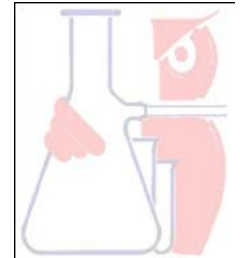




BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO:
CARACTERIZACIÓN DE ACTINOBACTERIAS PERTENECIENTES A
LA FAMILIA *Geodermatophilaceae* AISLADAS DEL CACTUS
Neobuxbaumia macrocephala.

PRESENTA: JONATHAN PERALTA CHAVEZ

Directora de Tesis: M.C. MARÍA DEL ROCÍO BUSTILLOS
CRISTALES

Asesor de Tesis: D.C. ANA MARTA DE LOS ÁNGELES LOBO
SÁNCHEZ

Coasesor de Tesis: D.C. JOSÉ ANTONIO MUNIVE HERNÁNDEZ

MAYO 2016

ÍNDICE

1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	7
3. MARCO TEÓRICO	8
3.1 <i>Neobuxbaumia macrocephala</i>	9
3.2 ACTINOBACTERIAS	10
3.3 FAMILIA <i>Geodermatophilaceae</i> .	11
3.4 CARACTERIZACIÓN BACTERIANA	12
3.4.1 MÉTODOS GENOTÍPICOS Y FILOGENÉTICOS	12
3.4.2 MÉTODOS FENOTÍPICOS	14
4. MARCO DE REFERENCIA	15
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
6. JUSTIFICACIÓN	18
7. OBJETIVOS	19
8. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	19
8.1 TIPO DE ESTUDIO	19
8.2 UNIVERSO DEL ESTUDIO	19
8.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA	19
8.4 SEDE Y LUGAR DEL ESTUDIO	20
8.5 CRITERIOS DE SELECCIÓN	20
8.6 RECURSOS HUMANOS	20
8.7 RECURSOS FINANCIEROS	20
9. METODOLOGÍA	21
9.1 CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA	22

9.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	24
10. MATERIAL	31
11. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO	33
12. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
12.1 CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA	34
12.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	38
13. CONCLUSIONES	49
14. BIBLIOGRAFÍA	51
15. ANEXOS	59

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. MEZCLA DE REACTIVOS PCR	22
TABLA 2. PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN 16S RADN	23
TABLA 3. ASIGNACIÓN TAXONÓMICA FILOGENÉTICA	36
TABLA 4. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS	38
TABLA 5. ASIMILACIÓN DE FUENTES DE CARBONO	39
TABLA 6. CRECIMIENTO EN DISTINTOS PH	39
TABLA 7. CRECIMIENTO EN DISTINTAS TEMPERATURAS	40
TABLA 8. PRUEBAS BIOQUÍMICAS	41
TABLA 9. PRUEBA DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS	42

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO	33
FIGURA 2. PRODUCTO DE LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN 16S rADN	34
FIGURA 3. CROMATOGRAMA DE LA SECUENCIA DEL GEN 16S rADN CEPA UAPS01-112	35
FIGURA 4. RESULTADO DEL ANÁLISIS BLAST DE LA SECUENCIA 16S rADN DE LA CEPA UAPS01-112	35
FIGURA 5. CROMATOGRAMA DE LA SECUENCIA DEL GEN 16S rADN DE LA CEPA UAPS01-113	36
FIGURA 6. RESULTADO DEL ANÁLISIS BLAST DE LA SECUENCIA 16S rADN DE LA CEPA UAPS01-113	36
FIGURA 7. CROMATOGRAMA DE LA SECUENCIA DEL GEN 16S rADN DE LA CEPA UAPS01-114	37
FIGURA 8. RESULTADO DEL ANÁLISIS BLAST DE LA SECUENCIA 16S rADN DE LA CEPA UAPS01-114	37

1. RESUMEN

La Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán es conocida por su diversidad y endemismo de especies tanto de fauna como de flora, con respecto a este último grupo, los estudios sobre plantas xerófilas son muy abundantes, sin embargo, la comunidad de actinobacterias que tienen asociada ha sido poco explorada.

En este trabajo se estudian tres cepas de actinobacterias pertenecientes a la familia *Geodermatophilaceae* que fueron aisladas del cactus en peligro de extinción *Neobuxbaumia macrocephala* de la reserva de la biósfera de Tehuacán-Cuicatlán. El estudio comprende un análisis polifásico en el cual la caracterización genotípica se basó en la secuenciación del gen 16S rADN y el estudio fenotípico se realizó a través de la determinación de las capacidades metabólicas y fisiológicas de las bacterias a través de diferentes pruebas de crecimiento diferencial.

El análisis del gen 16S rADN y las pruebas fenotípicas reportan una asignación taxonómica perteneciente al género *Modestobacter*, dichos resultados fueron corroborados por su comparación con los resultados obtenidos de las mismas pruebas realizadas a cinco cepas de referencia pertenecientes a la familia (*Geodermatophilaceae*) pero que pertenecen a diferentes géneros.

La identificación y potencial caracterización de actinobacterias aisladas de *N. macrocephala* permitirá ampliar el conocimiento de la biodiversidad de actinobacterias asociadas a dicho cactus, con la posibilidad de aprovechar las capacidades metabólicas y ecológicas de las actinobacterias del desierto y que de alguna manera nos permitan en un futuro poder mantener o incrementar la población de plantas de *N. macrocephala* que hoy en día se encuentra en riesgo de extinción.

2. INTRODUCCIÓN

El cactus conocido como *Neobuxbaumia macrocephala* es uno de los diferentes tipos de cactus hallados en la Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán; pertenece a la familia *Cactaceae* y se le conoce comúnmente como cardón, florece en los meses de marzo a julio, tiene una estructura columnar algunas veces ramificada y puede alcanzar hasta 14 m de altura, la cual es alcanzada en varias décadas.

Neobuxbaumia macrocephala es una cactácea rara y endémica del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, cuyo estudio poblacional es relevante porque es una de las especies de la región con mayor grado de vulnerabilidad, debido a su restringida distribución y especificidad de hábitat. Además, las actividades humanas y la consecuente perturbación de su hábitat han llevado a condiciones críticas a sus escasas poblaciones.

(Esta especie está catalogada actualmente en la Norma Oficial Mexicana (SEMARNAT, 2010) como especie "en peligro de extinción" http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5173091&fecha=30/12/2010.

En un estudio de diversidad bacteriana metilotrófica en la cactácea *N. macrocephala*, en la Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán, se encontró un 49 % de aislados pertenecientes al grupo taxonómico de las actinobacterias, de ahí el interés de caracterizar a algunos de estos aislados.

Los datos anteriores tienen gran importancia para este estudio ya que las actinobacterias representan un grupo de microorganismos ampliamente distribuido en diversos hábitats y tienen gran importancia en la participación de la degradación de la materia orgánica, además de ciertas propiedades fisiológicas que los hacen particulares. El orden de los *Actinomycetales* comprende 63 géneros, constituyendo aproximadamente del 20 – 60 % de la población microbiana del suelo. En ambientes hostiles es frecuente que las actinobacterias sean de los microorganismos predominantes.

Se pretende caracterizar a la población de actinobacterias asociadas a *N. macrocephala* con el

propósito de generar conocimiento de la diversidad microbiana de actinobacterias asociadas a esta planta porque a futuro nos va a permitir no sólo el desarrollo de estrategias de conservación de plantas en riesgo, sino que también nos va a generar conocimiento básico para conocer y explorar las asociaciones benéficas entre actinobacterias y cactáceas en riesgo.

3. MARCO TEÓRICO

La Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán abarca 4,897 km², en los cuales hay 307 poblados y 35,500 habitantes, aproximadamente. Está ubicado entre los 17°39' a 18°53' de latitud Norte y los 96°55' a 97°44' de longitud Oeste y recibe un promedio de 300 a 400 mm lluvia al año y tiene una temperatura media anual de 20 °C (García- Amaro, 1973).

La provincia fitogeográfica del Valle de Tehuacán-Cuicatlán abarca 10,000 km²; sigue una dirección sureste-noroeste por las Sierras de Juárez, Zongolica y Tecamachalco, en la parte sureste del estado de Puebla y noroeste del de Oaxaca (Rzedowski, 1978). Fisiográficamente, el Valle de Tehuacán es parte de la provincia Mixteca-Oaxaqueña (Valiente-Banuet *et al.*, 2000; Tamayo, 1962) y abarca varios valles de origen tectónico, entre los que destacan los de Cuicatlán, Huajuapán, Tehuacán, Tepelmeme y Zapotitlán formando parte de las cuencas altas de los ríos Papaloapan y Balsas. Su límite al este y noreste es la Sierra Madre Oriental (Sierra de Zongolica y Sierra de Juárez). (Ochoa, 2001).

Todos los valles que conforman la zona de Tehuacán-Cuicatlán están limitados por una serie de serranías que en su conjunto determinan la Sierra Mixteca, parte de la Sierra Madre Oriental (Ochoa, 2001); dichos valles en medio de las serranías forman distintos microhábitats, cada uno con diferente cantidad de agua, temperatura y pH lo anterior da la posibilidad de albergar especies de plantas que en ningún otro hábitat podrían sobrevivir. (Arias *et al.*, 2001)

El aislamiento en el que se encuentra el valle de Tehuacán-Cuicatlán y los cambios climáticos, hacen que se presente una gran diversidad y endemismo de plantas. El valle es considerado por algunos especialistas como centro de especiación. Entre la riqueza vegetal destacan los cactus

y la presencia del 10% de agaves del total registrado en el país (Arias *et al.*, 2001, Bravo-Hollis 1978).

3.1 *Neobuxbaumia macrocephala*

El cactus conocido como *Neobuxbaumia macrocephala* es uno de los diferentes tipos de cactus hallados en la Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán; pertenece a la familia Cactaceae y se le conoce comúnmente como cardón, florece en los meses de marzo a julio, tiene una estructura columnar, algunas veces ramificada, que alcanza hasta 14 m de altura. Las espinas de las puntas de las ramas son de color rojizo; en estas regiones se producen también las flores. (Arias *et al.*, 2001)

N. macrocephala es una especie que está en peligro de extinción, ya que sólo se halla en la reserva de Tehuacán-Cuicatlán y de manera exclusiva en zonas donde hay un microclima específico para su desarrollo; con un gradiente de altitud que va de 1,600 a 1,980 msnm (metros sobre el nivel del mar), y pertenece al sistema Zapotitlán. La temperatura media determinada para esta zona varía entre 17.3 y 17.9 °C y su precipitación es de 570 a 610 mm. Por su relieve y pendiente del 60%, los suelos que presentan corresponden a suelos someros, calcáreos, de color oscuro, textura franca, ricos en materia orgánica y nutrientes, con reacción alcalina. Los efectos de la actividad minera y pecuaria hacen que esta unidad se califique como degradada, con problemas severos de erosión hídrica y eólica (López-Galindo *et al.*, 2003). En las zonas donde se pueden encontrar miembros de esta especie hay pocas plantas maduras, distanciadas entre sí y el número de plantas hijas que genera cada planta adulta es muy reducido; además de requerir mucho tiempo para que la cactácea madure, con lo que las pequeñas plántulas son vulnerables ante los depredadores (Guzmán *et al.*, 2003), (Jiménez, 2011).

Al realizar estudios sobre alguna especie vegetal se pueden comprender varios aspectos ecológicos importantes, como su distribución y proliferación, tomando en cuenta los diferentes factores asociados a la planta, como el pH, temperatura, humedad del medio y la asociación

que forma con microorganismos. (Miquelajauregui Y. y Valverde T. 2010). Al conocer trabajos de investigación que hablen de las relaciones simbióticas que forman algunas plantas con ciertos microorganismos, se puede llegar a comprender la importancia ecológica y su posible papel en dicha asociación.

Realizando muestreos de suelos para conocer los principales microorganismos que lo habitan, se ha encontrado un gran número de actinobacterias, que constituyen aproximadamente el 20 – 60 % de la población microbiana del suelo (Ezziyyani *et al.*, 2004). Bustillos Cristales (tesis doctoral en proceso) realizó un estudio de diversidad bacteriana metilotrófica en la cactácea *N. macrocephala*, variedad endémica de la reserva de la biósfera de Tehuacán-Cuicatlán, y encontró un 49 % de aislados pertenecientes al grupo taxonómico de las actinobaterias, de ahí el interés de caracterizar a algunos de estos aislados.

3.2 ACTINOBACTERIAS

Las actinobacterias son microorganismos pertenecientes al filo Actinobacteria, que cuenta con 5 subclases y 14 órdenes. Son microorganismos con un alto contenido de G+C en su ADN y presentan una amplia variedad de morfologías, desde formas cocoides, cocobacilares, con hifas fragmentadas, o con micelio ramificado, diferenciado. (Ventura *et al.* 2007).

Las actinobacterias representan un grupo de microorganismos ampliamente distribuido en ecosistemas naturales y tienen gran importancia en la participación de la degradación de la materia orgánica, además de ciertas propiedades fisiológicas que los hacen particulares (Ghanem *et al.*, 2000). El orden de los Actinomycetales comprende 63 géneros, constituyendo aproximadamente del 20 – 60 % de la población microbiana del suelo (Ezziyyani *et al.*, 2004).

Dentro de sus características particulares, algunas presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado geosmina, adicionalmente presentan una actividad metabólica alta, producen terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares con las que son capaces de degradar la materia orgánica de origen vegetal y animal (Ezziyyani *et al.*, 2004). Como la gran mayoría de bacterias que son abundantes en suelo, presentan un importante

papel ecológico en el mismo, ya que forman parte del ciclo del carbono. (Ben-Omar *et al.*, 1997).

Existen tres factores que influyen en la distribución y en la actividad de muchas actinobacterias en el suelo: el pH, la temperatura y el tipo de suelo, en especial su composición. La mayoría de éstos microorganismos son mesófilos y su crecimiento se registra entre 15 a 35 °C; en temperaturas inferiores a 5 °C el crecimiento es prácticamente nulo y en temperaturas superiores a 55 °C sólo algunas especies termófilas de *Streptomyces sp.*, *Thermomonospora sp.* y *Thermoactinomyces sp.*, son capaces de crecer aunque el efecto de la alta temperatura posiblemente sea letal para el microorganismo si está acompañado de humedad (Stanley, 1994).

3.3 FAMILIA *Geodermatophilaceae*.

La familia *Geodermatophilaceae* pertenece al orden de los actinomicetales, a la clase Actinobacteria y al filo Actinobacteria. (Ventura *et al.*, 2007). La familia *Geodermatophilaceae*, como la describe Stackebrandt *et al.*, (1997), presenta hifas rudimentarias, sus colonias son rojas o color café oscuro, crecen en ambientes aeróbicos. El contenido de ADN G+C es de alrededor de 70 al 75 %.

Pueden habitar desde suelo seco y superficies de rocas hasta agua de mar; la familia *Geodermatophilaceae* contiene a los géneros: *Geodermatophilus*, *Blastococcus* y *Modestobacter*. El género tipo es *Geodermatophilus* (Luedeman, 1968).

Las especies que contiene esta familia son típicamente habitantes de superficies expuestas como rocas naturales y monumentos (Urzi *et al.*, 2004) o superficies de suelos (Luedemann, 1968); la mayoría son pigmentadas rosas, rojas, cafés o negras, esta característica está relacionada con la fotoprotección aunque la evidencia directa de esta hipótesis aún no se ha encontrado. (Gundlapally *et al.*, 2007).

La descripción de los tres géneros es la siguiente:

Modestobacter: Son organismos gram positivos, no formadores de esporas, en forma de bacilos cortos o cocos, con tendencia a permanecer agregadas y formar cortos filamentos multiseptados; son heterótrofos, aeróbicos, psicrotolerantes, con un 70 % de contenido de G+C. (Mevs *et al.*, 2000).

Geodermatophilus: Son organismos no capsulados, con micelios rudimentarios, no producen micelio aéreo, son organismos aeróbicos, gram positivos, las colonias usualmente se tornan café oscuro, negro-grisáceo o se pigmentan con color negro cuando los cultivos son viejos. (Luedemann, 1968)

Blastococcus: Son microorganismos gram positivos, aerobios, algunas veces microaerófilos, con forma cocoide, las células pueden hallarse solas o formando agregados, y pueden ser bacilos móviles o vibrioides. El porcentaje de relación G+C en el ADN es del 74 %. (Ahrens and Moll, 1970)

3.4 CARACTERIZACIÓN BACTERIANA

El propósito de un sistema de clasificación es construir grupos homogéneos y para ello se necesita definir la especie, que es la unidad biológica de la clasificación, para posteriormente describir, entender y comparar la diversidad biológica. La especie es definida como un grupo de individuos capaces de interactuar entre sí y producir descendencia fértil, pero son incapaces de hacerlo con miembros de otras especies. (Prakash O. *et al.*, 2007).

El método más empleado y conocido está basado en datos morfológicos y bioquímicos, suplementados con datos obtenidos de técnicas moleculares, que nos pueden ayudar a definir posteriormente el linaje de cada microorganismo analizado. (Prakash O. *et al.*, 2007). Una caracterización polifásica consta de 3 tipos de análisis: el fenotípico y el genotípico y el filogenético (Vandamme *et al.*, 1996).

3.4.1 MÉTODOS GENOTÍPICOS Y FILOGENÉTICOS

Los métodos genotípicos de caracterización bacteriana se basan en la información obtenida de ácidos nucleicos como ADN O ARN; en microbiología, la identificación molecular basada en el análisis de genes de mantenimiento y metabólicos se utiliza fundamentalmente para bacterias cuya identificación mediante otro tipo de técnicas resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo.

Algunos de los métodos más usados actualmente son:

- Determinación de las relaciones de bases de ADN (porcentaje de moles G+C). La determinación del porcentaje de moles de guanosina más citosina es un método clásico genotípico y es considerado parte de la descripción estándar de los taxones bacterianos. El rango observado está en no más del 3% dentro de especies bien definidas y no más del 10 % dentro de géneros bien definidos. Las variaciones están entre el 24 y el 76 % de manera general. (Vandamme *et al.*, 1996).
- El porcentaje de hibridación ADN-ADN y la disminución de la estabilidad térmica de los híbridos se utilizan para delinear las especies. El porcentaje de unión a ADN, el valor de hibridación ADN-ADN o la relación de unión relativa es un parámetro indirecto de la similitud de secuencia entre dos genomas enteros. Se ha establecido que la estabilidad térmica disminuye desde 1 hasta 2.2 % por cada desapareamiento. (Vandamme *et al.*, 1996).
- Estudios de homología ARNr. Ahora se acepta generalmente que el ARNr es el mejor objetivo para el estudio de las relaciones filogenéticas porque está presente en todas las bacterias, es funcional constantemente y está compuesto de dominios conservados. Los componentes del ribosoma (ARNr y proteínas ribosómicas) han sido el sujeto de estudio de diferentes estudios filogenéticos por varias décadas. El desarrollo gradual de

nuevas técnicas moleculares ha permitido a los microbiólogos centrarse en el estudio comparativo de las moléculas de ARNr. (Vandamme *et al.*, 1996).

- Métodos de tipificación en base a ADN. Este método se refiere a técnicas que permiten dividir especies en diferentes tipos, una de las mejores ventajas es que se aplica universalmente y hay muy pocas cepas que no se pueden caracterizar por éste método.

La introducción de la PCR basada en la identificación de ADN, ha sido de mucho interés por su aplicación universal, simplicidad y rapidez. Diferentes métodos con secuencias arbitrarias cortas son usadas como cebadores en el ensayo de PCR descrito de la siguiente manera: oligonucleótidos de 20 bases son usados como iniciadores de la PCR; oligonucleótidos de 10 bases son usados en el análisis de ADN polimórfico amplificado al azar y oligonucleótidos con 5 bases son usados en el ADN amplificado de fingerprinting. (Vandamme *et al.*, 1996).

La amplificación de un gen, (por medio de la PCR) para su posterior secuenciación, parte preferentemente de ADN extraído de un cultivo puro de la bacteria, pero también puede conseguirse directamente de una muestra del suelo. (Rodicio, M. R., Mendoza, M. C., 2004).

La comparación de secuencias de genes permite establecer relaciones filogenéticas existentes entre organismos procariontas. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente, permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias (Rodicio, M. R., Mendoza, M. C., 2004).

3.4.2 MÉTODOS FENOTÍPICOS

Actualmente, la identificación bacteriana se realiza por medio de métodos convencionales basados en las características fenotípicas, puesto que su realización y coste los hace más

asequibles. Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características “observables” de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas. El cultivo, cuando es factible, continúa siendo el método diagnóstico de elección. (Bou *et al.*, 2011).

La morfología bacteriana incluye la morfología celular (forma, presencia de endosporas, flagelos, cuerpos de inclusión y tinción de gram) y colonial (color, dimensiones y forma). Las características fisiológicas y bioquímicas incluyen datos de crecimiento a diferentes temperaturas, valores de pH, concentraciones de sal, condiciones atmosféricas, crecimiento en presencia de varias sustancias como agentes antimicrobianos y en presencia de varias enzimas, metabolización de compuestos, etc. (Vandamme *et al.*, 1996).

4. MARCO DE REFERENCIA

En el año 2006, Lee S. D. caracterizó y describió a una nueva especie de *Blastococcus* aislada en Jeju, Korea, empleando el análisis del gen 16S rARN y pruebas fenotípicas, bioquímicas y asimilación de diferentes fuentes de carbono. La descripción de la nueva especie encontrada es: *Blastococcus jejuensis*, aeróbico, móvil, oxidasa negativo, gram positivo, colonias circulares, transparentes, hidroliza almidón y caseína, no reduce nitratos, el rango de temperatura es: 10-37 °C, con un óptimo crecimiento a 30 °C, el pH en el que presenta crecimiento es: 6-10 con un óptimo desarrollo a 7. El porcentaje de G+C es 72 %.

Vinueza V. (2010), se encargó de analizar 133 cultivos de actinobacterias; para la parte de caracterización fenotípica, se evaluaron las características macroscópicas y microscópicas de cada cultivo, el crecimiento en diferentes rangos de temperatura: (4 °C, 28 °C, 37 °C y 50 °C, a los 2, 4, 7 y 30 días) y de pH (4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5 y 9.5 a 26 °C durante 10 días). Para las pruebas de utilización de fuentes de carbono, se emplearon los siguientes compuestos: ácido aspártico, ácido glutámico, valina, treonina, asparagina, fenilalanina, histidina, quitosano, lisina, cisteína, leucina, glicina, tirosina y urea. Para la caracterización genotípica se empleó la técnica molecular rep-PCR, usando un primer BOX. Como resultado, se pudieron ubicar en sesenta y siete grupos especie por medio de la caracterización fenotípica y con el uso de la

experimentación genotípica se logró la agrupación de los especímenes en 32 grupos especie, por lo que no se logró una relación directa entre la taxonomía numérica de datos fenotípicos con los genotípicos.

En 2012 Aguirre-Garrido y colaboradores estudian la flora bacteriana asociada a cactáceas ubicadas en la reserva de Tehuacán-Cuicatlán. Las plantas que analiza son: *Mammillaria carnea*, *Opuntia pilífera* y *Stenocereus stellatus*; las cuales compara en temporada de lluvias y en sequía. Secuenciaron los genes 16S rARN y nifH y los grupos taxonómicos reportados son 3: α -Proteobacteria, Actinobacteria y Firmicutes, no habiendo encontrado diferencia entre las 2 temporadas en que se realizó el muestreo.

Montes P. 2013, estudió la diversidad de bacterias cultivables gram positivas que se encuentran en el área de Punta Arena de la Ventana asociadas a la esponja de mar *Aplysina clathrata*, para conocer la diversidad de éstas bacterias y poder evaluar sus características antibacterianas. Para dicho propósito, se empleó una caracterización fenotípica y genotípica; la primera se basó en el análisis de su morfología colonial y microscópica; la segunda empleó la amplificación del gen 16S rADN, empleando oligonucleótidos específicos para la clase Actinobacteria y una combinación de un oligonucleótido universal con uno específico para Actinobacterias. De las cepas aisladas, 41 fueron caracterizadas e identificadas y los resultados del análisis filogenético indicaron que el 56 % de las bacterias pertenece al grupo de las actinobacterias, el otro 44 % fue representado por el fila Firmicutes.

Bustillos *et al.*, (Tesis doctoral en proceso), En un estudio de biodiversidad bacteriana realizado sobre una planta endémica de la Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán, *N. macrocephala*, encontró una cantidad de 65 cepas diferentes; los grupos taxonómicos a los que pertenecen estos aislados son: Actinobacterias, Firmicutes, α -Proteobacterias, β -Proteobacterias, γ - Proteobacterias, Bacteroidetes y Deinococcus, siendo las Actinobacterias las más abundantes, con un 49 % del total de las cepas.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La mayoría de hábitats poseen una enorme diversidad de bacterias que realizan las más distintas funciones. En particular las cactáceas son colonizadas en sus distintas regiones por una infinidad de bacterias, entre las que se encuentran benéficas y deletéreas. Como prerrequisito para comprender las interacciones ecológicas que se dan entre estas plantas y bacterias es necesario tener un conocimiento amplio de la diversidad bacteriana asociada a las primeras.

Entre las actinobacterias asociadas a distintas plantas, se han caracterizado tanto microorganismos benéficos para las plantas, como bacterias fitopatógenas. Este grupo taxonómico representa microorganismos ampliamente distribuidos en ecosistemas naturales y se conoce que este grupo microbiano es particularmente resistente a condiciones adversas tales como las presentes en la Reserva de Tehuacán-Cuicatlán (Ezziyani *et al.*, 2004).

La Reserva de la Biósfera de Tehuacán Cuicatlán alberga una multiplicidad de ecosistemas, en los que por su extensión predominan los ambientes áridos y semiáridos, es decir, ambientes hostiles para muchos seres vivos. El cacto columnar *Neobuxbaumia macrocephala* es una de las especies adaptadas a este ambiente. Ésta es particularmente trascendente para el ecosistema en que se desarrolla al ser fuente de producción primaria que es aprovechada por un sin número de organismos, incluyendo, aves, roedores, quirópteros, insectos, microorganismos, etc. *N. macrocephala* actualmente se encuentra en riesgo de desaparecer, con la consiguiente y posiblemente irremediable alteración de las relaciones ecológicas de este ambiente. Esta planta es una especie endémica a una pequeña zona de la reserva Tehuacán-Cuicatlán en la que se presentan condiciones ambientales muy específicas (Ruedas *et al.*, 2006). Sus poblaciones son escasas, de crecimiento limitado, polinizadas por murciélagos y muestran una baja producción de semillas por lo que es una especie que debe ser considerada en estrategias de conservación (Esparza-Olguín *et al.*, 2002 y 2005; Godínez-Álvarez y Valiente-Banuet, 2004; Valiente-Banuet *et al.*, 1997).

6. JUSTIFICACIÓN

La mayoría de trabajos microbiológicos en cactáceas se han enfocado sobre el estudio de fitopatógenos (Foster y Fogleman, 1993; 1994) y sobre bacterias promotoras de crecimiento de plantas del desierto. Son muy escasos los estudios sobre diversidad bacteriana asociada a cactus y de manera particular a plantas endémicas de zonas áridas o semiáridas. Recientemente se realizó un estudio en la reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán donde se evaluó la diversidad y estructura de comunidades bacterianas en la rizósfera de tres especies de cactáceas *Mammillaria carnea*, *Opuntia pilífera* y *Stenocereus stellatus* (Aguirre-Garrido *et al.*, 2012), sin embargo, estos cactus no son endémicos de la Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán.

La identificación definitiva de actinobacterias aisladas de *N. macrocephala*, la cual es endémica de ciertos microclimas que se forman en la reserva, y la exploración de su capacidad metabólica permitirá ampliar el conocimiento de la biodiversidad de actinobacterias asociadas a dicho cactus, con el consiguiente resultado de identificar asociaciones altamente representativas. Este mismo conocimiento es requisito para el aprovechamiento de las capacidades metabólicas y ecológicas de las bacterias del desierto y que de alguna manera nos permitan en un futuro poder mantener o incrementar la población de plantas de *N. macrocephala* que hoy en día se encuentra en riesgo de extinción.

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL.

1. Caracterizar a las actinobacterias de la familia *Geodermatophilaceae* aisladas de *N. macrocephala*.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Caracterizar mediante la secuenciación y análisis del gen 16S rADN a las actinobacterias de la familia *Geodermatophilaceae*.
2. Caracterizar mediante un enfoque fenotípico a las cepas de la familia *Geodermatophilaceae* aisladas de *N. macrocephala*.

8. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

8.1 TIPO DE ESTUDIO

Observacional, descriptivo y experimental

8.2 UNIVERSO DE ESTUDIO

Actinobacterias pertenecientes a la familia *Geodermatophilaceae* aisladas del cactus *N. macrocephala* en la Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán

8.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA

Tres actinobacterias aisladas de un muestreo realizado al cactus *N. macrocephala*.

8.4 SEDE Y LUGAR DEL ESTUDIO

La Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán está ubicado entre los 17°39' a 18°53' de latitud Norte y los 96°55' a 97°44' de longitud Oeste (García-Amaro, 1973). Esta provincia fitogeográfica abarca 10,000 km²; sigue una dirección sureste-noroeste por las Sierras de Juárez, Zongolica y Tecamachalco, en la parte sureste del estado de Puebla y noroeste del de Oaxaca (Rzedowski, 1978).

Las muestras aisladas de la Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán fueron procesadas en el laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del Centro de Investigación Molecular Microbiana de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

8.5 CRITERIOS DE SELECCION

-CRITERIOS DE INCLUSIÓN Actinobacterias pertenecientes a la familia *Geodermatophilaceae* aisladas del cactus *Neobuxbaumia macrocephala* en la Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán.

-CRITERIOS DE EXCLUSIÓN Actinobacterias que no pertenecen a la familia *Geodermatophilaceae* aisladas del cactus *Neobuxbaumia macrocephala* en la Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán.

8.6 RECURSOS HUMANOS

-Directores de tesis: M. C. María del Rocío Bustillos Cristales

-Coasesor de tesis: Dr. José Antonio Munive Hernández

-Asesor interno: Dra. Ana Marta de los Ángeles Lobo Sánchez

Tesistas: Jonathan Peralta Chávez

8.7 RECURSOS FINANCIEROS: Esta investigación fue realizada con aportaciones económicas provenientes de La Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP)

9. METODOLOGÍA

Las cepas de interés pertenecen a un muestreo realizado en plantas de *N. macrocephala* en la Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán, el muestreo se realizó en tres especímenes de *N. macrocephala* que se localizaron aproximadamente entre el Km. 34 y el Km. 36 de la carretera Federal que va de Tehuacán Puebla a Zapotitlán Oaxaca. Dicho muestreo fue realizado por Seynos-García, en el año 2010 en su tesis de licenciatura.

La obtención de las muestras se hizo en plantas entre 10-14 metros de altura y una vez obtenidas se trasladaron al laboratorio en recipientes estériles. El muestreo se realizó en tres regiones de las plantas: de la región epífita, endófito y rizosférica.

Las muestras de la región epífita se colectaron con hisopos de algodón estériles y fueron suspendidas en 10 ml de solución estéril de $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mM.

Para obtener muestras de la región endófito se procedió de la siguiente manera: se tomaron secciones de tejido no mayores a 15 cm a lo largo de la columna del cactus y se depositaron en recipientes estériles; para ello, se desinfectó la superficie externa del trozo de tejido mediante lavados con etanol al 100% y solución de hipoclorito de sodio al 4% y posteriores enjuagues con agua destilada estéril hasta eliminar el olor a cloro. Posteriormente se eliminó el tejido externo para exponer tejido interno del cual se tomó un gramo.

Las muestras de suelo asociadas a la raíz (rizósfera), se tomaron a una profundidad del suelo de 10 a 15 cm de cada una de las plantas, posteriormente se colocaron en recipientes estériles y se trasladaron al laboratorio.

A dichas muestras se les hicieron diluciones seriadas base diez, para poder aislar y seleccionar cepas con metabolismo metilotrófico, capaces de crecer en medio selectivo sólido MMS (Medio Mínimo de Sales) con metanol al 0.5 %. Dicha metodología se utiliza de manera rutinaria en estudios microbiológicos del Suelo, como lo menciona Probanza en 1996.

Una vez inoculadas las placas con las diluciones necesarias, se procedió a incubarlas a 30 °C por 10-15 días y se seleccionaron colonias definidas crecidas en dicho medio, para resembrarlas nuevamente en MMS (medio mínimo de sales), con metanol al 0.5%. Las colonias desarrolladas a los 10 días aproximadamente a 30 °C fueron conservadas en glicerol al 50 % a -80 °C.

9.1 CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

Una caracterización genotípica consiste en el empleo de métodos moleculares que analizan la información contenida en ácidos nucleicos como ADN o ARN. Existen muchos métodos que pueden lograr la identificación precisa de bacterias.

En este trabajo se consideró la amplificación y la secuenciación del gen de mantenimiento 16S rADN.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR: polymerase chain reaction), es una técnica de amplificación de secuencias de ADN in vitro, en la que existen diferentes pasos, donde la cadena de ADN se separa, se corta y se duplica, estos pasos se dan con los incrementos y descensos de temperatura para la desnaturalización, acoplamiento de las secuencias cebadoras y la polimerización, por medio de la utilización de primers o secuencias cebadoras, buffers, dNTP's, un ADN molde y un termociclador. (Higuchi, 1993). Las secuencias cebadoras empleadas son los genes universales UN27F (5'-GAC GGG CGG TGT GTA CA-3') y UN1392R: (5'-TAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3'), (Biodiversa Inc., México).

Iniciamos con la extracción de ADN proveniente de un cultivo puro y joven de las cepas de interés, empleando el protocolo comercial del Kit de "Wizard Genomic DNA Purification de Promega" conforme al siguiente protocolo: Se centrifuga 1 ml del cultivo de las cepas por 2 min a 13'000 rpm decantando el sobrenadante, se lava el pellet con 1 ml de MgSO₄ 10 mM y

se decanta con punta. Continuamos con la lisis celular añadiendo 600 μ l de *Nuclei lysis solution*, mezclando con la punta suavemente. Se incuba por 5 min a 80 °C y se deja enfriar a temperatura ambiente. Se añaden 3 μ l de *RNAasa solution* y se mezcla con la punta. Se incuba a 37 °C unos 30 min y se deja enfriar a temperatura ambiente. Prosigue el paso de la precipitación de proteínas para lo cual se añaden 200 μ l de *Protein Precipitation Solution* mezclando con vortex e incubando en hielo. Tras centrifugar a 13'000 rpm durante 3 minutos se lleva a cabo la precipitación y rehidratación de ADN, para ésta se transfiere el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo y se añaden 600 μ l de etanol al 70 % y se mezcla. Se centrifuga por 2 min a 13'000 rpm y se aspira el etanol, dejando secar el pellet a temperatura ambiente por un lapso de 15 minutos. Por último para la rehidratación se añaden al pellet de ADN 100 μ l de *Rehydration Solution* por 1 hora a 65 °C.

Se efectuaron PCR's con una mezcla de reactivos como a continuación se muestra:

TABLA 1. MEZCLA DE REACTIVOS PCR	
Reactivos	Concentración
Buffer	1 x
MgCl ₂	2.5 mM
dNTP's	300 mM
UN1392R	1 uM
UN27F	1 uM
ADN	300-800 ng
Taq	1 U

*Concentración final en el volumen de muestra

Para la amplificación del gen 16S rADN se empleó el siguiente programa:

TABLA 2. PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN 16S rADN		
95 °C	3'	
94 °C	30''	

55 °C	45''	26 ciclos
72 °C	1'	
72 °C	10'	

Los productos de la amplificación del gen 16S rADN se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa al 1 % en Buffer TAE (40 mM de Tris-acetato pH 8 y 1mM de EDTA) para verificar el tamaño del producto esperado y su integridad, y se procedió a purificar el ADN para su secuenciación por la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca Morelos.

9.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

Las cepas de la colección de actinobacterias preservadas en glicerol y mantenidas a -70 °C, se reactivaron en medio GP (glicerol peptona).

Posteriormente se procedió a verificar la pureza del cultivo, mediante observación colonial a partir de cultivos axénicos y así iniciar la caracterización fenotípica, la cual se basó en la comparación con las características fenotípicas (morfología colonial y microscópica, asimilación de fuentes de carbono, crecimiento en distintos pHs y temperaturas, perfiles bioquímicos y sensibilidad a distintos antibióticos) de cepas tipo de actinobacterias pertenecientes a la familia *Geodermatophilaceae*.

a. Tinción de Gram y morfología colonial en placa.

La tinción de Gram es una técnica de gran ayuda en la identificación bacteriana, es usada en muchas ramas de la ciencia, desde la identificación clínica de patógenos hasta microorganismos de interés agrícola. Su fundamento se basa en la composición de la pared bacteriana del microorganismo de interés.

La morfología colonial en placa se realizó en el medio 47 el cual es un medio específico para actinobacterias de la familia *Geodermatophilaceae*. Los parámetros fenotípicos a seguir fueron color de la colonia, forma, bordes, textura y tamaño.

b. Pruebas de asimilación de fuentes de carbono

Las fuentes de carbono que pueden asimilar los especímenes analizados se probaron en placas agar con medio mínimo (Ver Anexo 3), adicionadas con los siguientes reactivos: manitol, arabinosa, ácido glucónico, glucosa, fructosa, xilosa y ácido succínico. La incubación a la que se sometieron las placas fue de 7 días, a 28 °C.

La inoculación se realizó de la siguiente manera:

A partir de un cultivo líquido en medio GP incubado 48 horas, se ajustó la densidad óptica de todos los cultivos a 0.05 a una longitud de onda de 620 nm y se inocularon por triplicado las placas utilizando el método de Drop plate. Ver Anexo 4.

Prueba de crecimiento bajo diferentes condiciones.

a. pH

El crecimiento bacteriano en medios de cultivo a diferentes pH es útil en un análisis de este tipo, porque nos indica la adaptación de algunas cepas a condiciones adversas, como la resistencia a variaciones en el pH de su ambiente, ya que las concentraciones de hidrógeno afectan directamente a los microorganismos y enzimas, modificando la disociación y solubilidad de moléculas que requieren. (Ramos E., Zúñiga D., 2008).

Para probar el crecimiento en distintos pH se prepararon placas con medio 47 a los siguientes pH: 4, 5, 7, 9 y 10. Dichas placas se inocularon por triplicado (Drop plate) empleando el cultivo estandarizado anteriormente; se incubaron a 28 °C durante 7 días, registrando diariamente el crecimiento.

b. Temperatura

Los cambios bruscos de temperatura muestran de la misma manera la adaptación celular a distintos ambientes; una temperatura baja en el medio puede provocar gelificación de la membrana, disminución del transporte de nutrientes o el gradiente de protones; en cambio una temperatura alta puede generar desnaturalización proteica, colapso y rotura de membrana. (Ramos E., Zúñiga D., 2008).

Al caracterizar las cepas mediante pruebas de crecimiento a diferentes temperaturas, se utilizaron placas con medio 47 a pH 7; también para este método se empleó el inóculo descrito anteriormente. Las placas se inocularon por triplicado y se incubaron por 7 días bajo diferentes condiciones de temperaturas: 4 °C, 20 °C, 28 °C, 37 °C y 50 °C. Se registró diariamente el crecimiento.

c. Pruebas Bioquímicas

Las pruebas bioquímicas son herramientas útiles que permiten determinar la actividad metabólica para la identificación y clasificación de microorganismos de interés; las empleadas en este trabajo, se describen a continuación:

- a) Catalasa: Consiste en poner en contacto bacterias de un cultivo y una gota de peróxido de hidrógeno, si la catalasa está presente en el microorganismo se observa un burbujeo, producto de la destrucción del peróxido de hidrógeno; como resultado se eliminan oxígeno y agua. El método consiste en colocar una gota de agua oxigenada sobre un portaobjetos con ayuda de una pipeta Pasteur, después se suspende la bacteria dentro del agua oxigenada e inmediatamente se observa la presencia de burbujas. (Mac Faddin, 2003).
- b) Oxidasa: Esta prueba se basa en la producción bacteriana de una enzima oxidasa intracelular, el cual se debe a un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como un aceptor de electrones en la fase terminal del sistema de

transferencia de electrones. La prueba positiva se observa por la oxidación del reactivo incoloro en pocos segundos formándose un producto colorido. En esta prueba se introduce un disco impregnado con tetrametil-para-difenilamina en un tubo con la cepa de interés en suspensión y antes de 2 minutos se debe observar un cambio de color a rosa o violeta. (Mac Faddin, 2003).

- c) Urea: La prueba de la hidrólisis de la urea consiste en la observación del viraje del medio con indicador rojo de fenol, que ocurre cuando la enzima ureasa hidroliza la urea y produce dos moléculas de amoníaco alcalinizando el medio. En esta prueba se debe inocular con un asa en punta, la superficie y profundidad de un tubo con medio urea en pico de flauta y se debe dejar incubar por 24 horas a 35 °C; el medio debe virar a fucsia. (Mac Faddin, 2003).

- d) Movilidad: La movilidad de los microorganismos se detecta inoculando una placa de agar blando con un asa bacteriológica y pasado el tiempo óptimo de incubación, se busca migración como un halo desde el punto de siembra. Esta prueba nos ayuda a descubrir miembros de locomoción en microorganismos. (Mac Faddin, 2003).

- e) DNAsa: La prueba de DNAsa consiste en la búsqueda de la enzima llamada de la misma manera, que produce una despolimerización e hidrolización del ADN del medio; el agente revelador es ácido clorhídrico al 1 % que precipita el ADN nativo. El procedimiento consiste en la inoculación del microorganismo sobre agar ADN y después de 18 a 24 horas de incubación se agrega HCl al 1 % que precipita el ADN. (Mac Faddin, 2003).

- f) Coagulasa: Esta prueba tiene la finalidad de encontrar microorganismos con la enzima conocida como coagulasa; dicha enzima al ser excretada al medio extracelular, y estar en presencia de factores de coagulación forma un coagulo,

dando positiva la prueba. Este experimento se realiza emulsificando una colonia de la cepa de interés en una gota de plasma de conejo; hecho esto se debe observar la formación de un coágulo en aproximadamente 1 minuto para considerar positiva la prueba. (Mac Faddin, 2003).

- g) Esculina: Se basa en la capacidad de ciertas bacterias para hidrolizar la esculina en presencia de 1-4% de sales biliares con el uso de la enzima beta glucosidasa, dando como resultado glucosa y esculetina; la esculetina es soluble en el medio y forma un complejo de color negro con Fe³⁺. Se elabora inoculando un tubo con medio bilis-esculina en la superficie de pico de flauta y se incuba 24 horas; pasado este tiempo se considera positiva la prueba si se observa un oscurecimiento del medio. (Mac Faddin, 2003).

- h) Gelatina: La gelatina es una proteína que tiene la capacidad de gelificar; cuando se hidroliza en los aminoácidos que la componen pierde su característica de gelificar. La reacción es llevada a cabo por una enzima llamada gelatinasa. La hidrólisis de gelatina se realiza inoculando un medio gelatina al 12 % y posterior a su incubación, (35 °C a 48h) se debe observar que el medio se vuelve líquido aún refrigerándolo. (Mac Faddin, 2003).

- i) Almidón: Este análisis busca la presencia de amilasa, la cual es una enzima que se encarga de hidrolizar el almidón hasta glucosa. La prueba es positiva si al inocular una placa con almidón y lugol, el color café-púrpura desaparece del medio. Este experimento se realiza haciendo crecer un organismo en una placa que contenga almidón incubándola a 35 °C por 24 horas; pasado esto se agrega lugol sobre la estría y después se buscan las zonas claras alrededor de las colonias. (Mac Faddin, 2003).

- j) Caseína: la prueba conocida como degradación de la caseína consiste en inocular placas del medio Agar leche descremada y posterior al tiempo de incubación se debe observar si alrededor del inóculo persiste o desaparece el color blanco del medio; si el color desaparece significa que el microorganismo presenta caseinasas y al hidrolizar dicho sustrato los aminoácidos constituyentes de la caseína se liberan al medio. (Mac Faddin, 2003).

- k) Reducción de Nitratos: la prueba conocida como reducción de nitratos se encarga de hallar a la enzima Nitrato reductasa, mediante la reducción de nitrato de sodio hasta nitritos empleado en el Caldo nitratos, un revelador conocido como Reactivo de Griess. La prueba se realiza incorporando 1 g/L de nitrato de sodio y para revelar la presencia de nitritos después de su incubación se añaden los reactivos A y B de Griess-Ilosvay en cantidades iguales. Un cambio de color (rojo) dentro de los 30 seg indica prueba completa con resultado positivo. (Mac Faddin, 2003).

d. Pruebas de sensibilidad a los antibióticos

Este ensayo es muy útil para la identificación fenotípica bacteriana, ya que muestra de manera fiel el metabolismo bacteriano; el método empleado es el de Kirby Bauer, que usa discos de papel impregnados con antibióticos en concentraciones definidas.

El experimento se hace sobre placas de agar, inoculadas con la bacteria en dilución (con una concentración de 1.5×10^6); después de la inoculación se dejan secar y se colocan los sensidiscos distanciados de la pared de la placa 15 mm y entre ellos 30 mm; la incubación se hace a 35-37 °C por 48 horas y se prosigue con una medición del halo de inhibición y una comparación con tablas de referencia emitidas por organismos de control de métodos fiables. Sherwood J. E. and Klein D. A. (2005). Forni, C. Telor, E. Bar, E. and Grilli Caiola M. (2005).

Los antibióticos que fueron usados para este trabajo fueron los siguientes:

- a) Ceftriaxona (30 ug): Es un bactericida, inhibe la síntesis de la pared bacteriana al unirse específicamente a unas proteínas llamadas proteínas ligandos de la penicilina.
- b) Ciprofloxacino (5 ug): Este reactivo impide el crecimiento bacteriano inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos.
- c) Imipenem (10 ug): Es un antibiótico beta lactámico derivado de la tienamicina y es un bactericida; actúa inhibiendo la tercera y última etapa de la síntesis de la pared bacteriana.
- d) Trimetoprim/sulfametoxazol (25 ug): Este reactivo es un antagonista metabólico, inhibiendo las enzimas secuenciales que intervienen en la síntesis del ácido fólico.
- e) Gentamicina (10 ug): Inhibe la síntesis de proteínas, uniéndose a proteínas receptoras de la subunidad 30S de ribosomas bacterianos.
- f) Ceftazidime (30 ug): Es un antibiótico de amplio espectro, tiene acción inhibiendo la enzima responsable de la síntesis de pared celular.
- g) Ampicilina (10 ug): Inhibe de la síntesis de la pared, uniéndose a proteínas específicas llamadas PBPs localizadas en la pared celular.

Los halos de inhibición y los parámetros empleados para definir la resistencia o sensibilidad a diferentes antibióticos se mencionan en la referencia: Sherwood J. E. and Klein D. A. (2005). Forni, C. Tel-or, E. Bar, E. and Grilli Caiola M. (2005).

10. MATERIAL

Las cepas que se utilizaron pertenecen a un muestreo que se realizó en 2010 por (Seynos-García, Tesis de Licenciatura). De ese aislamiento fueron recuperadas 65 cepas de tres plantas pertenecientes a la especie *N. macrocephala*, de las cuales tres pertenecen a la familia *Geodermatophilaceae* y son las siguientes:

- i. UAPS01-112
- ii. UAPS01-113
- iii. UAPS01-114

Se utilizaron 5 cepas de referencia de la familia *Geodermatophilaceae*, las cuales pertenecen a la colección JCM.

- i. *Geodermatophilus obscurus* (Luedemann, 1968).
- ii. *Blastococcus aggregatus* (Ahrens and Moll, 1970).
- iii. *Blastococcus saxosidens* (Urzi *et al.*, 2004).
- iv. *Modestobacter versicolor* (Reddy *et al.*, 2007).
- v. *Modestobacter marinus* (Xiao *et al.*, 2011).

a. Medios de cultivo

Para la caracterización de las actinobacterias pertenecientes a la familia *Geodermatophilaceae*, se utilizó el medio 47 el cual es un medio diseñado para crecimiento específico de bacterias pertenecientes a la familia *Geodermatophilaceae*.

b. Oligonucleótidos

El gen empleado para lograr la asignación taxonómica es el 16S rADN, el cual es ampliamente utilizado por estar presente en todas las bacterias, además, no cambia su funcionamiento a lo largo del tiempo y tiene la longitud apropiada (1500 pb) para fines informáticos. (Janda and Abbott, 2007).

Los oligonucleótidos empleados para este propósito son oligonucleótidos universales: UN27F (5'-GAC GGG CGG TGT GTA CA-3') y UN1392R (5'-TAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3'), que generan un producto de pcr de 1365 pb. (Biodiversa Inc., México).

11. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO

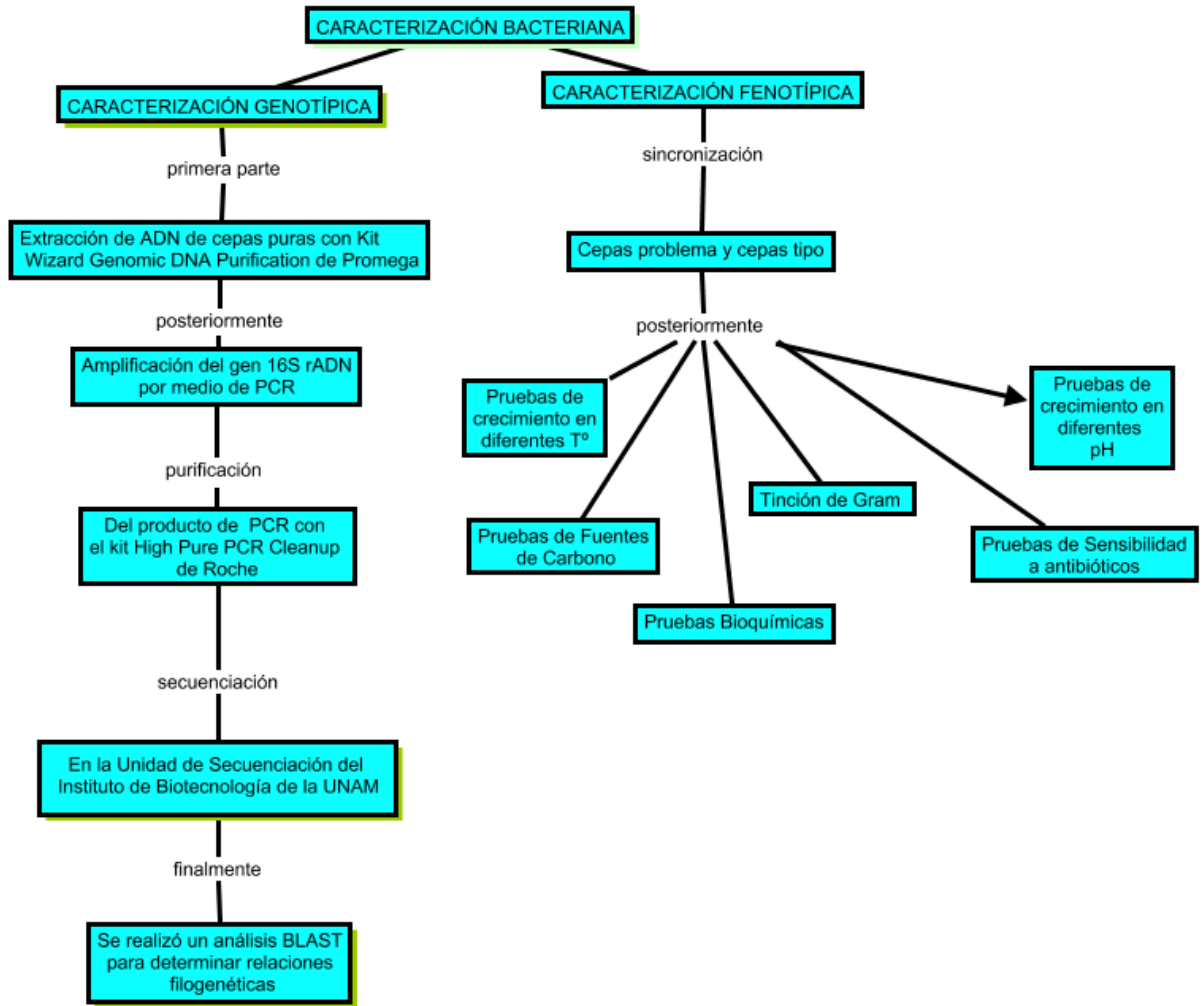


Figura 1. Diagrama General de Trabajo

12. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

12.1 CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

La amplificación parcial del gen 16S rADN nos reportó un producto de 1365 pb, como se muestra en la imagen obtenida en geles de agarosa al 1 % en buffer TAE 1X y aunque no se obtuvo banda única, esta se cortó y se purificó con el kit High Pure PCR Cleanup de Roche.

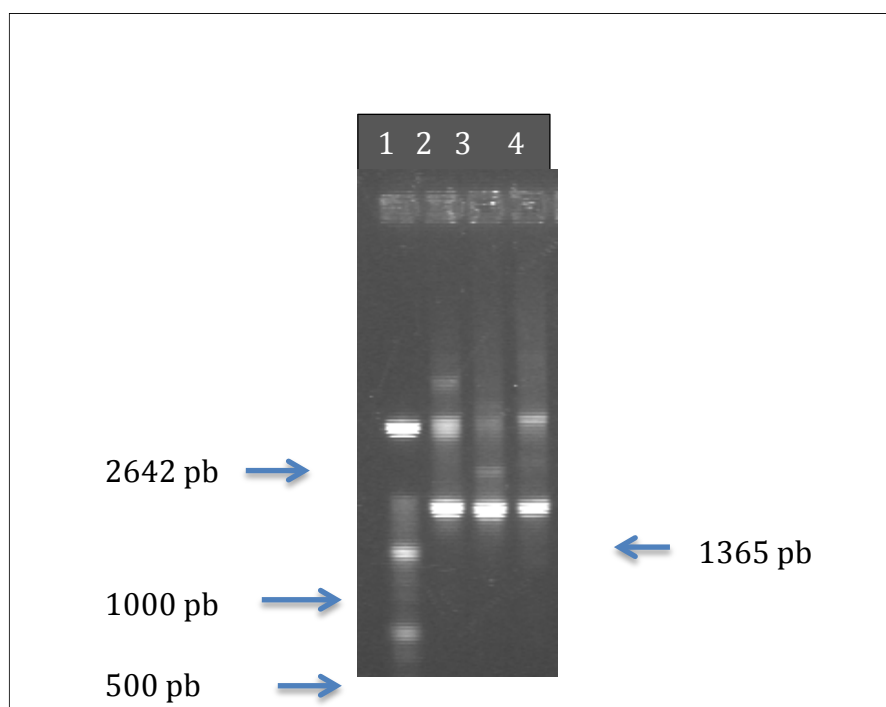


Figura 2. Producto de la amplificación del gen 16S rADN de 1365pb. Carril 1 Marcador de peso molecular Roche XIV. Cepas en el carril 2: UAPS01-112, en el carril 3: UAPS01-113 y en el carril 4: UAPS01-114.

El producto de PCR purificado se cuantificó por Nano Drop y se prepararon las muestras para su secuenciación en el IBT, Unidad de síntesis y Secuenciación, Cuernavaca, Morelos.

En las siguientes figuras se muestran los cromatogramas de las secuencias del gen 16S rADN de las cepas UAPS01-112, UAPS01-113, UAPS01-114 y su posterior análisis BLAST en la página del NCBI, el cual caracteriza a las cepas a nivel de género.

CROMATOGRAMA Y BLAST DE LA CEPA UAPS01-112

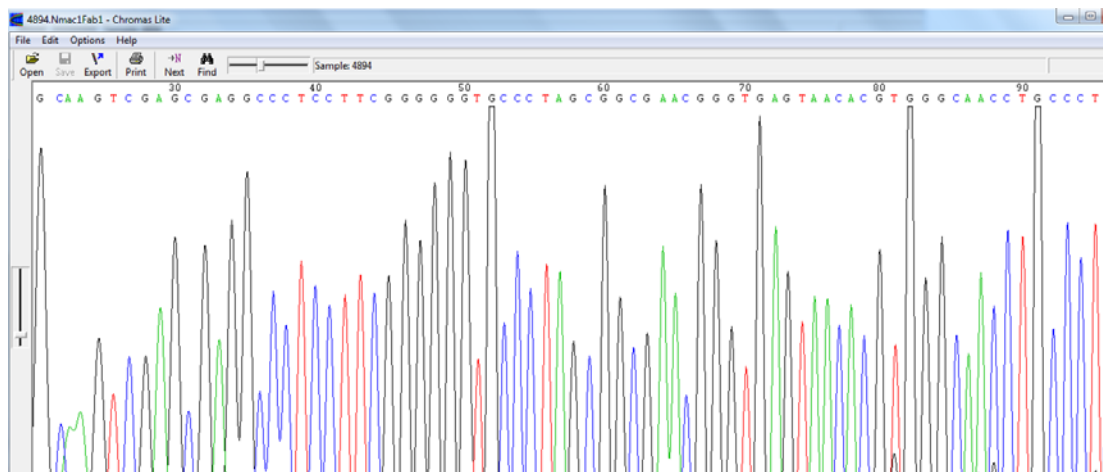


Figura 3. Cromatograma de la secuencia del gen 16S rADN cepa UAPS01-112

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone ncd2403d12c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1895	1895	98%	0.0	97%	JF209103.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone ncd2402a08c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1884	1884	98%	0.0	97%	JF209065.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone ncd1979a11c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1884	1884	98%	0.0	97%	JF172310.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone nbw720a03c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1884	1884	98%	0.0	97%	GQ108953.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone nbv642d07c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1879	1879	98%	0.0	97%	HM844824.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone ncd2401b05c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1873	1873	98%	0.0	97%	JF208950.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone ncd1997a07c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1864	1864	98%	0.0	97%	JF173498.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone ncd1997b05c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1862	1862	98%	0.0	97%	JF173534.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone HDB_SIO0925 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1851	1851	98%	0.0	96%	HM186369.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone ncd559b12c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1840	1840	98%	0.0	96%	JF049379.1
<input type="checkbox"/> Modestobacter versicolor strain CB-281466 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1834	1834	98%	0.0	96%	JX841004.1

Figura 4. Resultado del análisis BLAST de la secuencia 16S rADN de la cepa UAPS01-112

CROMATOGRAMA Y BLAST DE LA CEPA UAPS01-113

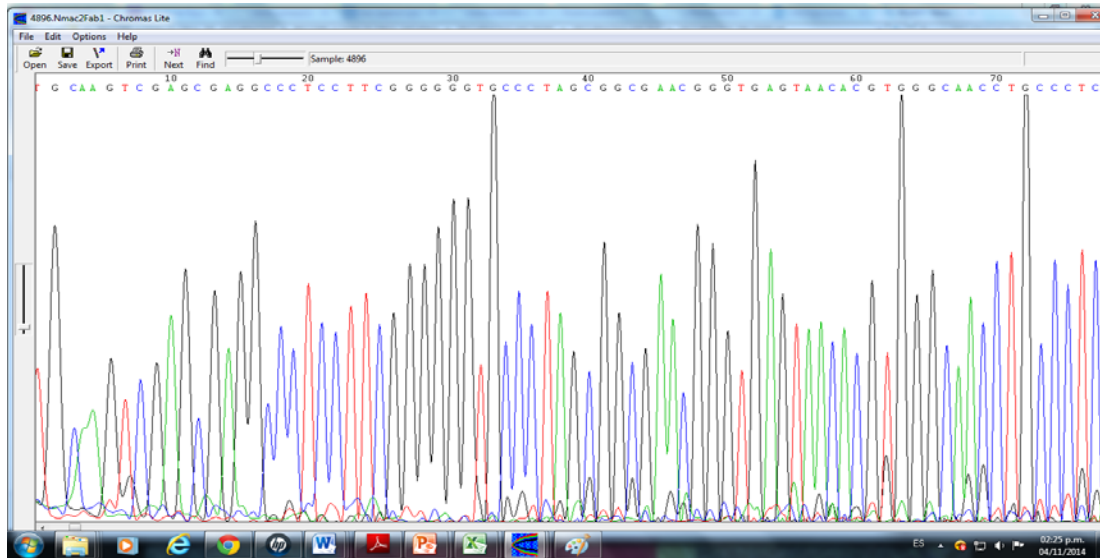


Figura 5. Cromatograma de la secuencia del gen 16S rADN de la cepa UAPS01-113

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Uncultured bacterium clone nco2403412c1.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1881	1881	97%	0.0	97%	JF209103.1
Uncultured bacterium clone nco2402a06c1.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1869	1869	97%	0.0	97%	JF209086.1
Uncultured bacterium clone nbw720a03c1.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1869	1869	97%	0.0	97%	GG108953.1
Uncultured bacterium clone nco1927a11c1.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1864	1864	97%	0.0	97%	JF172310.1
Uncultured bacterium clone nbv612d07c1.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1864	1864	97%	0.0	97%	HM044824.1
Uncultured bacterium clone nco2481b05c1.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1858	1858	97%	0.0	97%	JF208850.1
Uncultured bacterium clone nco1987a07c1.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1849	1849	97%	0.0	97%	JF173498.1
Uncultured bacterium clone nco1987b05c1.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1847	1847	97%	0.0	97%	JF173534.1
Uncultured bacterium clone HCB_S100925.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1831	1831	97%	0.0	97%	HM186369.1
Modestobacter versicolor strain CG-281466.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1820	1820	97%	0.0	96%	JX841004.1
Uncultured bacterium clone nco559h12c1.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1816	1816	97%	0.0	96%	JF040370.1

Figura 6. Resultado del análisis BLAST de la secuencia 16S rADN de la cepa UAPS01-113

CROMATOGRAMA Y BLAST DE LA CEPA UAPS01-114.

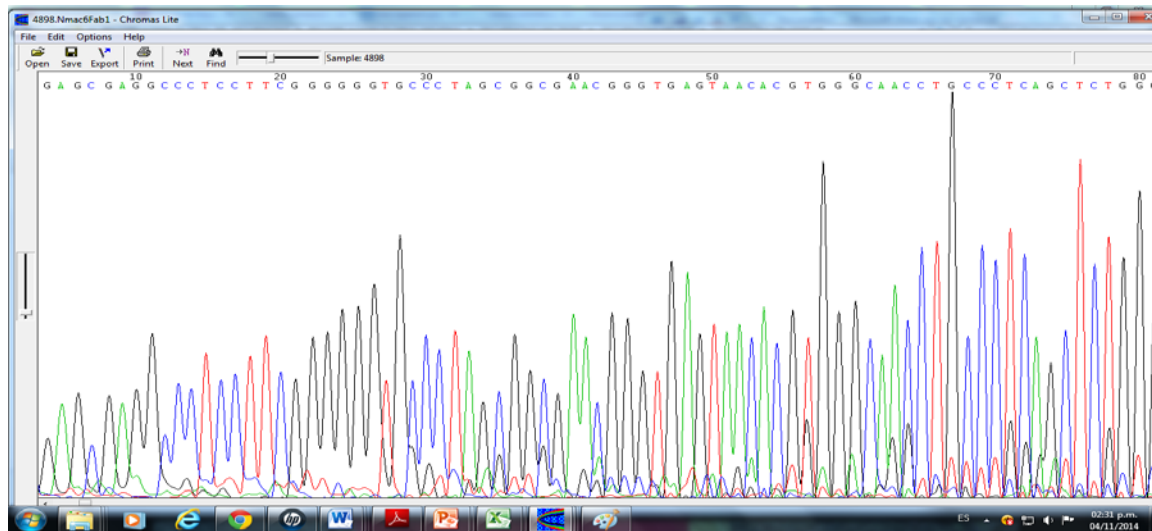


Figura 7. Cromatograma de la secuencia del gen 16S rADN de la cepa UAPS01-114

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Uncultured bacterium clone ncd2403d12c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1149	1149	92%	0.0	88%	JF209103.1
Uncultured bacterium clone ncd559h12c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1149	1149	92%	0.0	88%	JF049379.1
Uncultured bacterium clone ncd2402g06c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1144	1144	92%	0.0	88%	JF209065.1
Uncultured bacterium clone nbw720a03c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1144	1144	92%	0.0	88%	GQ108953.1
Uncultured bacterium clone nbv642d07c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1138	1138	92%	0.0	88%	HM844824.1
Uncultured bacterium clone ncd2401b05c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1133	1133	92%	0.0	88%	JF208950.1
Uncultured bacterium clone ncd1979a11c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1129	1129	82%	0.0	90%	JF172310.1
Uncultured bacterium clone ncd1997a07c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1125	1125	82%	0.0	90%	JF173498.1
Uncultured bacterium clone ncd1997b05c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1122	1122	82%	0.0	90%	JF173534.1
Modestobacter sp. Ellin164 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1118	1118	82%	0.0	90%	AF409006.1
Modestobacter marinus strain BC501 16S ribosomal RNA, complete sequence	1112	1112	82%	0.0	90%	NR_074479.1
Modestobacter versicolor strain CB-281466 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1112	1112	82%	0.0	90%	JX841004.1

Figura 8. Resultado del análisis BLAST de la secuencia 16S rADN de la cepa UAPS01-114

Los resultados del análisis BLAST del gen 16S rADN de las tres cepas reportan la asignación de género que muestra la siguiente tabla:

TABLA 3. ASIGNACIÓN TAXONÓMICA FILOGENÉTICA				
Cepa	Asignación taxonómica	Phylum	Cobertura	% Identidad
UAPS01-112	<i>Modestobacter sp.</i>	Actinobacteria	98%	96%
UAPS01-113	<i>Modestobacter sp.</i>	Actinobacteria	97%	96%
UAPS01-114	<i>Modestobacter sp.</i>	Actinobacteria	82%	93%

El estudio de caracterización que se realizó sobre las tres cepas aisladas de *N. macrocephala* se guió en los resultados obtenidos del gen 16S rADN; este gen es importante en taxonomía bacteriana al presentar regiones muy conservadas y a la vez regiones variables, lo que permite distinguir unas especies de otras (Woese, 1987); dicho estudio manifiesta que las tres cepas analizadas tienen altos porcentajes de identidad con cepas del género *Modestobacter*.

En base a lo anterior se compararon las cepas problema contra cepas pertenecientes a los géneros *Geodermatophilus*, *Blastococcus* y *Modestobacter*, que pertenecen a la familia *Geodermatophilaceae*. Los resultados obtenidos en la caracterización genotípica se complementarán con los de la caracterización fenotípica.

12.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

Para las pruebas fenotípicas utilizamos las cepas tipo pertenecientes a la familia *Geodermatophilaceae* siguientes: *Geodermatophilus obscurus*, *Blastococcus aggregatus*, *Blastococcus saxosidens*, *Modestobacter versicolor* y *Modestobacter marinus* como comparación de las características fenotípicas.

El análisis fenotípico comprende la observación de las características coloniales, tanto macroscópicas como microscópicas, para conocer características de su pared celular, forma, tamaño y estructuras celulares importantes como presencia de endo o exosporas y órganos de locomoción. Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

a. Tinción de Gram y morfología colonial en placa.

TABLA 4. Características fenotípicas			
Cepas	Tinción de Gram	Morfología microscópica	Morfología de la colonia
UAPS01-112	+	Células cocobacilares con tendencia a formar pequeños agregados, sin flagelos ni micelios.	Colonias circulares, convexas, de superficie lisa con bordes enteros y consistencia cremosa, el color es naranja.
UAPS01-113	+	Cocos y bacilos cortos con formación de cadenas de tamaño medio sin presencia de flagelos, no se observan micelios.	Colonias circulares, convexas, de superficie lisa con bordes enteros y consistencia cremosa, el color es naranja.
UAPS01-114	+	Bacilos y cocos en pequeños agregados y cadenas cortas sin presencia de medios de locomoción ni micelios.	Colonias circulares, convexas, de superficie lisa con bordes enteros y consistencia cremosa, el color es naranja.
<i>G. obscurus</i>	+	Células cuboides y cocoides sin medios de locomoción con micelio rudimentario	Colonias en forma de gránulos rígidos, separables, gránulos secos, ásperos y de color negro.
<i>B. aggregatus</i>	+	Bacilos y cocos solos o formando agregados, son móviles las células separadas y en condiciones desfavorables forman agregados inmóviles.	Las colonias son irregulares, planas con puntillado muy tenue, bordes definidos y consistencia seca de color naranja.
<i>B. saxobsidens</i>	+	Cocos solos, en pares o tétradas con tendencia a formar	Colonias con bordes irregulares y superficie

		agregados.	plegada cerebriforme, de consistencia rígida y color naranja
<i>*M. versicolor</i>	+	Bacilos cortos, con presencia de flagelos, multiseptados, solos o en pares.	Las colonias son oscuras en medios oligotróficos y naranjas en medios copiotróficos, las colonias son convexas, de bordes definidos, lisas y ligeramente mucoides, de color naranja.
<i>**M. marinus</i>	+	Bacilos cortos, con flagelos, no forman esporas ni micelios.	Colonias con bordes circulares, convexas de superficie lisa y consistencia cremosa, el color es naranja

Tabla 4. * Resultados reportados por: Reddy et al., 2007 ** Resultados reportados por: Xiao et al., 2011.

b. Prueba de asimilación de fuentes de carbono.

Esta prueba es importante para conocer la composición bioquímica de diferentes cepas, ya que la capacidad de cada microorganismo para emplear distintas fuentes de carbono es única al ser cualidades que se adquieren a lo largo del ciclo evolutivo; los resultados de dicho análisis se reportan en la siguiente tabla, describiendo las fuentes que se probaron y la ausencia o presencia de crecimiento bacteriano transcurridos 7 días de incubación a 28 °C.

Tabla 5. Asimilación de Fuentes de Carbono							
Cepas	Manitol	Arabinosa	Ac. Glucónico	Glucosa	Fructosa	Xylosa	Ac. Succínico

UAPS01-112	-	+	-	-	+	+	-
UAPS01-113	-	+	-	-	+	+	-
UAPS01-114	-	+	-	-	+	+	-
<i>G. obscurus</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>B. aggregatus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. saxobsidens</i>	-	+	-	-	+	-	-
*<i>M. versicolor</i>	+	-	n.d.	+	-	-	n.d.
**<i>M. marinus</i>	+	+	-	-	+	-	-

* Resultados reportados por: Reddy *et al.*, 2007 **Resultados reportados por: Xiao *et al.*, 2011.
n.d.=No determinado.

Los compuestos que pueden ser procesados por los microorganismos como fuente de carbono define la capacidad metabólica que posee cada uno para sobrevivir en distintos ambientes; la prueba empleada se basó en la comparación de las tres cepas problema contra 5 cepas de referencia. Las tres cepas problema exhibieron comportamientos similares, sin embargo las cepas de referencia muestran comportamientos diferentes entre sí y al hacer la comparación, las tres cepas de interés muestran un gran parecido a *M. marinus* y *B. saxobsidens*

Prueba de crecimiento bajo diferentes condiciones.

c. pH

Las variaciones de pH ambientales condicionan la sobrevivencia de todos los microorganismos; es por ello que se emplean pruebas modificando el pH del medio en que se incuban para poder identificar sus características metabólicas y la capacidad de resistir ambientes adversos.

Los resultados del crecimiento bacteriano a distintos pH se reportan a continuación a los 7 días de incubación a 30 °C.

Tabla 6. Crecimiento en distintos pH					
Cepas	pH 4	pH 5	pH 7	pH 9	pH 10
UAPS01-112	-	-	+	+	+
UAPS01-113	-	-	+	+	+
UAPS01-114	-	-	+	+	+
<i>G. obscurus</i>	-	-	+	+	+
<i>B. aggregatus</i>	-	-	+	+	+
<i>B. saxobsidens</i>	-	-	+	+	+
<i>*M. versicolor</i>	-	+	+	+	-
<i>**M. marinus</i>	-	+	+	+	-

* Resultados reportados por: Reddy *et al.*, 2007 **Resultados reportados por: Xiao *et al.*, 2011

Al analizar las pruebas de crecimiento en distintos pH, podemos apreciar que *G. obscurus*, *B. saxobsidens* y *B. aggregatus* tienen capacidades similares a las tres cepas problema para crecer en los diferentes pH probados, por otra parte *M. versicolor* y *M. marinus*, tienen un crecimiento distinto a pH 5 y 10, lo que las hace diferentes a las cepas de interés.

d. Temperatura

La temperatura es considerada como otro de los factores importantes que condicionan la sobrevivencia bacteriana, ya que en variaciones drásticas de ésta, los microorganismos pueden sufrir gelificación, colapso o rotura de membrana; por lo anterior se eligió realizar dicha prueba y los resultados obtenidos se pueden observar en la tabla siguiente. Dichos resultados se registran habiendo transcurrido 7 días desde la incubación en medio 47.

Tabla 7. Crecimiento en distintas temperaturas					
Cepas	4 °C	20 °C	30 °C	37 °C	50 °C
UAPS01-112	+	+	+	+	-
UAPS01-113	+	+	+	+	-
UAPS01-114	+	+	+	+	-
<i>G. obscurus</i>	-	+	+	+	-
<i>B. aggregatus</i>	-	+	+	+	-
<i>B. saxobsidens</i>	-	+	+	+	-
<i>*M. versicolor</i>	+	+	+	-	-
<i>**M. marinus</i>	+	+	+	-	-

* Resultados reportados por: Reddy *et al.*, 2007 **Resultados reportados por: Xiao *et al.*,

2011

En el análisis de crecimiento en diferentes temperaturas, se evidencia que todas las cepas crecen a 20 °C y 30 °C y ninguna a 50 °C; a 4 °C no hay crecimiento de *G. obscurus*, *B. saxobsidens* y *B. aggregatus*, pero sí por parte de *M. versicolor* y *M. marinus*. A 37 °C sólo *M. versicolor* y *M. marinus* no presentan crecimiento. Lo anterior muestra que no hay correlación en el comportamiento por parte de las cepas tipo con las cepas de referencia, además la temperatura a la que muestran crecimiento todas las cepas es la que corresponde a cepas mesófilas.

e. Pruebas Bioquímicas

Las pruebas bioquímicas se realizaron en las cepas problema y los resultados se encuentran reportados en la tabla 8.

Tabla 8. Pruebas Bioquímicas								
Cepas								
Pruebas	UAPS01-	UAPS01-	UAPS01-	<i>G.</i>	<i>B.</i>	<i>B. saxob-</i>	<i>*M.</i>	<i>**M.</i>

	112	113	114	<i>obs- curus</i>	<i>aggre- gatus</i>	<i>sidens</i>	<i>versicolor</i>	<i>marinus</i>
Catalasa	+	+	+	N.D.	+	+	+	-
Oxidasa	-	-	-	N.D.	-	+	-	-
Urea	-	-	-	N.D.	+	N.D.	+	-
Movilidad	-	-	-	N.D.	+	V	+	N.D.
DNAsa	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulasa	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculina	+	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	+	+
Gelatina	+	+	+	+	N.D.	-	-	-
Almidón	+	+	50%	+	-	-	-	+
Caseína	-	-	-	N.D.	N.D.	-	+	+
Reducción de Nitratos	+	+	+	-	-	-	+	+

* Resultados reportados por: Reddy *et al.*, 2007 **Resultados reportados por: Xiao *et al.*, 2011

Comparando las pruebas bioquímicas de las cepas problema contra las cepas tipo, podemos ver que *M. versicolor* y *M. marinus* presentan distintas pruebas con resultados parecidos a las cepas de interés, lo que nos da una cierta similitud en cuanto al comportamiento bioquímico de las cepas problema con éstas cepas de referencia.

f. Pruebas de Sensibilidad a los antibióticos

La prueba de sensibilidad a antibióticos se emplea para determinar la sensibilidad de ciertas cepas frente a un antibiótico o quimioterapéutico; si el disco que contiene el antibiótico se deposita sobre una placa recién inoculada, se producirá la inhibición del crecimiento del microorganismo analizado en un punto del gradiente y dará como resultado un área concéntrica al disco de inhibición del crecimiento; en este

experimento se emplearon 7 sustancias de este tipo y se resumen los resultados en la siguiente tabla.

Tabla 9. Prueba de Sensibilidad a Antibióticos					
Cepas					
Antibiótico	UAPS0 1-112	UAPS0 1-113	UAPS0 1-114	* <i>M.</i> <i>versicolor</i>	** <i>M.</i> <i>marinus</i>
Ceftriaxona (30 ug)	S	S	S	S	S
Ciprofloxacino (5 ug)	S	S	S	S	S
Imipenem (10 ug)	S	S	S	S	S
Trimetoprim/sulfametoxazol (25 ug)	S	R	R	S	R
Gentamicina (10 ug)	S	S	S	S	S
Ceftazidime (30 ug)	S	S	S	N.D.	R
Ampicilina (10 ug)	S	S	S	S	S

* Resultados reportados por: Reddy *et al.*, 2007 **Resultados reportados por: Xiao *et al.*,

2011

Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos arrojan que las cepas UAPS01-113 y UAPS01-114 difieren de la cepa UAPS01-112 y de *M. versicolor*, ya que las primeras son resistentes al Trimetoprim/sulfametoxazol; pero las cepas UAPS01-113 y UAPS01-114 comparten la misma resistencia al Trimetoprim/sulfametoxazol con la cepa de referencia *M. marinus*. Lo anterior refiere que UAPS01-112 comparte el mismo comportamiento en ésta prueba que *M. versicolor* y las cepas UAPS01-113 y UAPS01-114 son parecidas a *M. marinus*, a excepción de que ésta última es resistente al ceftazidime.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De los muestreos realizados en el cactus *Neobuxbaumia macrocephala* se obtuvieron 65 cepas con metabolismo metilotrófico y que pertenecen a diferentes grupos taxonómicos; de éstos se hallaron tres cepas que pertenecen a la familia *Geodermatophilaceae* y que resultó de interés llevar a cabo su caracterización, ya que de los miembros de esta familia se han descrito muy pocos.

En un estudio posterior se pretende aislar más miembros de la familia *Geodermatophilaceae* muestreando al cactus *N. macrocephala* que se halla en la reserva de la biósfera de Tehuacán-Cuicatlán, sin embargo para este estudio de tesis se considera que tres cepas son suficientes, ya que para llevar a cabo muestreos en dicha reserva, se necesitan varios permisos expedidos por la comisión supervisora de dicho lugar al encontrarse este cactus en riesgo de extinción y el tomar muestras (de su zona epífita, endófito y rizosférico) pone en riesgo su supervivencia.

La caracterización de bacterias, de manera ideal debería de basarse en la descripción completa de sus genotipos y fenotipos, sin embargo en muchas ocasiones no se llega a estos ideales por cuestiones prácticas. La utilización de nuevas técnicas, particularmente el uso de métodos para la investigación con bacterias no cultivables y la obtención de secuencias nucleotídicas de diversos genes, han permitido reconocer que la diversidad de los procariontes es mucho mayor de lo que se pensaba (Peace, 1997).

Con respecto a la caracterización genotípica, se realizó la secuenciación del gen 16S rADN, ya que este gen es importante en taxonomía bacteriana al presentar regiones muy conservadas y otras variables, lo que permite distinguir unas especies de otras (Woese, 1987), además presenta una longitud apropiada para fines informáticos y se encuentra en todas las bacterias (Janda and Abbott, 2007). La caracterización genotípica por secuenciación del gen 16S rADN nos permitió clasificar a los tres aislados del cactus *N. macrocephala* dentro del género *Modestobacter*.

Los estudios taxonómicos que integran las características bioquímicas y fisiológicas como parte de un estudio tradicional son útiles porque permiten conocer capacidades metabólicas de los microorganismos. La caracterización fenotípica de nuestras tres cepas se realizó usando técnicas tradicionales, la cual se realizó por triplicado para tener confiabilidad en ellas. La morfología colonial observada en el medio 47, nos permite determinar que las bacterias metilotróficas estudiadas presentan características similares entre sí y diferentes a las cepas de referencia en cuanto a color, forma, consistencia, etc, como podemos observar en la tabla 4. La prueba de tinción de Gram nos permitió identificar a nuestras cepas como Gram (+). En la comparación de perfiles bioquímicos, pudimos observar diferentes comportamientos entre las cepas problema y las cepas tipo, e incluso dentro de las mismas cepas problema, lo anterior se resume en la tabla 8, pero de manera general se puede observar que las cepas problema tienen parecido a *M. marinus*, seguido de *M. versicolor*.

De la prueba de sensibilidad a diferentes antibióticos es importante destacar que las cepas UAPS01-113 y UAPS01-114 presentan el mismo comportamiento entre sí, pero difieren de las cepas tipo; por otra parte, la cepa 112 presenta rasgos similares a *M. marinus*.

Con relación a las condiciones óptimas de crecimiento, podemos apreciar que nuestras cepas crecen desde los 4, hasta los 37 °C, lo cual se correlaciona con el hecho de haber sido aisladas de ambientes semiáridos con condiciones drásticas de temperatura, pero no presentan un comportamiento parecido a las cepas tipo.

En cuanto al pH óptimo de crecimiento vemos en la tabla 6, que nuestras bacterias tienen capacidad de crecer de pH 7 a pH 10, con comportamiento similar a *G. obscurus*, *B. saxobsidens* y *B. aggregatus*; no así con las cepas *M. marinus* y *M. versicolor*, lo que nos puede indicar que el lugar de aislamiento presenta un carácter sumamente básico.

Con respecto a la utilización de las diferentes fuentes de carbono, podemos apreciar que las tres cepas problema exhibieron comportamientos similares y al hacer la comparación contra las cepas tipo, observamos que las tres cepas de interés muestran un gran parecido a *B. Saxobsidens* y *M. marinus*.

Con esta información se puede concluir que las tres cepas aisladas no pertenecen a ninguna de las cepas tipo con las que se compararon, sin embargo, como era de esperar, presentan características parecidas a las cepas del género *Modestobacter*, con lo que se complementa el resultado obtenido genotípicamente.

Las pruebas realizadas en este estudio aportan datos bioquímicos útiles para definir las características de los tres especímenes aislados del cactus *N. macrocephala*; sin embargo, no nos permiten definir de manera específica la especie a la que pertenecen o llegar a precisar si las especies encontradas han sido reportadas; para llegar a dichos objetivos se necesitará plantear futuros trabajos.

13. CONCLUSIONES

- La fenotipificación nos permitió conocer las características fisiológicas y bioquímicas de nuestros aislados, sin embargo no nos permitió llegar a la asignación de un género, ya que al hacer comparaciones con las cepas tipo, observamos que presentan características similares con cepas del género *Modestobacter* y *Blastococcus*.
- El análisis BLAST del gen 16S rADN de estas tres cepas reporta un elevado porcentaje de identidad de secuencia nucleotídica con las cepas *Modestobacter versicolor* y *Modestobacter marinus*.
- La secuenciación del gen 16S rADN es más concluyente para la asignación del género *Modestobacter* en las cepas de estudio por los porcentajes de identidad observados, aunque a nivel de especie no es posible tener una aproximación, por lo que se reportan como *Modestobacter sp.*
- Se tendría que realizar la secuenciación de otros genes de mantenimiento o bien otro tipo de pruebas de caracterización genotípica para poder asignar la especie.

PERSPECTIVAS:

1. Se propone la obtención de al menos otros 5 aislados de actinobacterias de la familia *Geodermatophilaceae*, para tener una colección mayor que nos permita reportar más miembros de este género asociados a *N. macrocephala*.
2. Aplicar más pruebas genotípicas que nos permitan caracterizar los aislados de este trabajo hasta el nivel de especie.
3. Y establecer las relaciones filogenéticas entre cada uno de estos aislados.

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Adékambi, T., Shinnick, T. M., Raoult, D., Drancourt, M., (2008). Complete *rpoB* gene sequencing as a suitable supplement to DNA-DNA hybridization for bacterial species and genus delineation. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58. 1807-1814.
2. Aguirre Garrido F., Hernández Rodríguez C., Martínez-Abarca F., Ramírez-Saad H., (2007). Estudio de la comunidad bacteriana en la rizósfera de cactáceas del valle de Tehuacán. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
3. Aguirre-Garrido, J. F., D. Montiel-Lug, C. Hernández-Rodríguez, G. Torres-Cortés, V. Millán, N. Toro, et al., (2012) Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semiarid highlands in central Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek* 101:891-904.
4. Ahrens, R. & Moll, G. (1970). Ein neues knospendes Bakterium aus der Ostsee. *Arch Mikrobiol* 70, 243–265
5. Arias, C.A., Del Bubba, M., Brix, H., (2001). Phosphorus removal by sands for use as media in subsurface flow constructed reed beds. *Water Res.* 35. 1159–1168.
6. Balas, D., Fernández-Moreira, E., De la Campa, A. G., (1998). Molecular Characterization of the Gene Encoding the DNA Gyrase A Subunit of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 180. 2854-2861.
7. Ben-Omar N., M.L. Merroun, J.M. Arias Peñalver & M.T. Gonzalez Muñoz. (1997). Comparative heavy metal biosorption study of Brewery yeast and *Myxococcus xanthus* biomass. *Chemosphere.* 35(10):2217-2283.

8. Bou, G., Fernández, O. A., García, C., Sáez N. J.A., Valdezate, S., (2011). Estudios de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enf Infecc y Microbiol Clin.* 29(8): 601-608.
9. Bravo-Hollis, H. (1978). *Las cactáceas de México.* Vol 1, 2da ed. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
10. Bustillos, C. R., *Diversidad bacteriana metilotrófica asociada a la cactácea *Neobuxbaumia macrocephala*.* Tesis doctoral en proceso. BUAP.
11. Crocker, F. H., Fredrickson J. K., White D. C., Ringelberg D. B., Balkwill D. L., (2000). Phylogenetic and physiological diversity of *Arthrobacter* strains isolated from unconsolidated subsurface sediments. *Microbiol.* 146. 1295-1310.
12. Eisen, J. A., (1995). The Rec A protein as a model molecule for molecular systematic studies of bacteria: comparison of trees of RecAs and 16S rRNAs from the same species. *J Mol Evol.* 41. 1105-1123.
13. Ezcurra E., Medina L. R., (1997). *Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán.* Instituto de Ecología, UNAM, Departamento de Botánica, Instituto de Biología, UNAM. Fascículo 18.
14. Ezziyyani, M., Pérez-Sánchez, C., Sid-Ahmed, A., Requena, M. E. y Candela M. E. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). Universidad de Murcia, España. *Anales de Biología* 26: 35-45.
15. Funke, G., Hutson R. A., Bernard K. A., Pfyffer G. E., Wauters G., Collins M. D., (1996). Isolation of *Arthrobacter* spp. from Clinical Specimens and Description of

- Arthrobacter cumminsii* sp. nov. and *Arthrobacter woluwensis* sp. nov., *J. Clin. Microbiol.*, 34. 2356- 2363.
16. García-Amaro M. E., (1973). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Segunda edición. Inst. de Geografía, UNAM. 146 pp.
 17. Ghanem, E. H., Al-Sayeed H. A., Saleh, K. M., (2000) An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*. *World J Microbiol Biotechnol* 16:459–464.
 18. Guzmán U, Arias S, Dávila P (2003) Catálogo de cactáceas mexicanas. UNAM/CONABIO, México. 315 pp.
 19. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *BioTechnology* 11: 1026-1030.
 20. Jiménez, S. C. L., (2011). Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista digital universitaria*. 12. 23 p.
 21. Kalyuzhnaya, M. G., Bowerman, S., Nercessian, O., (2005) Highly Divergent Genes for Methanopterin-Linked C1 Transfer Reactions in Lake Washington, Assessed via Metagenomic Analysis and mRNA Detection. *Appl Environ Microbiol.* 71. 8846-8854.
 22. Kasai, H., Ezaki, T., Harayama, S., (2000). Differentiation of Phylogenetically Related Slowly Growing Mycobacteria by Their *gyrB* Sequences. *J Clin Microbiol.* 38. 301-308.
 23. Kloepper J. W., Lifshitz, R. & Zablutowitz, R. M. 1989. Free living bacteria inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology* 7:39-43

24. Koneman, E. W., (2001). Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas a Color. Quinta Edición. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 10-16, 75-82
25. Küpfer, M., Kuhnert, P., Korczak, B. M., Peduzzi, R., Demarta, A. (2006). Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56. 2743-2751.
26. Kutschera, U., (2007). Plant-Associated Methylobacteria as Co-Evolved Phytosymbionts. *Rev Plant Signal Behav.* 2:2. 74-78.
27. Lau, E., Fisher, M. C., Steudler, P. A., Cavanaugh, C. M., (2013). The Methanol Dehydrogenase Gene, *mxoF*, as a Functional and Phylogenetic Marker for Proteobacterial Methanotrophs in Natural Environments. *PLoS ONE* 8(2): e56993. doi:10.1371.
28. Lee S D., (2006). *Blastococcus jejuensis* sp. nov., an actinomycete from beach sediment, and emended description of the genus *Blastococcus* Ahrens and Moll 1970. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56. 2391-2396.
29. López-Galindo, F., D. Muñoz-Iniestra, M. Hernández-Moreno, A. Soler-Aburto, M. C. Castillo-López e I. Hernández-Arzate. (2003). Análisis integral de la toposecuencia y su influencia en la distribución de la vegetación y la degradación del suelo en la subcuena de Zapotitlán Salinas, Puebla. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* 56:19-41.
30. Luedemann, G.M. (1968). *Geodermatophilus*, a new genus of the *Dermatophilaceae* (*Actinomycetales*) *Journal of Bacteriology* 96:1848-1858.

31. Mevs, U., Stackebrandt, E., Schumann, P., Gallikowski, C. A. & Hirsch, P. (2000). *Modestobacter multiseptatus* gen. nov., sp. nov., a budding actinomycete from soils of the Asgard Range (Transantarctic Mountains). *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 337–346.
32. Miller, L. P., Crawford, J. T., Shinnick, T. M., (1994). The *rpoB* Gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 38. 805-810.
33. Miquelajauregui, Y., and Valverde, T. (2010). Survival and early growth of two congeneric columnar cacti that differ in their level of rarity. *Journal of Arid Environments*,74:1624-1631.
34. Montaña N. M., Camargo-Ricalde S. L., García-Sánchez R., Monroy A., (2007). *Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos*. Instituto nacional de Ecología-SEMARNAT, Mundi-Prensa SA de CV UAM Iztapalapa, FES Zaragoza, UNAM. Distrito Federal, México. 460 pp.
35. Montes P. C. I., (2013) Aislamiento, identificación molecular y bioactividad de bacterias Gram positivas asociadas a la esponja *Aplysina clathrata*. Tesis de Maestría en Ciencias Marinas en manejo de recursos marinos. IPN.
36. Ochoa T. V. (2001). *Geomorfología, clima y vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla-Oaxaca, México*. Facultad de Ciencias UNAM. Tesis para obtener el grado de Biólogo.
37. Prakash, O., Verma, M., Sharma, P., Kumar, M., Kumari, K., Singh, A., Kumari, H., Jits., Gupta, S., khanna, M., Lal. R., (2007). Polyphasic approach of bacterial classification – An overview of recent advances. *Indian J. Microbiol.* 47:98-108.

38. Puente M. E., Bashan Y., Li C. Y. & Lebsky V. K., (2004a). Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biology* 6: 629-642.
39. Puente M.E., Li C.Y. & Bashan Y. (2004b). Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock weathering desert plants. II. Growth promotion of cactus seedlings. *Plant Biology* 6: 643-649.
40. Ramos, E., Zúñiga, D., (2008). Efecto de la humedad, temperatura y ph del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Ecol Appl.* 7(1-2). 123-130.
41. Reddy (g.s.n.), Potrafka (r.m.) and Garcia-Pichel (f.), (2007). *Modestobacter versicolor* sp. nov., an actinobacterium from biological soil crusts that produces melanins under oligotrophy, with emended descriptions of the genus *Modestobacter* and *Modestobacter multiseptatus* Mevs et al. 2000. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57. 2014-2020.
42. Rodicio, M. R., Mendoza, M. C., (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 22. 238-245.
43. Rodríguez-Zaragoza S., Gaviria-González L., Rivera-Aguilar V. (2005). Riqueza de especies de amebas desnudas en la rizósfera de *Neobuxbaumia tetetzo* y *Prosopis laevigata* en el desierto del valle de Tehuacán-Cuicatlán, México. *Rev Soc Mex Hist Nat.* vol.ii num.1. 54-64.
44. Rzedowski, J. (1978). *Vegetación de México*. Limusa, México.

45. Seynos García, E., (2010) Caracterización genotípica de bacterias metilotróficas aisladas de cactáceas de la Reserva de la Biósfera del valle de Tehuacán-Cuicatlán. BUAP.
46. Stanley, Y. 1994. The Family Streptomycetaceae. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore USA: USA: Ed. Williams & Wilkins. pp. 2344-2347.
47. Stackebrandt, E., Rainey, F. A. & Ward-Rainey, N. L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. Int J Syst Bacteriol 47, 479–491.
48. Tamayo, J. L. (1962). Geografía general de México, Instituto Mexicano de Investigaciones Económicas. México. 562 pp.
49. Tokala, R. K., J. L. Strap, C. M. Jung, D. L. Crawford, M. H. Salove, L. A. Deobald, J. F. Bailey, and M. J. Morra. (2002). Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). Appl. Environ. Microbiol. 68:2161-2171.
50. Urzi, C., Salamone, P., Schumann, P., Rohde, M. & Stackebrandt, E. (2004). *Blastococcus saxobsidens* sp. nov., and emended descriptions of the genus *Blastococcus* Ahrens and Moll 1970 and *Blastococcus aggregatus* Ahrens and Moll 1970. Int J Syst Evol Microbiol 54, 253–259.
51. Valdes P. J., D. J. Beerling, and C. E. Johnson (2005), The ice age methane budget, Geophys Res Lett., 32. L02704.

52. Valiente-Banuet A, Casas A, Alcantara A, Dávila P, Flores-Hernández N, Arizmendi MC, Ortega-Ramírez J. and Soriano JA (2000). La vegetación del Valle de Tehuacan-Cuicatlan. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 67: 25–75.
53. Vandamme P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, k., and Swings, J., (1996). Polyphasic Taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev.* 60. 407-438.
54. Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G. F., Chater K. F., Sinderen D., (2007). Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiol Mol Biol Rev.* 71. 495-548.
55. Vinueza V. A. G., (2010) Determinación de la relación entre la caracterización fenotípica y genotípica de actinomicetos como mecanismo de replicación de microorganismos útiles en biotecnología.
56. Vlastic, I., Mertens, R., Seco, E. M., Carrasco, B., Ayora, S., Reitz, G., Commichau, F. M., Alonso, J. C., Moeller, R., (2013). *Bacillus subtilis* Rec A and its accessory factors, Rec F, Rec O, Rec R and Rec X, are required for spore resistance to DNA double-strand break. *Nucleic Acids Res.* 1.1-13.
57. Vorob'ev, A. V., Boer, W., Larissa B. Folman, L. B., Bodelier, P.L. E., Doronina, N. V., Suzina, N. E., Trotsenko Y. A., Dedysh, S. N., (2009). *Methylovirgula ligni* gen. nov., sp. nov., an obligately acidophilic, facultatively methylotrophic bacterium with a highly divergent *mxoF* gene. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59, 2538–2545.
58. Yamamoto, S., Harayama, S., (1995). PCR Amplification and Direct Sequencing of *gyrB* Genes with Universal Primers and Their Application to the Detection and Taxonomic Analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61. 1104-1109.

15. ANEXOS

ANEXO 1. MEDIO GP

MEDIO GP	
REACTIVOS	
Glicerol	10 g
Peptona de caseína	10 g
Agar bacteriológico	18 g
Volumen final	1 Lt

La esterilización de este medio se realiza a 15 libras por 20 minutos.

ANEXO 2. MEDIO 47

MEDIO 47	
REACTIVOS	Concentración
Extracto de levadura	0.5 g
Glicerol	5 g
Peptona de caseína	0.5 g
Glucosa	1 g
Almidón soluble	2 g
Na ₂ CO ₃	0.105 g
Agar	1.8 g
Volumen Final	100 ml

La esterilización de este medio se realiza a 10 libras por 30 minutos para evitar la caramelización de la glucosa.

ANEXO 3. AGAR MEDIO MÍNIMO

SALES EMPLEADAS EN MEDIO MÍNIMO MMS				
	Reactivo	1 litro	stocks	100 ml de medio
1	K ₂ HPO ₄	1.2 g	5 g/50 ml	1.2 ml
2	KH ₂ PO ₄	0.62 g	5 g/50 ml	0.62 ml
3	CaCl ₂ 6H ₂ O	0.05 g	0.1 g/10 ml	0.5 ml
4	MgSO ₄ 7H ₂ O	0.20 g	1 g/ 10 ml	0.2 ml
5	NaCl	0.10 g	1g/10 ml	0.1 ml
6	FeCl ₃ 6H ₂ O	1.0 mg	0.01 g/10 ml	0.1 ml
7	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 ug	0.0005g/5 ml	0.5 ul
8	CuSO ₄ 5H ₂ O	5 ug	0.0005g/5 ml	5 ul
9	MnSO ₄ 5H ₂ O	10 ug	0.0005g/5 ml	10 ul
10	Na ₂ MoO ₄ 7H ₂ O	10 ug	0.0005g/5 ml	10 ul
11	H ₃ BO ₃	10 ug	0.0005g/5 ml	10 ul
12	ZnSO ₄ 7H ₂ O	70 ug	0.0005g/5 ml	70 ul
13	CoCl ₂ 6H ₂ O	5 ug	0.0005g/5 ml	5 ul

Medio para Fuentes de Carbono:

1. Emplear la fuente de carbono deseada en una concentración de 0.5 % (para 1 litro de medio 5 g de F de C y para 100 ml de medio 0.5 g).
- 2.
3. Esterilizar el medio completo a 10 libras por 30 minutos para evitar caramelización de azúcares.

ANEXO 4. METODO DROP PLATE.

Para las pruebas en las que se determinó el crecimiento bacteriano bajo diferentes condiciones de cultivo se utilizó el método de goteo en placa para el cual se realizaron diluciones seriadas 1:10 a partir de un cultivo de 48 horas a 30°C y se colocaron por triplicado gotas de 10 µl de cada una de las diluciones en placas con medio gelificado. Las placas se incubaron en las condiciones de crecimiento correspondientes.