 0.5%, 11 cepas presentaron una notable actividad inhibitoria sobre *B. subtilis* y *M. luteus*. Las cepas de hongos 37C, 28B y 37BR fueron seleccionadas para ser caracterizadas. A diferencia de 37C, las cepas 28B y 37BR muestran inhibición de la cepa Gram negativa *E. coli* y antifúngica contra *S. cerevisiae*. Tras su posterior identificación por medio del gen que codifica para la región 5.8 S del ADNr, se encontró que las cepas 28B y 37BR pertenecían a la misma especie *Penicillium chrysogenum*; mientras que la cepa 37C coincidió con *Fusarium* sp. (Espinosa-Gómez, 2012).

#### 4.2.2 Actividad de honokiol y magnolol

Tomando en cuenta que los compuestos honokiol y magnolol son producidos por *Magnolia dealbata* Zucc. (Sarker y Maruyama, 2002) y que algunos microorganismos endófitos son capaces de sintetizar los mismos compuestos que la planta de la que son aislados (Stierle *et al.*, 1993), decidimos determinar si la actividad antibiótica producida por las bacterias que aislamos en el presente trabajo era debida a ellos. Se realizó la prueba antibiosis según Kirby-Bauer (que consiste en la difusión del/los compuestos a través del agar), agregando a sensidiscos honokiol y magnolol puros. Se observó que el honokiol inhibió ligeramente el crecimiento de *M. luteus* y *B. subtilis*, mientras que para *E. coli* y *S. cerevisiae* no se observó inhibición, similar a lo observado en el patrón de inhibición 12 obtenido en este trabajo. El magnolol no presentó actividad, esto era de esperarse ya que las concentraciones necesarias para observar actividad antibiótica con

magnolol son de hasta 10 veces mayores que para el honokiol (Ho *et al.*, 2001)) Se eligieron aquellas bacterias que inhibieran a las de dos cepas prueba, motivo por el cual las de patrón 12 no fueron seleccionadas.

Debido a la capacidad de inhibir a más de dos microorganismos sensibles y ser morfológicamente distintas entre sí, las cepas 1AC, 1AD, 1AE, 14A, 16A, 21A, 24A y 28A fueron seleccionadas para su caracterización molecular y bioquímica.

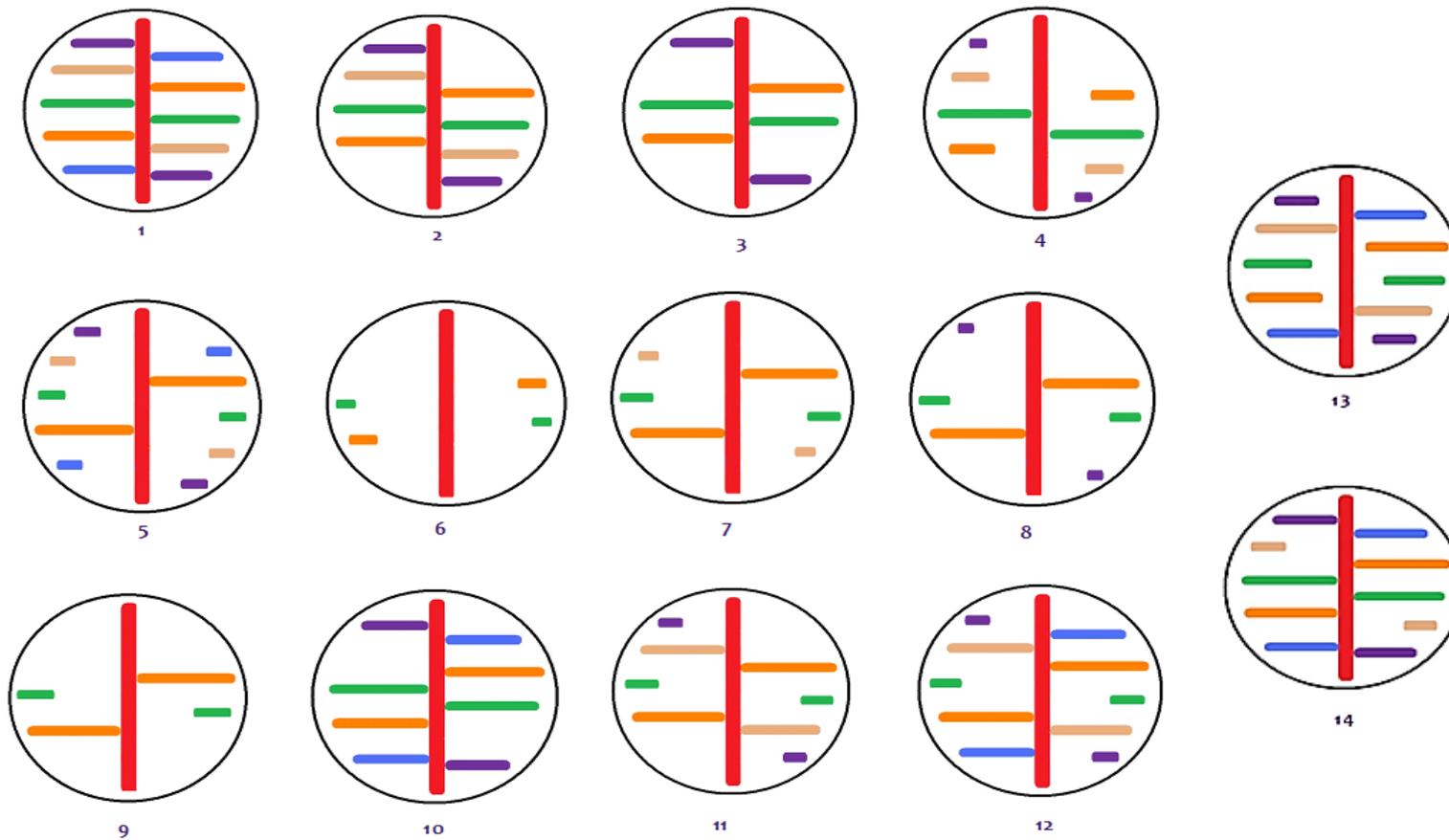
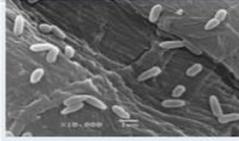
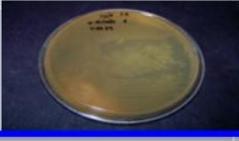
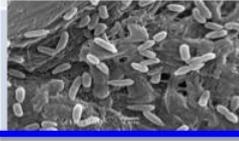
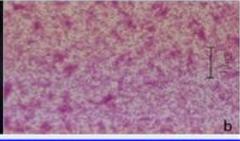
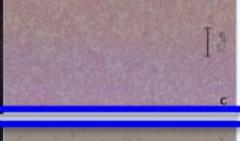
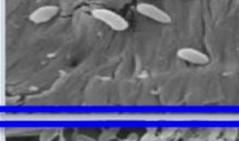
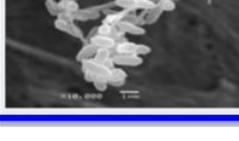


Figura 18. Esquema de los patrones de antibiosis obtenidos con las cepas aisladas. Los colores corresponden a las cepas sensibles: Morado *M. luteus*, Rosa *S. cerevisiae*, Verde *B. subtilis*, Naranja *E. coli* y Azul *S. epidermidis*. Se muestran los 14 diferentes patrones de inhibición de las cepas sensibles. En los patrones 4, 5, 6, 7, 8 y 9 se observó la inhibición de más de dos de las cepas prueba.

Las ocho cepas seleccionadas corresponden a bacterias Gram negativas y el análisis a través de microscopía electrónica de barrido (MEB), permitió observar que corresponden a bacilos cortos, rectos o curvados (Tabla 5).

Tabla 5. Características de las cepas seleccionadas. Se muestran los resultados del análisis morfológico con MEB, tinción de Gram, morfología colonial y el patrón de antibiosis de las ocho cepas elegidas para su caracterización.

CEPA	FENOTIPO	TINCIÓN DE GRAM	MEB	PATRÓN DE INHIBICIÓN
1 AB <i>Pseudomonas sp.</i>				
1 AC <i>Pseudomonas sp.</i>				
1 AE <i>Pseudomonas sp.</i>				
14 A <i>Pseudomonas sp.</i>				
16 A <i>Pseudomonas sp.</i>				
21 A <i>Pseudomonas sp.</i>				
24 A <i>Pseudomonas sp.</i>				
28 A <i>Pseudomonas sp.</i> T77				

### 4.2.3 Actividad citotóxica

Con la finalidad de identificar moléculas que tuvieran un amplio espectro de acción, se decidió buscar actividad citotóxica. Las cepas 14A, 24A y 28A inhibieron a bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras, por tal motivo fueron seleccionadas para realizar las pruebas con las líneas de células tumorales MCF-7 (Fig.19), HeLa (Fig. 20) y HepG2 (Fig. 21). Se encontró que los sobrenadantes libres de células generaban actividad citotóxica sobre las tres líneas tumorales. En todos los casos, al agregar 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante concentrado 10 veces, se registró un efecto similar al del control positivo CDDP (20  $\mu\text{L}$ ), el cual redujo la viabilidad de las células hasta un 80%. El sobrenadante de la cepa 28A fue el que presentó mayor efecto inhibitorio, pues se requirió <0.5  $\mu\text{L}$  para inhibir al 50% de la población de células tumorales HeLa, <7  $\mu\text{L}$  para la población de MCF-7, mientras que en el caso de HepG2 el sobrenadante con mejor actividad fue el de la cepa 24A, requiriéndose <10  $\mu\text{L}$  para igualar la actividad del CDDP.. Se consideran dos posibles razones por las cuales se observan efectos distintos entre HepG2, MCF-7 y en HeLa al mismo concentrado del sobrenadante, una podría ser que la sensibilidad de las células a la mezcla de compuestos fuese distinta, o bien, que hubiese actividad de distintos metabolitos en acción individual o combinada para cada línea celular. Dadas las características biológicas de cada línea celular. Todas las líneas celulares tumorales tienen un crecimiento óptimo a los 37°C, sin embargo, las tres líneas presentan tiempos de duplicación distintos, para el caso de HeLa es de 21.8 h, para HepG2 es de 48 h y para MCF-7 de 32 h. En esta última línea celular se ha observado que la actividad de muchas enzimas que metabolizan xenobióticos incluyendo fármacos, varía durante el período de crecimiento, resultando en cambios en el balance entre rutas de activación y detoxificación (Osborne *et al.*, 1987), Lo anterior implica que la citotoxicidad se puede ver incrementada no necesariamente por la potencia del o los metabolitos activos, sino por la carencia de enzimas detoxificadoras de las células al momento de agregar el sobrenadante.

Para evaluar la citotoxicidad de los componentes bioactivos sobre células sanas se utilizó una línea no tumoral de queratinocitos HaCaT. En el ensayo se utilizaron los extractos de MeOH y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  del sobrenadante de la cepa 28A crecida por 7 días en PPGAS. Se encontró que 10  $\mu\text{L}$  del extracto con MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  poseen

efecto citotóxico y que 20  $\mu\text{L}$  disminuyen hasta un 85% la viabilidad de las células HaCaT igualando el efecto del CDDP. A modo comparativo, el tratamiento se realizó también para la línea HeLa y se observó que la citotoxicidad del extracto MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  es ligeramente menor que para la línea HaCaT (Fig. 22). NB es un medio complejo que resultó poco adecuado para la purificación por columna del sobrenadante debido, por tal motivo se decidió emplear el medio PPGAS para realización de esta prueba.

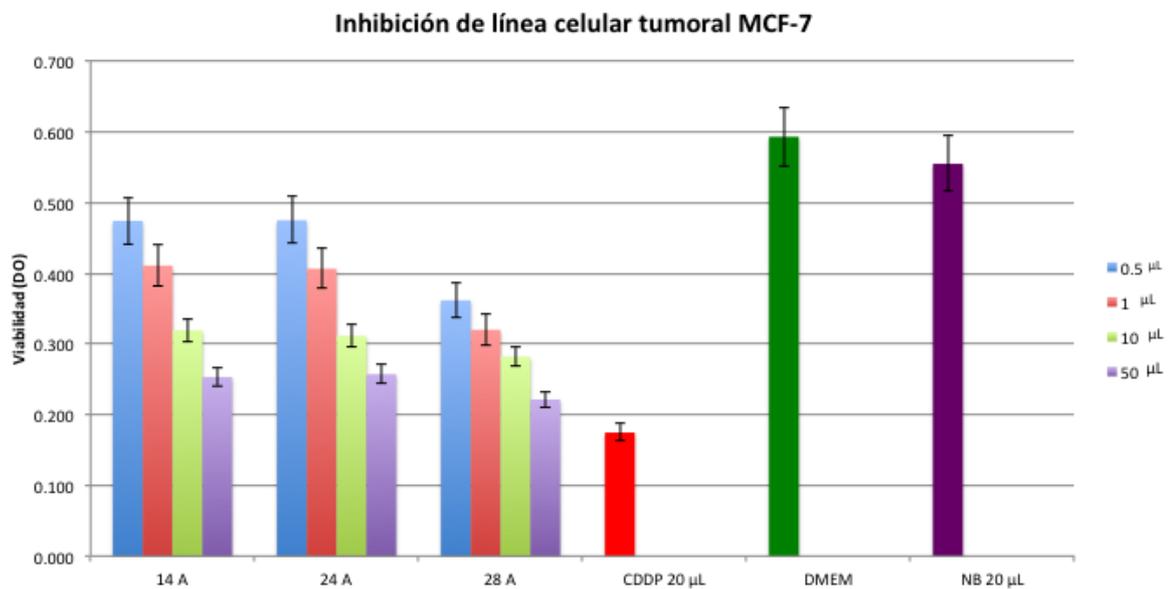


Figura 19. Inhibición del crecimiento de la línea celular tumoral MCF-7. Se muestra la disminución de DO con respecto al control negativo células sin tratamiento y al control positivo de citotoxicidad, CDDP causada por el sobrenadante concentrado de cada cepa bacteriana.

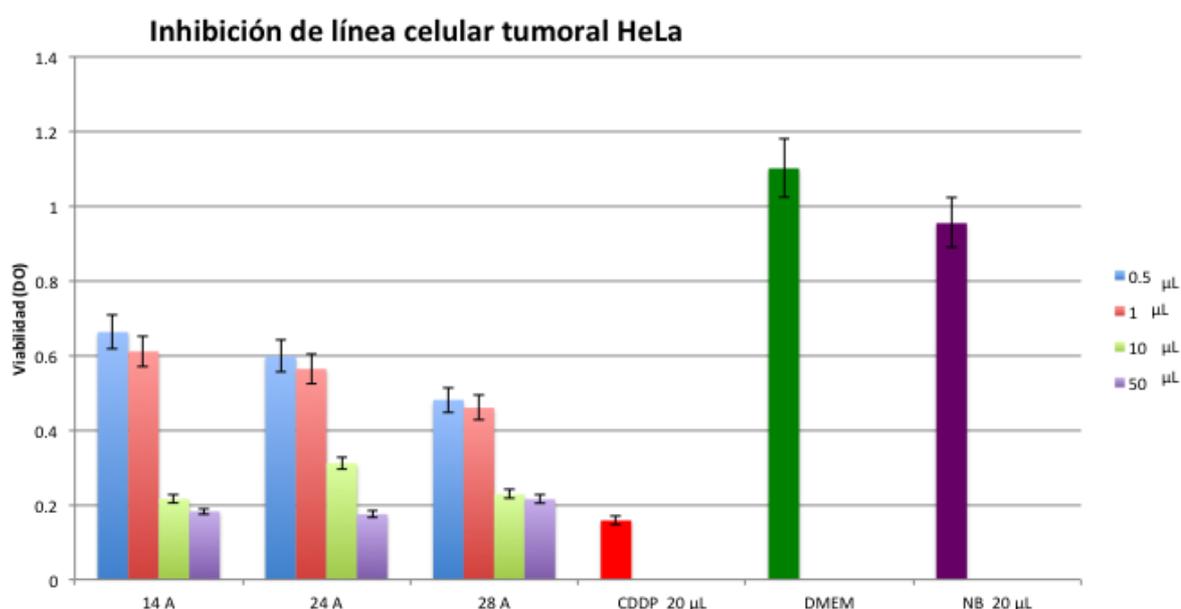


Figura 20. Inhibición del crecimiento de la línea celular tumoral HeLa. Se muestra la disminución de DO con respecto al control negativo células sin tratamiento y al control positivo de citotoxicidad, CDDP causada por el sobrenadante concentrado de cada cepa bacteriana.

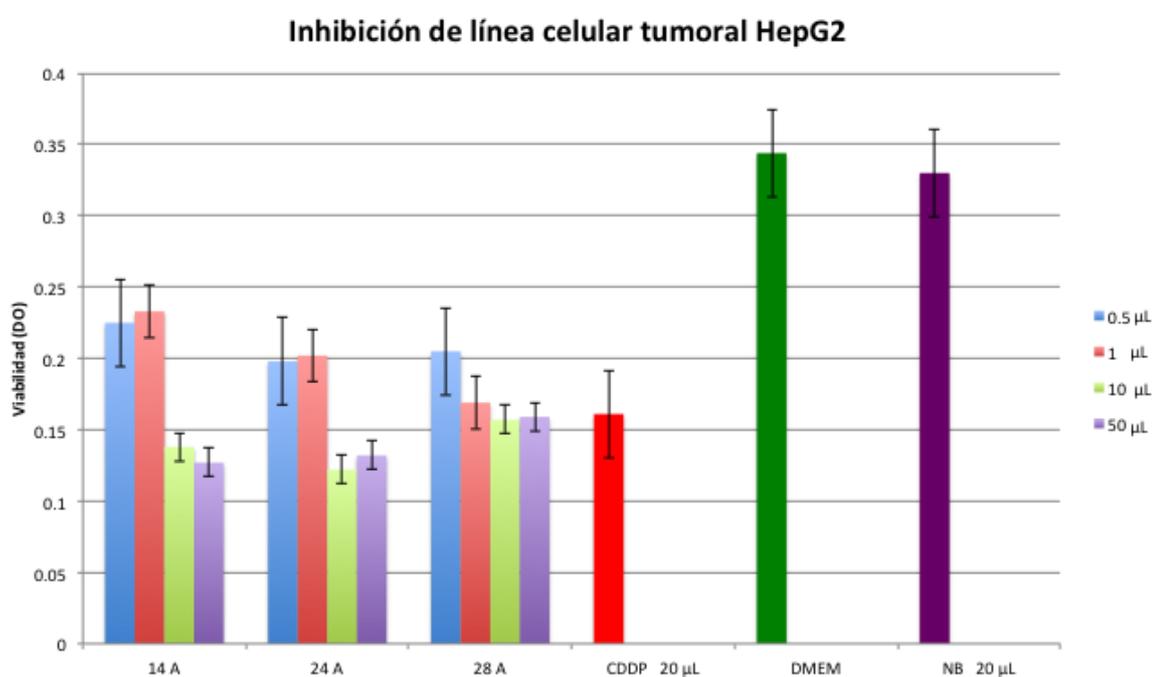


Figura 21. Inhibición del crecimiento de la línea celular tumoral HepG2. Se muestra la disminución de DO con respecto al control negativo células sin tratamiento y al control positivo de citotoxicidad, CDDP causada por el sobrenadante concentrado de cada cepa bacteriana.

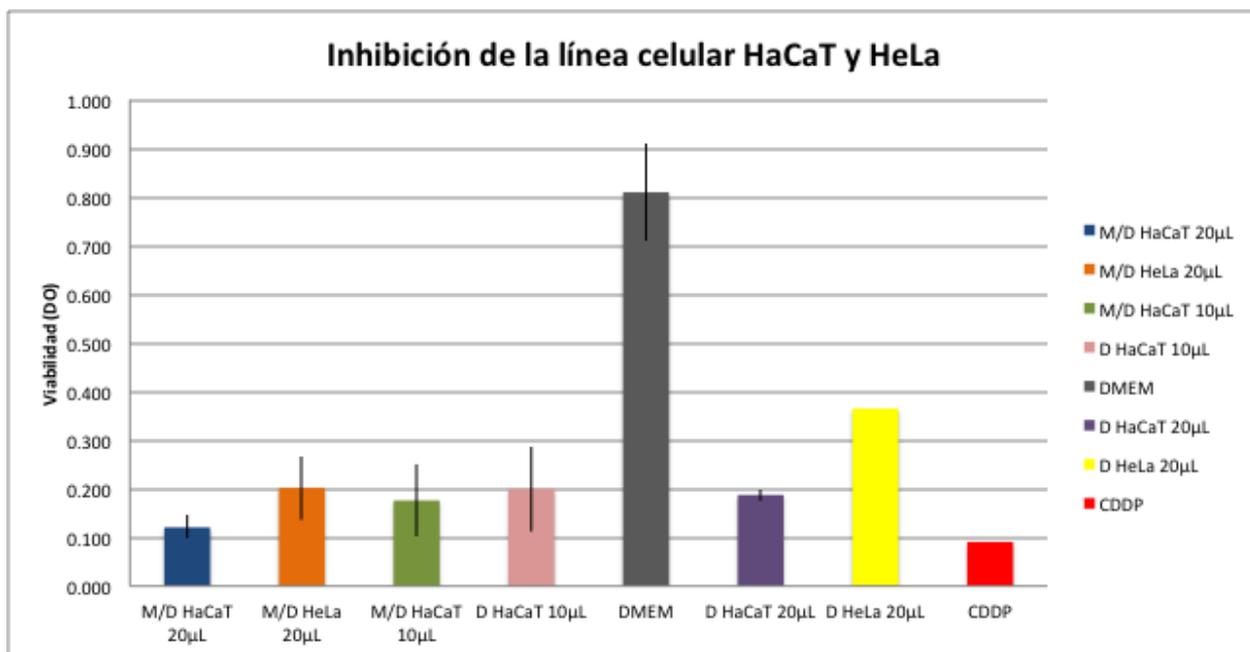


Figura 22. Inhibición del crecimiento de la línea de células sanas HaCaT y de células tumorales HeLa con extractos de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (D) y una mezcla de ambos MeOH (M)/  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (M/D). Se muestra la disminución de DO con respecto al control negativo células sin tratamiento y al control positivo de citotoxicidad, CDDP.

Estudios recientes han mostrado que los extractos orgánicos en MeOH de la cepa 1AC crecida en medio líquido PPGAS muestran actividad bactericida, citotóxica y parasiticida (Diana Lemus, tesis en proceso).

### 4.3. Identificación de los microorganismos que presentaron actividad antibiótica.

#### 4.3.1 Identificación molecular

La caracterización taxonómica de las ocho cepas seleccionadas se realizó mediante el análisis conjunto de diversos procedimientos incluyendo métodos moleculares y bioquímicos: amplificación del ADNr, análisis del perfil del consumo de diferentes fuentes de carbono y mediante de la sensibilidad a antibióticos utilizando el equipo VITEK, y por último, por medio de la verificación de la producción de metabolitos secundarios característicos.

### *Caracterización molecular*

Al realizar la alineación de la secuencia del 16S ADNr de las ocho cepas en NCBI se encontró una similitud mayor al 94% con el género *Pseudomonas* (Tabla 5). Mayoritariamente las *Pseudomonas* aisladas provienen de la corteza o raíz del árbol, únicamente la cepa 24A se aisló del agua donde se transportó la raíz. Como se mencionó brevemente en la introducción, especies del género *Pseudomonas* han sido aisladas principalmente de la rizósfera, con excepción de las patógenas de plantas han sido aisladas de la corteza, hojas o frutos de diferentes especies (Stanier *et al.*, 1966).

#### *4.3.2 Perfil bioquímico VITEK*

La identificación de bacterias utilizando el equipo VITEK consistió en evaluar dos aspectos, por un lado la sensibilidad a antibióticos como la ampicilina, gentamicina, sulfametazol, nitrofurantoina/trimetropina, entre otros.) y por otro lado determinar el perfil bioquímico que incluye pruebas de utilización de fuentes de carbono (glucosa, maltosa, galactosa, sacarosa, entre otras), aminoácidos y enzimas (lipasas). Posterior al análisis se identificaron a siete de las ocho cepas como *P. fluorescens* o *P. aeruginosa*, con excepción de la cepa 16A que se identificó como *Aeromonas salmonicida* (Tabla 6).

#### *4.3.3 Caracterización bioquímica de las cepas*

Una parte de la caracterización consistió en realizar cinéticas de crecimiento de las cepas 1 AC, 1 AD, 1 AE, 14 A, 16 A, 21 A, 24 A y 28A. En todas las cepas se observó una curva de crecimiento similar con un tiempo de duplicación aproximado de 21.5 min para todas ellas.

Tabla 6. Resultados de la comparación de la secuencia de ADNr de las cepas seleccionadas contra las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se muestran los resultados de identidad así como los porcentajes obtenidos por BLAST y por el equipo VITEK.

CEPA	NCBI				VITEK	
	TAXA	% IDENTIDAD	% COBERTURA	MAX. PUNTAJE	CEPA	% IDENTIDAD
1 AC corteza	<i>Pseudomonas</i> sp.	98%	64%	122	<i>Pseudomonas</i>	50%
	<i>Pseudomonas putida</i>	98%	64%	122	<i>aeruginosa</i>	50%
					<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
1 AD corteza	<i>Pseudomonas putida</i> sp.	95%	98%	2183	<i>Pseudomonas</i>	93.3%
	<i>Pseudomonas</i> sp.	96%	89%	2024	<i>fluorescens</i>	
1 AE corteza	<i>Gamma proteobacterium</i>	97%	79%	1094	<i>Pseudomonas</i>	33.58%
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	97%	78%	1092	<i>fluorescens</i>	33.21%
14 A Raíz	<i>Pseudomonas putida</i>	95%	98%	2183	<i>Pseudomonas</i>	98.3%
	<i>Pseudomonas</i> sp.	96%	89%	2024	<i>fluorescens</i>	
16 A corteza interna	<i>Pseudomonas</i> no cultivada	99%	93%	1567	<i>Aeromonas salmonicida</i>	95%
	<i>Bacteria</i> endófitas SS14	99%	93%	1567		
21 A raíz	<i>Pseudomonas</i> sp.	98%	96%	1230	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99%
24 A Agua raíz	<i>Bacteria</i> endófitas SS14	99%	99%	1768	<i>Pseudomonas</i>	99%
	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	99%	99%	1765	<i>fluorescens</i>	
28 A Raíz	<i>Pseudomonas</i> sp.	98%	94%	1687	<i>Pseudomonas</i>	93.3%
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	98%	98%	1681	<i>fluorescens</i>	

### *Producción de pigmentos*

Especies como *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas tolassi* y *Pseudomonas aeruginosa*, se encuentran englobadas en el grupo I por homología de ARN (Palleroni, 1983). La prueba más sencilla para caracterizar al grupo de las pseudomonas que fluorescen es crecerlas en un medio pobre en hierro como KB, esto permite determinar de manera cualitativa la producción de un grupo de metabolitos del tipo de los sideróforos (pioverdinas, piochelinas, pseudobactinas y ferribactinas, entre otros) encargados de quelar hierro del medio, a su vez capaces de generar fluorescencia y que son característicos del grupo (Budzikiewicz, 1992; Uzair *et al.*, 2006). Tras 24 h de crecimiento, los matraces inoculados con cada una de las ocho cepas fueron observados con luz UV, detectándose que todas las cepas produjeron pigmentos fluorescentes, de acuerdo con lo descrito en la literatura. Se observó que a mayor concentración de  $Fe^{3+}$  en el medio, hay una disminución de la fluorescencia en los cultivos, debido a que se dejan de sintetizar sideróforos. A altas concentraciones de  $Fe^{3+}$  el represor *Fur* dependiente de  $Fe^{3+}$  se une al ADN reprimiendo la producción de sideróforo. A bajas concentraciones de  $Fe^{3+}$  el represor se disocia del ADN llevando así a la transcripción y producción de sideróforos. Éstos son excretados al ambiente extracelular en donde secuestran al hierro, transportándolo posteriormente al periplasma (Xiao y Kisaalita, 1998). Se encontró que las bacterias sólo ocupan el hierro en su forma  $Fe^{3+}$  mientras que la  $Fe^{2+}$  no causa represión en la síntesis de sideróforos.

### *Separación de sideróforos.*

Se ha estimado que en condiciones de estrés por falta de hierro, la producción de sideróforos en un litro de cultivo puede igualar a la biomasa generada por la bacteria (Leisinger y Margraff, 1979), éstas moléculas pueden causar estrés por hierro a células de distintos organismos. Por lo anterior y con el fin de descartar que el efecto citotóxico o bactericida en las cepas 14A, 24A y 28A se debiera a estrés por hierro debido a la presencia de sideróforos, se realizó un experimento en

paralelo que consistió separarlos del medio de cultivo utilizando columnas de afinidad de sefarosa previamente cargada con  $\text{CuSO}_4$  (Xiao y Kisaalita, 1995). Los sideróforos se unen al  $\text{Cu}^{2+}$  de la columna y después pueden ser eluidos con un buffer a pH ácido lo que permite que por repulsión de cargas se liberen de la resina a los eluatos.

Con el fin de verificar que ya no quedaran sideróforos en los sobrenadantes, se hizo una cromatografía en capa fina. Se cargaron placas de TLC de 20 X 20 cm con 3  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de la cepa 14 A, 24 A y 28 A, así como de cada uno de los tratamientos después de quelar los sideróforos. La placa fue eluida con una mezcla 1:1 de hexano/MeOH. Se observó que la metodología empleada para eliminar a los sideróforos del medio resultó efectiva dado que se eliminó tanto la fluorescencia, como el pico de absorbancia característico de las pioverdinas a  $\lambda$  400 nm (Philson y Llinás, 1982). Después de realizar 4 lavados con el buffer de acetatos 20 mM, pH 5, se recuperó la fluorescencia resultado de la elución de los sideróforos. La unión a la sefarosa de los sideróforos y su posterior elución con acetatos pH 5, se pudo corroboró con TLC (Fig. 23). Finalmente, se probó por medio de antibiosis que el efecto de inhibición se mantiene aún después de eliminar los sideróforos, por tanto la actividad no se debe a la presencia de estas moléculas en el sobrenadante.

Debido a que se determinó que las cepas 1AC, 1AD, 1AE, 14A, 16A, 21A, 24A y 28A pertenecen a *Pseudomonas* fluorescentes, lo siguiente consistió en descartar que alguna fuera *P. aeruginosa*, oportunista patógeno de humanos. Para lo anterior se realizaron pruebas para observar producción de ramnolípidos, surfactantes y piocianinas.

#### *Producción y extracción de piocianinas*

El experimento para detectar piocianinas consistió en observar el cambio de coloración de la solución y en medir su absorbancia a 520 nm en solución ácida. Las piocianinas son compuestos de color azul, al agregar cloroformo al sobrenadante de los cultivos, el solvente extrae a las piocianinas, las cuales al acidificarse viran a rojo por su reducción (Essar *et al.*, 1990). Para el caso del

sobrenadante de la cepa *Pseudomonas* sp. 28A no se observó a simple vista la coloración azul en la fase orgánica y al leer la absorbancia a 520 nm no tuvo lectura, por lo cual se descartó la producción de pirocianinas y a su vez que esta cepa correspondiera a la especie *P. aeruginosa*.

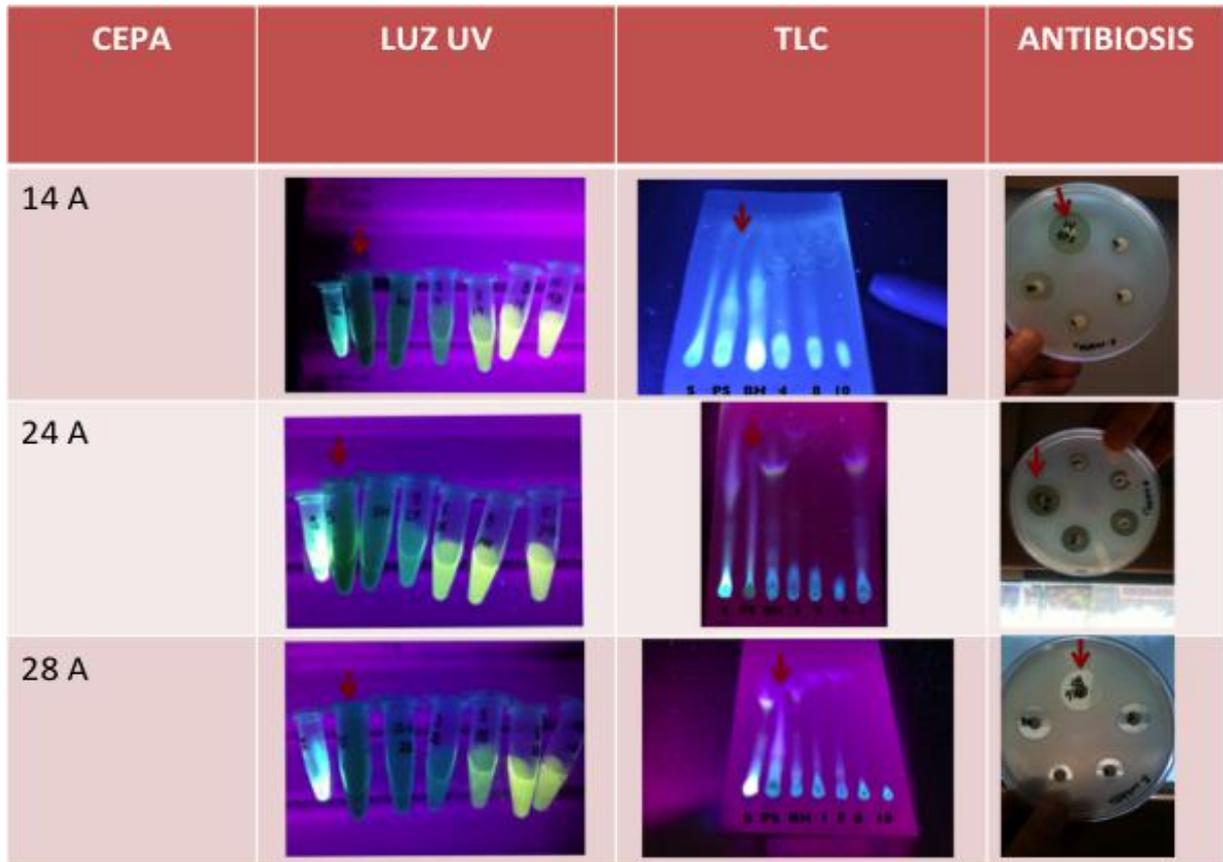


Figura 23. Fotografía de los resultados de la extracción de sideróforos. Se observa la pérdida de fluorescencia del sobrenadante de las cepas *Pseudomonas* sp. 14A, 24A y 28A después de extraer los sideróforos (flecha roja) y la recuperación de la misma después del quinto lavado con buffer de acetatos. En las placas de TLC se observa la pérdida de dos bandas azul-moradas después de extraer los sideróforos (flecha roja), mismas que se recuperan en los lavados con buffer posteriores. Finalmente se observa la bioactividad del sobrenadante después de extraer a los sideróforos (flecha roja) y como esta va disminuyendo con los lavados posteriores.

### Índice de emulsificación

La prueba para la producción de surfactantes del tipo aniónicos se realizó únicamente con la cepa *Pseudomonas* 28A. El sobrenadante de la cepa *Pseudomonas*. 28A posee la capacidad de emulsificar hidrocarburos como el DIESEL (Fig. 24), el índice de emulsificación E24 fue de 50% (Coimbra *et al.*, 2008). Se ha observado que la producción y función de los biosurfactantes se encuentra influenciada por el pH del medio así como por la fuente de carbono, presentándose la menor producción con glucosa (Abouseoud *et al.*, 2008). El uso de surfactantes en biorremediación ha sido ya reportado para *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* (Déziel *et al.*, 1996). Ecológicamente los biosurfactantes permiten la solubilización de hidrocarburos facilitando su asimilación como fuente de carbono por las bacterias (Coimbra *et al.*, 2009). *S. marsecens* aislada también de *M. dealbata* Zucc., mostró actividad surfactante (Manterola, 2011), por lo cual podría darse la posibilidad que el suelo en donde se encuentra la planta se encuentre contaminado con hidrocarburos o bien, los nutrientes se encuentren inmersos en sustratos oleosos, por lo cual la producción de surfactantes representaría una ventaja adaptativa de las bacterias que crecen asociadas a la rizósfera como es el caso de *S. marsecens* y la cepa de *Pseudomonas* 28A.



Figura 24. Fotografía del ensayo de emulsificación del DIESEL 24 h después de preparada la mezcla

### *Producción de ramnolípidos*

Para la detección de ramnolípidos se siguió el método de Pinzon y Lu-Kwang (2009). El ensayo consistió en determinar biosurfactantes de tipo aniónico, éstos interactúan con los compuestos catiónicos CTAB (bromuro de cetil-trimetil-amonio) y AM (azul de metileno) formando un complejo y precipitando el azul de metileno resultando en la formación de un halo azul alrededor de las colonias que productoras de surfactantes y en general el tamaño del halo se relaciona con la cantidad de ramnolípidos producidos. En el caso de las cepas seleccionadas no se observó ningún halo con respecto al control positivo *P. aeruginosa*, por lo cual se concluyó que no había producción de ramnolípidos.

### *Termoestabilidad*

Los sobrenadantes de las cepas de *Pseudomonas* 14A, 24A y 28A fueron sometidas a un tratamiento térmico, después del cual todos conservaron la actividad antibiótica contra las cepas *M.luteus* y *B. subtilis*, por lo cual se concluyó que el o los compuestos activos de todas estas cepas es termoestable y posiblemente no sea de carácter proteico.

#### **4.4. Fraccionamiento químico biodirigido del extracto orgánico de la cepa *Pseudomonas* 28A**

Con la finalidad de obtener el método de fraccionamiento de los compuestos más adecuado y con mayor rendimiento, se decidió realizar paralelamente el fraccionamiento primario del sobrenadante de la cepa 28A por medio de TLC preparativa y por columna abierta.

Para iniciar la purificación de los compuestos activos, se realizó un cultivo a mayor escala, para ello se obtuvieron 2 cultivos de 1 L de sobrenadante de la cepa *Pseudomonas* 28A estos se filtraron y se liofilizaron obteniéndose un rendimiento total de 4.6 g de sobrenadante crudo por cada litro de fermentación. El liofilizado obtenido se extrajo con 50 mL de Metanol, y se precipitaron todos los residuos mediante centrifugación a 7000 rpm por 20 min. La fase orgánica (MeOH) se retiró y se concentró por medio de un rotavapor a 63°C. Se recuperaron 12 mL de un extracto oleoso color

café oscuro por cada litro de sobrenadante. El control del medio sin inocular recibió el mismo tratamiento.

#### 4.4.1 Cromatografía en capa fina (TLC) preparativa

Se cargaron 12 mL del extracto metanólico del sobrenadante de la cepa 28A en la placa de TLC preparativa, dejando secar entre la aplicación de cada mililitro. La placa se eluyó utilizando Hex:MeOH como fase móvil en proporción 20:80. La placa se reveló con UV encontrando una pobre separación de los compuestos presentes. A pesar de ello se decidió fraccionar en 6 partes, cada una de éstas se raspó y recuperó en 1 mL de MeOH. Las fracciones se centrifugaron durante 30 min a 7000 rpm para separar la resina. Se recuperó la fracción líquida y se concentró para realizar antibiosis contra *M. luteus*. Finalmente las fracciones 4, 5 y 6, siendo las más lejanas al punto de aplicación de la muestra, inhibieron el crecimiento de *M. luteus*.

#### 4.4.2 Purificación por columna

Los 12 mL de extracto se ocuparon para cargar una columna de sílica gel previamente equilibrada con 100 mL de hexano. La columna se corrió según se muestra en material y métodos, obteniéndose 36 fracciones de 25 mL. El análisis por TLC de cada una de ellas permitió observar diferencias en la composición metabólica de cada fracción. El número de componentes presentes aumentó de acuerdo con la polaridad del disolvente de elución. Al revelar las placas con luz UV se pudieron observar diferencias en los patrones de bandeo para cada fracción y el número de bandas aumentó en proporción a la mayor polaridad del disolvente, obteniéndose un mayor número de bandas en las fracciones más polares. El perfil cromatográfico de las fracciones con mayor polaridad del extracto metanólico se comportó de manera similar que el control del medio de cultivo sin inocular. Al revelar con ácido sulfúrico/MeOH, que oxida los compuestos orgánicos mediante calor, se encontró una mayor abundancia de compuestos orgánicos en las fracciones eluída con un disolvente de mayor polaridad.

Se determinó la bioactividad de todas las fracciones obtenidas, la actividad antibacteriana se estableció por medio de una prueba de Kirby-Bauer empleando a *B.*

*subtilis* y *M. luteus*, como organismos de prueba, mientras que la actividad citotóxica se determinó contra la línea celular HeLa. En las antibiosis la actividad biológica se concentro en la fracción primaria 11 eluída con Hex-CH<sub>3</sub>CN 50:50 y en las fracciones 31 y 32 eluídas con CH<sub>3</sub>CN-MeOH 25:75. Finalmente la actividad citotóxica se observó a partir de la fracción 9 y hasta la fracción 32.

#### 4.4.3 HPLC

Se realizó un fraccionamiento secundario por HPLC de las fracciones activas tanto de la cromatografía en columna como las de la TLC preparativa. Las eluciones obtenidas del HPLC fueron evaporadas y se resuspendieron con 500 µL de agua miliQ. Con las eluciones resuspendidas se realizaron las antibiosis correspondientes contra *M. luteus*, sin embargo no se observó actividad en ninguna de las fracciones secundarias.

La falta de actividad bactericida de las fracciones secundarias obtenidas por HPLC se puede atribuir a: la dilución final de la muestra, por tanto es probable que el compuesto no se haya encontrado lo suficientemente concentrado para inhibir el crecimiento; o bien, a que la bioactividad se deba a la acción combinada de más de una molécula por tanto al ser fraccionadas pierden su actividad.

El análisis por TLC del extracto metanólico obtenido en ambos casos permitió observar que se encuentra constituido por una mezcla compleja de metabolitos secundarios. Por otra parte, se observó que extracto derivado del medio CN sin inocular, también presenta diversos componentes indicando que el MeOH no es el mejor disolvente de extracción. Asimismo, se observa que la separación de los constituyentes no fue la más apropiada debido a que no permite observar diferencias entre los extractos con o sin inóculo. Por otra parte, la baja resolución de los compuestos pudo deberse principalmente a que la mezcla de los disolventes de elución no fue la más adecuada. La similitud en la composición y polaridad del extracto y el control son condiciones que han interferido con el óptimo fraccionamiento de los compuestos activos. Actualmente se están optimizando las condiciones de elución empleando mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, 95:5 e incrementando gradualmente la polaridad.

#### **4.5 Moléculas bioactivas de *Pseudomonas***

Dentro del género de las *Pseudomonas* que fluorescen se ha reportado la producción de numerosos compuestos que poseen actividad antibacterial, antifúngica, antiparasitaria, fitotóxica y antitumoral. Después de *Bacillus*, *Pseudomonas* es el género de bacterias unicelulares que más metabolitos secundarios produce. Además de los sideróforos, también se encuentran las quinolonas, pirrolnitrinas, mupirocinas, lipopéptidos cíclicos generalmente representados por los surfactantes, y las fenazinas que incluyen a las piocianinas producidas únicamente por *P. aeruginosa* (Edwin *et al.*, 1945).

Con los resultados obtenidos hasta el momento en la cepa 28A: 1) se descartó la presencia de piocianinas, pioverdinas y ramnolípidos; 2) se determinaron las características de polaridad, termoestabilidad y absorbancia del compuesto activo; y 3) se realizó la comparación bibliográfica correspondiente a compuestos bioactivos producidos por *Pseudomonas*. Basándonos en las características anteriores y en la presencia de actividad antibiótica y citotóxica, fue posible reducir el número de moléculas a tres: 1) Viscosina, producida por *P. fluorescens* y *P. tolaasii*, es un lipopéptido cíclico con actividad citotóxica y bactericida, que por su característica anfipática, puede extraerse con mezclas de disolventes (Raaijmakers *et al.*, 2008); 2) Pederinas, producidas por *P. fluorescens*, son amidas con actividad citotóxica, insecticida y bactericida, que se pueden extraer con disolventes polares 3) fenacinas, producida por especies del género *Pseudomonas*, son moléculas tricíclicas de benceno que poseen actividad antitumoral, parasiticida y bactericida (Gross y Loper, 2009).

Actualmente se está realizando un esfuerzo en delinear las condiciones adecuadas para purificar el o los compuestos activos con la finalidad de determinar la estructura de los mismos. Se está utilizando el método PPGAS para las fermentaciones. Para obtener el mejor sistema de disolventes para resolución de las placas de TLC, se está buscando la mezcla de disolventes adecuada para la separación de los compuestos, esto con la finalidad de escalar la fermentación y fraccionar por columna. Paralelamente se está buscando mejorar el rendimiento del extracto orgánico y evitar en lo posible la extracción de los componentes del medio de crecimiento ocupando la resina de Amberlita XAD7HP. Esta resina es un polímero poroso de acrílico que dada su propiedad alifática puede adsorber compuestos polares y no polares de los solventes.

## 5. Conclusiones

Este es el primer trabajo en el que se estudia la microbiota asociada a *M. dealbata* Zucc. y los productos bioactivos que produce dicha microbiota.

De un total de 55 bacterias aisladas, las cepas 14A, 24A y 28A mostraron amplia actividad antibiótica sobre las cepas de microorganismos prueba *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Staphylococcus epidermidis* y citotóxica contra las líneas celulares tumorales MCF-7, HepG2 y HeLa.

La caracterización molecular por medio del ARNr 16S de las ocho cepas bacterianas con mayor bioactividad, las agrupó dentro del género de las *Pseudomonas* fluorescentes, excluyendo la presencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

La presencia de bacterias que producen sideróforos y surfactantes sugiere que estas se encuentran habitando suelos pobres en hierro o con baja disponibilidad de nutrientes, en las que la producción de ambas moléculas les confiere una ventaja competitiva. Sin embargo, la actividad biológica de las cepas 14A, 24A y 28A no se debe a los sideróforos presentes en sus cultivos.

Adicionalmente, el sobrenadante de la cepa 28A mostró buena actividad surfactante para hidrocarburos.

Después de la revisión bibliográfica, se encontraron dos tipos de moléculas producidas por *Pseudomonas* que parecen ajustarse a los resultados de este trabajo, las fenazinas y los lipopéptidos cíclicos que tienen actividad antibiótica y antitumoral.

## Prospectivas

- Clasificar taxonómicamente hasta especie a la cepa *Pseudomonas* 28A.
- Realizar la fermentación en mediana escala (20 L) la cepa *Pseudomonas* 28A y preparar los extractos orgánicos del medio de cultivo.
- Aislar y purificar los metabolitos secundarios con actividad antibacteriana y citotóxica, de los extractos crudos derivados del cultivo a mediana escala, por medio de un estudio químico biodirigido, empleando diversos procedimientos cromatográficos y utilizando el método de Kirby-Bauer para monitorear la actividad antibacteriana y el de MTT para la actividad citotóxica de las fracciones cromatográficas.
- Establecer la estructura molecular de los compuestos bioactivos mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos, quiroópticos y de difracción de rayos X.
- Determinar cuantitativamente el potencial antibacteriano y citotóxico de los metabolitos aislados de las fracciones activas sobre el crecimiento de *M. luteus* y sobre las líneas celulares HeLa.

### **Bibliografía citada**

- Abouseoud M, R Maachio, A Amrane, S Boudergua y A Nabi. 2008. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*. **223**: 143-151.
- Alonso-Castro A, R Zapata-Bustos, F Domínguez, A García-Carrancá y L Salazar-Olivo. 2011. *Magnolia dealbata* Zucc and its active principles honokiol and magnolol stimulate glucose uptake in murine and human adipocytes using the insulin-signaling pathway. *Phytomedicine*. **18**: 926-933.
- Anzai Y, H Kim, J Park, H Wakabayashi y H Oyaizu. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **50**: 1563-1589.
- Ausubel F, R Brent, R Kingston, D Moore, J Seidman, J Smith y K Struhl. 1994. *Current protocols in molecular biology*. Volumen 1. Wiley.
- Bérdy. 2004. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*. **58**(1): 1-26.
- Bai X, F Cerimele, M Ushio-Fukai, M Waqas, P Campbell, B Govindarajan, C Der, T Battle, D Frank, K Ye, E Murad, W Dubiel, G Soff y J Arbiser. 2003. Honokiol, a small molecular weight natural product, inhibits angiogenesis *in vitro* and tumor growth *in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry*. **278**(37): 35501-35507.
- Bills G, A. Dombrowski, F. Pelaez, J. Polishook y Z. An. 2002. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. *In* R. Watling, J. Frankland, A. Ainsworth, S. Issac y C. Robinson *Tropical micology: micromycetes*, vol 2 CABI Publishing. Nueva York. pp 165-194.
- Bourgaud F, A Gravot, S Milesi y E Gontier. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. **161**: 839-851.
- Boustie J y M Grube. 2005. Lichens-a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources*. **3**(2): 273-287.
- Budzikiewicz H. 1993. Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiology Reviews*. **104**: 209-228.
- Choudhary D y B Johri. 2009. Interactions of *Bacillus spp.* and plants - with special reference to induced systemic resistance. *Microbiological Research*. **164**(5): 493-513.
- Coimbra C, R Rufino, J Luna y L Sarubbo. 2008. Studies of the cell surface properties of *Candida* species and relation to the production of biosurfactants for environmental applications. *Current Microbiology*. **58**: 245-251.
- Compant S, B Duffy, J Nowak, C Clément y E Barka. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**(9): 4951-4959.
- Cragg G y D Newman. 2007. Anticancer drug discovery and development from natural products. *In*: Colegate S y R Molyneux. (eds.) *Bioactive natural products. Detection, isolation, and structural determination*. pp. 323-371.
-

- Demain A. y S. Sánchez. 2009. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*. **62**: 5-16.
- Demain A and S Sanchez. 2011. Fermentation improvement of processes yielding natural products for industry. En: *Bioactive Natural Products Opportunities and Challenges in Medicinal Chemistry*. Brahmachari, G (Ed.). World Scientific Publishing Co., NJ. pp. 601-629.
- Dewick P. 2009. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. Tercera edición. John Wiley and Sons. 509 p.
- Déziel É, G Paquette, R Villemur, F Lépine y JG Bisailon. 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**(6): 1908-1912.
- Domínguez F, M Chávez, M Garduño-Ramírez, V Chávez-Ávila, M Mata y F Cruz-Sosa. 2009. Production of honokiol and magnolol in suspension cultures of *Magnolia dealbata* Zucc. *Natural Product Communications*. **4**(7): 939-943.
- Edwin H, I Wells, P Katzman, C Cain, F Jacobs, S Thayer, E Doisy, W Gaby, E Roberts, R Muir, C Carroll, L Jones y N Wade. 1945. Antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biological Chemistry*. **196**: 331-340.
- Espinosa-Gómez A. 2012. Búsqueda de hongos asociados a *Magnolia dealbata* Zucc. productores de metabolitos con actividad antimicrobiana. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Essar D, L Eberly, A Hadero y I Crawford. 1990. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *Journal of Bacteriology*. **172**(2): 884.
- Gross H y J Loper. 2009. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nature Product Reports*. **26**: 1408-1446.
- Gutierrez L y A Vovides. 1997. An *in situ* study of *Magnolia dealbata* Zucc. in Veracruz state: an endangered endemic tree of Mexico. *Biodiversity and Conservation*. **6**: 89-97.
- Ho K, C Tsai, C Chen, J Huang y C Lin. 2001. Antimicrobial activity of honokiol and magnolol isolated from *Magnolia officinalis*. *Phytotherapy Research*. **15**(2): 139-141.
- Höfle G y H Reichenbach. 2005. Epothilone, a Myxobacterial metabolite with promising antitumor activity. En: Cragg G, D Kingston y Newman D. 2005. *Anticancer agents from natural products*. Taylor and Francis. pp.413-451.
- Höller U, A Wright, G Matthée, G König, S Draeger, Hans-Jürgen y B Chulz. 2000. Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. **104**:1354-1365.
- IPNI. 2012. Recurso en Red: [http://www.ipni.org/ipni/idPlantNameSearch.do?id=554674-1&back\\_page=%2Fipni%2FeditSimplePlantNameSearch.do%3Ffind\\_wholeName%3Dmagnolia%2Bdealbata%26output\\_format%3Dnorma](http://www.ipni.org/ipni/idPlantNameSearch.do?id=554674-1&back_page=%2Fipni%2FeditSimplePlantNameSearch.do%3Ffind_wholeName%3Dmagnolia%2Bdealbata%26output_format%3Dnorma).
- Jacobo-Salcedo M, L Gonzalez-Espindola, A Alonso-Castro, M Gonzalez-Martinez, F Domínguez y A Garcia-Carranca. 2011. Antimicrobial activity and cytotoxic effects of *Magnolia dealbata* and its active compounds. *Natural Products Communications*. **6**(8): 1121-1124.

- James D y N Gutterson. 1986. Multiple antibiotics produced by *Pseudomonads fluorescens* HV37a and their differential regulation by glucose. *Applied and Environmental Microbiology*. **53**(5): 1183-1189.
- 
- Jesse W y J Vederas. 2009. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier. *Science*. **325**: 161-165.
- Joklik W, L Ljungdhahl, A O'Brien, A Graevenitz y C Yanofsky. 1999. *Microbiology. A centenary perspective*. ASM Press. Washington, USA. p. 604.
- Joshi V, D Attri, A Bala y S Bhushan. 2003. Microbial pigments. *Indian Journal of Biotechnology*. **2**: 362-369.
- Judd W, C Campbell, E Kellogg, P Stevens y M Donoghue. 2007. *Plant systematics. A phylogenetic approach*. Third edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. USA. p. 576.
- Kelecom A. 2002. Secondary metabolites from marine microorganisms. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. **74**(1): 151-170.
- Kellenberg E. 2001. Exploring the unknown. The silent revolution of microbiology. *European Molecular Biology Organization*. **2**(1): 5-7.
- Kingston D. 2005. Taxol and its analogs. *In: Cragg G, D Kingston y Newman D (eds).. Anticancer agents from natural products*. Taylor and Francis. pp 89-123.
- Knight V, J Sanglier, D Tullio, S Braccili, P Bonner, J Waters, D Hughes y L Zhang. 2003. Diversifying microbial natural products for drug discovery. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **62**(5-6): 446-458.
- Kotani A, S Kojima, H Hakamata, D Jin y F Kusu. 2005. Determination of honokiol and magnolol by micro HPLC with electrochemical detection and its application to the distribution analysis in branches and leaves of *Magnolia obovata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **53**(3): 319-322.
- Kusari S y M Spiteller. 2011. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes?. *Natural Product Reports*. **28**: 1203.
- Leisinger T y R Margraff. 1979. Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiological Reviews*. **43**(3): 422-442.
- Lindow S y M Brandl. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Applied Environmental Microbiology*. **69**(4): 1875-1883.
- Mauger A y H Lackner. 2005. The actinomycins. *In: Cragg G, D Kingston y Newman D (eds).. Anticancer agents from natural products*. Taylor and Francis. pp 281-299.
- Meyer J y M Abdallah. 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Journal of General Microbiology*. **107**: 319-328.
- Manterola M. 2011. Aislamiento e identificación de una cepa bacteriana asociada a *Magnolia dealbata* Zucc. por su capacidad para producir un antibacteriano. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- Montesinos E. 2003. Plant-associated microorganisms: a view from the scope of microbiology. *International Microbiology*. **6**: 221-223.

- Osborne K, K Hobbs y J Trent. 1987. Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer research and Treatment*. **9**: 111-121.
- Palleroni N. 1983. Gram-negative aerobic rods and cocci. *In*: Krieg N y J Holt. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. Williams and Wilkins. Baltimore. pp. 140-409.
- 
- Philson S y M Llinás. 1982. Siderochromes from *Pseudomonas fluorescens*. Isolation and characterization. *The Journal of Biological Chemistry*. **257**(14): 8081-8085.
- Pijoan M. 2003. Medicina y etnobotánica aztecas. *OFFARM*. **22**(9): 128-136.
- Pinzon N y LK Ju. 2009. Improved detection of rhamnolipid production using agar plates containing methylene blue and cetyl trimethylammonium bromide. *Biotechnology Letters*. **31**(10): 1583-1588.
- Raaijmakers J, Bruijn I y M Kock. 2006. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonads* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **19**(7): 699-710.
- Ramachandra R y G Ravishankar. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. **20**(2): 101-153.
- Rokem J, A Lantz y J Nielsen. 2007. Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Natural Product Reports*. **24**: 1262-1287.
- Ruíz B, A Chávez, A Forero, Y García-Huante, A Romero, M Sánchez, D Rocha, B Sánchez, R Rodríguez-Sanoja, S Sánchez y E Langley. 2010. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*. **36**(2): 146-67.
- Sánchez S, S Guzmán-Trampe, M Ávalos, B Ruíz, R Rodríguez-Sanoja y M Jiménez-Estrada. 2012. Microbial natural products: chemical diversity. *En: Natural products and natural product models*. Wiley Encyclopedia of Chemical Biology.
- Sarker S y Y Maruyama. 2002. *Magnolia*: the genus *Magnolia* (medicinal and aromatic plants-industrial profiles). Taylor and Francis. Escocia, UK. p. 187.
- Schulz B y C Boyle. 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research*. **109**(6): 661-686.
- Schulz B, C Boyle, S Draeger, A Römmert y K Krohn. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*. **106**(9): 996-1004.
- Schühly W, I Khan y N Fischer. 2001. The Ethnomedicinal uses of Magnoliaceae from the Southeastern United States as leads in drug discovery. *Pharmaceutical Biology*. **39**: 63-69.
- Stanier R, N Palleroni y M Doudoroff. 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *Journal of General Microbiology*. **43**(2): 159-271.
- Stierle A, G Strobel y D Stierle. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces adreanae*, an endophyte fungus of pacific yew. *Science*. **260**(5105): 214-216
- Strobel G, W Hess, E Ford, R Sidhu y X Yang. 1996a. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. *Journal of Industrial Microbiology*. **17**: 417-423.
- Strobel G, X Yang, J Sears, R Kramer, R Sidhu y M Hess. 1996b. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology*. **142**: 435-440.

- Strobel G y B Daisy. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **67**(4): 491-502.
- Strobel G, B Daisy, U Castillo y J Harper. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*. **67**: 257-268.
- Tan R y W Zou. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*. **18**: 448-459.
- 
- Uzair N, A Kousar y D Edwards. 2006. Isolation and characterization of *Pseudomonas* strain that inhibit growth of indigenous and clinical isolate. *The Internet Journal of Microbiology*. **2**(2).
- Vázquez-G J. 1994. Magnolia (Magnoliaceae) in Mexico and central America: a synopsis. *Brittonia*. **46**(1): 1-23.
- Velazco-Macías C, Foroughbakhch-Pournavab, G Alanís-Flores y M Alvarado-Vázquez. 2008. *Magnolia dealbata* en Nuevo León, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. **79**: 459-463.
- Weisburg W, S Barns, D Pelletier, and D Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* **173**: 697-703.
- Xiao R y W Kisaalita. 1995. Purification of pyoverdines of *Pseudomonas fluorescens* 2-79 by copper-chelate chromatography. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**(11): 3769-3774.
- Xiao R y W Kisaalita. 1998. Fluorescent Pseudomonad pyoverdines bind and oxidize ferrous ion. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**(4): 1472-1476.
- Yung-Hsiang C, H Po-Hsun, L Feng-Yen, C Wen-Chi, C Yuh-Lien, Y Wei-Hsian, M Kee-Ming y L Po-Len. 2011. Magnolol: a multifunctional compound isolated from the Chinese medicinal plant *Magnolia officinalis*. *European Journal of Integrative Medicine*. **3**(4): e317-e324.
- Zhang L y A Demain. 2005. Natural products. Drug discovery and therapeutic medicine. Humana Press. USA. p. 37

Suplemento 1.

Cuadro de resumen de los microorganismos aislados de *M. dealbata* Zucc. Se muestra el fragmento de la planta del cual se aisló el microorganismo, el número de caja que le fue asignado y el correspondiente aislado, así como el medio del cual se aisló, el resultado de la tinción de Gram y el patrón de antibiósisis.

Fragmento de planta	# de caja	Aislados	Observaciones	Gram	PA
Corteza externa s/s. A.1	1	A	AN. Tipo bacteria, beige	Gram negativo, cocobacilo	3
		AC	AN. Tipo bacteria, beige, crecimiento en línea lento	Gram negativo, cocobacilo	9
		AB	AN. Tipo bacteria, café clara, crecimiento en línea lento, s/secreción	Gram negativo, bacilo	9
		AD	AN. Tipo bacteria, rosa al centro y blanco periferia, cremoso	Gram negativo, cocobacilo	3
		AE	AN. Tipo bacteria, beige, crecimiento en línea moderado	Gram negativo, bacilo	7
		B	AN. Tipo bacteria, blancuzco, crecimiento en línea moderado	Gram positivo, bacilo	3
		B P/CA	AN. Tipo bacteria, blanco, crecimiento en línea, cremoso	Gram negativo, bacilo	13
Corteza interna s/s A.1	2	A	AN. Tipo bacteria, blanco, poco cremoso	Gram positivo, bacilo	3
		B	Cremoso, amarillo, tipo bacteria	Gram negativo, bacilo	5
		BC	AN. Parecido a bacteria, color café rosáceo	Gram negativo, bacilo	3
Corteza. A.1	3	A	AN. Tipo bacteria, ligeramente cremoso, transparente	Gram negativo, bacilo	3
		AB	AN. Tipo bacteria, blanco, crecimiento rápido y extensivo	Gram negativo, cocobacilo	10
		AC	AN. Tipo bacteria, crecimiento rápido, transparente, cremeoso	Gram positivo, bacilo	10
Corteza. A.2	4	A	AN. Tipo bacteria, blanco, redondeado, poco cremoso	Gram negativo, bacilo	1
		B	AN. Tipo bacteria, beige, cremoso	Gram negativo, bacilo	3
		BC	AN. Tipo bacteria, blancuzco, cremoso	Gram positivo, cocos	3
		BD	AN. Tipo hongo, blanco, crecimiento invasivo		3
Corteza. s/s. A.2	5	A	CM. Poco cremoso, blancuzco, tipo bacteria	Gram positivo, bacilo	1
Rama. A.2	6	A	CM. Tipo bacteria, blanco, cremoso	Gram negativo, cocobacilo	3
		B	CM. Tipo bacteria, crecimiento en línea moderado, cremoso	Gram negativo, cocobacilo	3
Raíz. A.2	7	A	AN. Tipo bacteria, beige, poco cremosa	Gram positivo, bacilo	3
		B	CM. Tipo bacteria, blancuzca, cremosa, crecimiento en línea	Gram positivo, bacilo	2
Raíz. A.1	8	A	AN. Tipo bacteria, transparente	Gram negativo, bacilo	1
		AB	AN. Tipo bacteria, blanco, crecimiento en línea moderado	Gram positivo, estreptobacilo	3
		AC	AN. Tipo bacteria, blancuzco, s/secreción, crecimiento en línea lento	Gram positivo, estreptobacilo	1
		B	AN. Tipo bacteria, blancuzco-amarillento, crecimiento en línea	Gram negativo, bacilo	1

Corte hoja. A.1	9	A	AN. Tipo hongo, color beige, crecimiento radial	Gram negativo, bacilo	1
		B	AN. Tipo bacteria, beige, cremoso	Gram positivo, bacilo	3
Raíz. A.2	10	A	AN. Tipo bacteria, punto cremoso, blanco	Gram positivo, bacilo	3
		BC	AN. Tipo bacteria, beige, crecimiento en línea, poco cremoso	Gram positivo, cocos	3
Raíz. s/s. A.1	11	A	AN. Tipo bacteria, invasivo, beige	**	1
Tronco delgado A.1	12	A	AN. Tipo bacteria, cremoso, blanco	Gram negativo, cocobacilo	2
Tronco delgado A.1	13	A	CM. Tipo hongo, blanco, tipo pelusa		1
		AB	AN. Tipo bacteria, beige, crecimiento en línea lento, sin secreción	Gram negativo, cocobacilo	1
Raíz. A.1	14	A	CM. Tipo bacteria, blanco, muy cremoso, crecimiento en línea	Gram negativo, cocobacilo	5, 11
Tronco delgado int. A.1	15	A	AN. Tipo bacteria, amarillo tenue, cremoso, crecimiento en línea	Gram negativo, cocobacilo	3
Corteza interna A.1	16	A	CM. Tipo bacteria, blancuzco, cremoso, grueso y con levantamientos	Gram negativo, cocobacilo	8, 12
Fruto. A.1	17	A	CM. Tipo hongo, dorso blanco, ventral naranja		3
		AB	CM. Tipo hongo, crecimiento radial, café con puntos amarillos		1
		AC	CM. Tipo hongo, crecimiento radial, blanco, algodonoso		1
Corteza externa A.1	18	A	AN. Tipo bacteria, blanca	Gram negativo, cocobacilo	3
		B	AN. Tipo bacteria, amarillento, crecimiento en línea lento, cremoso	Gram negativo, cocobacilo	3
Fruto. A.1	19	A	AN. Tipo bacteria, beige, muy cremosa	**	10
Hoja. A.1	20	A	CM. Tipo hongo, color café claro, crecimiento en línea lento		3
		AB	AN. Tipo hongo, blancuzco, ligeramente cremoso		3
Raíz. A.1	21	A	AN. Tipo bacteria, blancuzca, crecimiento radial, cremoso	**	7
Hoja A.2	22	A	AN. Tipo bacteria, beige, crecimiento lento, poca secreción	**	2
Agua corteza A.2	23	A	AN. Tipo bacteria, crecimiento radial, blanca	Gram negativo, bacilo	1
		AC	AN. Tipo bacteria, blanco, crecimiento en línea moderado	Gram positivo, estreptobacilo	1
		B	AN. Tipo bacteria, amarillenta, cremoso	Gram negativo, bacilo	2
Agua raíz A.1	24	A	CM. Tipo bacteria, beige, poco cremoso	Gram negativo, cocobacilo	4
		B	AN. Tipo bacteria, amarillo, cremoso	Gram negativo, bacilo	3
		B	CM. Tipo hongo, amarillo claro, crecimiento en línea moderado	**	1
		C	AN. Tipo bacteria, beige, crecimiento en línea, poco cremoso	Gram negativo, cocobacilo	1
		C	CM. Tipo hongo, amarillo, poco cremoso, crecimiento lento	**	1
Corteza interna s/s A.1	25	A	CM. Tipo hongo-bacteria, beige, cremoso	Gram positivo, bacilos	3

			AN. Tipo bacteria, beige exterior blanco, cremoso	Gram positivo, estreptobacilo	1
		B	CM. Tipo bacteria, beige, crecimiento en línea, poco cremoso	Gram negativo, cocobacilo	3
Corteza. A.2	26	A	CM. Tipo hongo, café claro, crecimiento lento		3
Rama. A.1	27	A	AN. Tipo bacteria, beige, medianamente cremosa	**	3
Raíz. s/s A.1	28	A	CM. Tipo bacteria, café claro, crecimiento en línea, muy cremoso	Gram negativo, cocobacilo	6
		B	CM. Tipo hongo, crecimiento en línea, beige		3
		C	CM. Tipo bacteria, crecimiento en línea, crema al centro	Gram negativo, bacilo	3
		D	CM. Tipo hongo, blancuzco centro, periferia café	**	1
		E	CM. Tipo hongo, crecimiento moderado poco cremoso		3
Agua raíz A.1	29	A	AN. Tipo bacteria, rosa pardo, cremosa	Gram negativo, cocobacilo	3
		B	AN. Tipo bacteria, blanco, poco cremoso	Gram negativo, cocobacilo	1
		C	AN. Tipo bacteria, amarillenta con blanco en periferia, cremosa	Gram negativo, cocobacilo	10
Corteza. s/s A.1	30	AC	AN. Tipo bacteria, café claro, crecimiento en línea moderado	Gram positivo, bacilo	1
		B	AN. Tipo bacteria, beige, crecimiento en línea	Gram positivo, cocos	1
		C	AN. Tipo bacteria, blanco, crecimiento en línea, poco cremoso	**	2
Agua corteza A.1	31	A (b.a)	AN. Tipo bacteria, grumoso, color amarillo mostaza	**	3
		A (b.b)	AN. Tipo bacteria, café claro, crecimiento en línea, lento	Gram negativo, cocobacilo	3
		A (c.a)	AN. Tipo bacteria, amarillo mostaza, crecimiento lento en línea	**	3
Agua raíz A.2	32	A	AN. Tipo bacteria, blanca	Gram negativo, cocobacilo	3
		B	AN. Tipo bacteria, transparente, líquida	Gram negativo, cocobacilo	3
Corteza externa. s/s A.1	33	A	CM. Tipo hongo, blanco, algodonoso		1
		B	CM. Tipo hongo, crecimiento radial, café claro con puntos negros		1
		C	CM. Tipo hongo, crecimiento radial, transparente y blanco en periferia		1
		D	CM. Tipo hongo, beige, crecimiento en línea, muy poco cremoso		3
		E	CM. Tipo hongo invasivo verde		3
Hoja. A.2	34	A	CM. Tipo hongo, crecimiento radial, blanco con centro naranja		1
		B	CM. Tipo hongo ramificado verde oscuro		3
Rama. s/s. A.2	35	A	CM. Tipo hongo crecimiento radial invasivo, blanco, algodonoso		2
		B	CM. Tipo hongo puntos negros, invasivo		1
		C	CM. Hongo transparente y blanco, puntas naranjas, algodonoso		3

Agua raíz A.2	36	A	CM. Tipo hongo, crecimiento radial, blanco claro		14
			AN. Tipo bacteria, beige, crecimiento en línea moderado	**	3
		B	CM. Tipo hongo dorsal banco, ventral café, algodonoso		1
		C	CM. Tipo bacteria, rosa pálida, crecimiento en línea lento, cremoso	**	3
		D	CM. Tipo hongo, crecimiento radial, verde pequeño, algodonoso		2
		E	CM. Tipo hongo, dorsal blanco, ventral beige, algodonoso		1
		F	CM. Tipo hongo dorsal blanco, ventral cobrizo		1
Agua corteza A.1	37	A	CM. Tipo hongo, crecimiento radial, blanco		1
		B	CM. Tipo Hongo radial, verde opaco, algodonoso		1
Corteza. A.1	38	A	CM. Tipo hongo, crecimiento radial, rosa con blanco		3
		B	CM. Tipo hongo radial, café oscuro, crecimiento en línea por puntos		3
Tronco delgado A.1	39	A	CM. Tipo hongo, café oscuro, periferia beige, algodonoso		2
		B	CM. Tipo hongo, gris opaco, algodonoso		3
Tronco grueso A.1	40	A	CM. Tipo hongo verde crecimiento circular		3
		B	CM. Tipo hongo lechoso, beige		3
Raíz. A.2	41		CM. Tipo hongo, crecimiento radial, gris claro, algodonoso		3
Rama. A.2	42	A	CM. Tipo hongo, centro beige con puntos negros, algodonoso		3
		B	CM. Tipo hongo, crecimiento radial, blanco con puntos negros		1
Agua corteza A.2	43	A	CM. Tipo hongo, blanco, crecimiento abundante, algodonoso		3
		B	CM. Tipo hongo, crecimiento sumamente escaso		3

En la primera columna se registra de donde se aisló el microorganismo, corteza interna o externa, raíz, hoja, rama y el agua en la que se transportaron estos fragmentos. (PA) patrón encontrado, (\*\*) no se pudo realizar la tinción de Gram, (s/s) fragmento sin sanitizar, (A.1) árbol 1, (A.2) árbol 2, (CM) Medio Czapek y (AN) Agar Nutritivo.

Anexo1.

**NA- Agar Nutritivo**

23 g/L

Fórmula:

0.5% Peptona

0.3% Extracto de carne

1.5% Agar

0.5% NaCl

**Czapeck**

Sacarosa 30 g/L

NaNO<sub>3</sub> 3 g/L

MgSO<sub>4</sub> 0.5 g/L

KCl 0.5 g/L

FeSO<sub>4</sub> 0.01 g/L

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0

Agar 15

Cloranfenicol 25 mg/mL

Peptona 1.0%

g/L

MgSO<sub>4</sub> 0.0016 M

mL

10

3.2

Ajustar el pH a 7.4 con HCl

**NB- Nutrient Broth**

Bacto extracto de carne 3 g/L

Bacto peptona 5 g/L

**PPGAS**

NH<sub>4</sub>Cl 1.0698 g/L

KCl 1.491 g/L

TRIS-HCl 18.912 g/L

Glucosa 25 mL/L

Peptona 10 g/L

MgSO<sub>4</sub> 3.2 mL/L

Ajustar a pH 7.4

**KB**

Proteosa-Peptona 20 g/L

Glicerol 10 mL/L

Fosfato monopotásico 1.5 g/L

MgSO<sub>4</sub> 1.5 g/L

**CTAB+AM+PPGAS**

Componentes de medio PPGAS 1L

CTAB ( Bromuro de hexadeciltrimetilamonio)

0.2 g/L

MB

0.005 g/L

Agar 12

g/L

**PPGAS**

NH<sub>4</sub>Cl 0.02 M 1.069

g/L

KCl 0.02 M

1.491g/L

TRIS

18.912 g/L

Glucosa 0.5% 25

mL

Anexo 2.

### **Sefarosa quelada con $\text{CuSO}_4$**

1. Homogenizar el contenido por agitación suave del contenedor de la sefarosa para quelar (GE Healthcare Chelating Sepharose Fast Flow) .
  - i. Tomar 250  $\mu\text{L}$  de sefarosa y colocar en un tubo eppendorf.
  - ii. Centrifugar 3 min a 3000 rpm
  - iii. Retirar el sobrenadante
2. Lavado del gel. Agregar 5 volúmenes de agua destilada esterilizada.
  - i. Agitar por inversión hasta resuspender
  - ii. Centrifugar 3 min a 3000 rpm.
  - iii. Retirar el sobrenadante
3. Adicional 1 mL de  $\text{CuSO}_4$  0.1 M
  - i. Agitar por inversión durante 5 min.
  - ii. Centrifugar 3 min. a 3000 rpm
  - iii. Retirar el sobrenadante
4. Agregar 5 volúmenes de agua destilada
  - i. Agitar por inversión 5 min
  - ii. Centrifugar 3 min a 3000 rpm
  - iii. Retirar sobrenadante
5. Repetir el paso 3 y 4 dos veces

### **Buffer HEPES+NaCl**

HEPES 1 M pH 7.0

HEPES 120 mM pH 7.0+ 100 mM NaCl

### **Buffer acetatos+NaCl**

Acetato de sodio 20 mM + 100 mM NaCl a pH 5