

## **BIOPROSPECCIÓN DE LA PLANICIE DE INUNDACIÓN DEL PARQUE ESTATAL CAÑÓN DE FERNANDEZ, DURANGO, MÉXICO: BÚSQUEDA DE AGENTES BIOACTIVOS**

García Pérez A.P.<sup>a\*</sup>, Ceniceros Vargas P.<sup>a</sup>, Lazalde Ruelas D.<sup>a</sup>, Hernández Terán F.<sup>a</sup>, Valencia Castro, C.M.<sup>a</sup>, Barboza-Corona J.E.<sup>b</sup>, De la Fuente-Salcido N.M.<sup>a\*</sup>.

a) Universidad Autónoma de Coahuila, Escuela de Ciencias Biológicas, S.S. Bioprospección y Bioprocesos. Boulevard Torreón-Matamoros Km. 7.5, Ciudad Universitaria. C.P. 27104. Torreón, Coahuila, México.

b) Universidad de Guanajuato, División de Ciencias de la Vida, Departamento de Alimentos, Campus Irapuato-Salamanca, Irapuato, Guanajuato, 36500, México.

\* normapbr322@gmail.com; \*adapgarciap@gmail.com

### **RESUMEN**

La búsqueda de nuevos compuestos representa el principal propósito de la bioprospección, una fuente inagotable de nuevos genes, antimicrobianos, enzimas, proteínas y otros compuestos bioactivos. La etapa inicial de este proyecto de bioprospección en muestras de suelo de la planicie de inundación del parque estatal Cañón de Fernández en Lerdo Durango, México proporcionó a la fecha, 108 cepas aisladas Grampositiva (63), Gramnegativas (45), esporogénicas (14) que se identificaron como lipolíticas (27), quitinolíticas (13) y bacteriocinogénicas (47). Actualmente no existen reportes de estudios que incluyan el aislamiento y/o identificación de bacterias del Cañón de Fernández, por lo que estamos iniciando un proyecto a largo plazo que seguramente proporcionará información original y muy valiosa a través de la bioprospección. La siguiente etapa del proyecto permitirá identificar molecularmente a los aislados que tienen la capacidad de hidrolizar lípidos, quitina o de producir péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) y conocer un poco más de la diversidad biológica y química de esta extraordinaria área natural de México.

### **ABSTRACT**

The search for new compounds is the main purpose of bioprospecting and is an inexhaustible source of new genes, antimicrobials, enzymes, proteins and other bioactive compounds. The initial stage of this project bioprospecting in soil samples from the floodplain Cañón de Fernández State Park in Lerdo Durango, Mexico provided the date, 108 isolates Gram positive (63), Gram-negative (45), sporogenic (14), identified as lipoliticascas (27), chitinolytic (13) and bacteriocinogenic (47). Currently there are no reports of studies involving the isolation and/or identification of bacteria from Cañón de Fernández, so we are starting a long term project that will surely provide original and very valuable information through bioprospecting. The next stage of the project includes molecular identification of isolates that have the ability to hydrolyze lipids, chitin or producing antimicrobial peptides (bacteriocins) and learn more of the biological and chemical diversity of this extraordinary natural area of México.

**Key words:** Bioprospección, lipoliticos, bacteriocinogénicos.

**Área:** Microbiología y biotecnología.

## INTRODUCCIÓN

La exploración de la biodiversidad o bioprospección realiza la búsqueda intensa de compuestos bioactivos únicos en microorganismos, plantas y animales inexplorados para lograr el descubrimiento de nuevos compuestos con aplicaciones útiles (De-Long, 2005).

La diversidad biológica y química es un recurso inagotable de bioprospección para el descubrimiento de las moléculas bioactivas más importantes para la humanidad (Ramesha et al., 2011); a través de la biodiversidad y quimiodiversidad se encontraron antibióticos (Davies y Davies, 2010), enzimas quitinolíticas para el biocontrol de fitopatógenos (Gohel et al., 2006), enzimas de restricción (Gómez-Rodríguez and Huete-Pérez, 2008), incluso enzimas lipolíticas con mayor actividad (Sirisha et al., 2010), bacteriocinas (De la Fuente-Salcido et al., 2013) y lipopéptidos (Chen et al., 2008). Además, la bioprospección ha generado descubrimientos de nuevos agentes antimicrobianos y compuestos bioactivos de valor comercial para el control de patógenos de alimentos y como bioterapéuticos (Fernández 2006).

En este trabajo se presentan los primeros esfuerzos para explorar la biodiversidad microbiana del suelo de la planicie de inundación del extraordinario Parque Estatal Cañón de Fernández, un área natural con una superficie de 17.000 hectáreas, localizada en el municipio de Lerdo, Durango y que representa la principal área de recarga del acuífero de la Comarca Lagunera (Lerdo y Gómez Palacio en Durango y Torreón en Coahuila) ([www.lerdo.gob.mx](http://www.lerdo.gob.mx)).



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras de suelo

Se recolectaron ocho muestras por duplicado de la planicie de inundación del Cañón de Fernández en los meses de octubre y noviembre de 2013, a una profundidad ~ de 20 cm.

### Aislamiento e Identificación microbiológica preliminar:

Las muestras de suelo se diluyeron (1g), se pasteurizaron (70°C/15 min) y se enfriaron en hielo 15 min. Se plaquearon las muestras (30-50 µL) por extensión en placas de agar nutritivo (AN) (BIOXON) y se incubaron a 35±2° C.

Las cepas se aislaron individualmente en gotas de AN crecidas 24 h a 35 ±2 °C. Se registró la morfología colonial, tinción de Gram y la formación de esporas. Todas las

colonias aisladas se inocularon en ~ 5 mL de caldo nutritivo (CN) (BIOXON) en agitación a 200 rpm a 35±2 °C. Se sembraron en agares específicos para identificar cualitativamente la capacidad lipolítica, quitinolítica y bacteriocinogénica. Además se tomaron dos alícuotas (1 mL), una para centrifugar para obtener sobrenadantes (13,000 rpm/3min) para realizar las pruebas de difusión en pozos y la otra para conservación en glicerol al 30% en ultracongelación. Los paquetes celulares obtenidos se utilizaron para extraer el DNA para identificación por PCR.

### **Capacidad lipolítica y quitinolítica**

Todas las colonias se inocularon por rayado para analizarse cualitativamente en placas con un medio base con (0.5% (p/v) peptona, 0.3% (p/v) extracto de levadura, 2% agar, 1% (v/v) y se enriqueció con tributirina (pH 7.0) y 1% de Rodamina B al 0.001% (p/v) (Sarada et al., 1998; Granja, 2012 o con quitina coloidal (0.4 %) y las placas se incubaron a 35±2 °C por 48 h.

La prueba de difusión en pozos en los mismos agares incluyó utilizando 100 µL de sobrenadante depositado pocillos de 8 mm de diámetro en cada agar.

### **Capacidad bacteriocinogénica:**

Los aislados de suelos se sembraron por rayado en agar de pozos (AP) (agar bacteriológico con 0.75% caldo soya tripticaseína) adicionado con (0.7%) de la cepa indicadora obtenida del Instituto Pasteur de Francia, el *B. cereus* 183 y se utilizó un control de la bacteria productora de Morricina, (*B. thuringiensis* subsp *morrisoni*). Las placas se incubaron a 28 °C por 24 h. y se buscó inhibición del crecimiento de la cepa indicadora (halo alrededor de la colonia).

Para la determinación cuantitativa de la capacidad de producir bacteriocinas se realizó la difusión en pocillos (Barboza-Corona et al., 2007) con los sobrenadantes (100 µL). Las placas se incubaron a 4°C toda la noche y posteriormente a 28°C por 24h y se determinó la presencia de halos de inhibición del crecimiento de la cepa indicadora. Se midió el diámetro de la inhibición y se determinó la actividad ( $A = \pi r^2 = \pi (D/2)^2 = \pi D^2/4$ ) en unidades arbitrarias (un mm<sup>2</sup> de inhibición del crecimiento de la cepa indicadora corresponde a una unidad arbitraria de actividad).

### **Identificación molecular general bacteriana:**

Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen DNAr 16S en las cepas aisladas. La mezcla de reacción incluyó 0.3 µL de DNA polimerasa Econo Taq® (1U, lucigen®, USA), 8 µL buffer 1X Econo Taq (lucigen®, USA) conteniendo MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTP's 70 µM (Gibco, USA), 1.5 µL de oligonucleótidos directo UBF y reverso 1492. Las secuencias de los oligos utilizados fueron para UBF F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTGAG-3' y 1492 R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (León-Galvan et al., 2009). Las condiciones para la amplificación del rDNA incluyeron 5 min a 95°C; 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 58°C y 90s a 72°C, con una extensión final de 5 min a 7°C en un termociclador C1000™ Touch (Bio-Rad). Se verificó la amplificación por electroforesis (90 V) en geles de agarosa al 1% (p/v) detectando las bandas teñidas con 2 µL de gel red (GelRed □ 10,000X Biotum).

## RESULTADOS

Las muestras de suelo hasta ahora analizadas son dos, se ha logrado aislar e identificar preliminarmente un total de 108 cepas, 63 Grampositivas, 45 Gramnegativas, 14 forman espora, 27 lipolíticas, 13 quitinolíticas y 47 bacteriocinogénicas.

Las cepas productoras de lipasas se identificaron por un color rojizo al irradiar las cajas con luz UV a 420 nm y se compararon contra un control de *B. thuringiensis* lipolítica (Fig. 1).

Las cepas quitinolíticas se identificaron por la presencia de hidrólisis alrededor del crecimiento o el halo de inhibición formado después de 48 a 72 h de incubación. Se utilizó un control de *Serratia marcescens* NIMA productora de quitinasas (Ruíz-Sánchez et al., 2005).

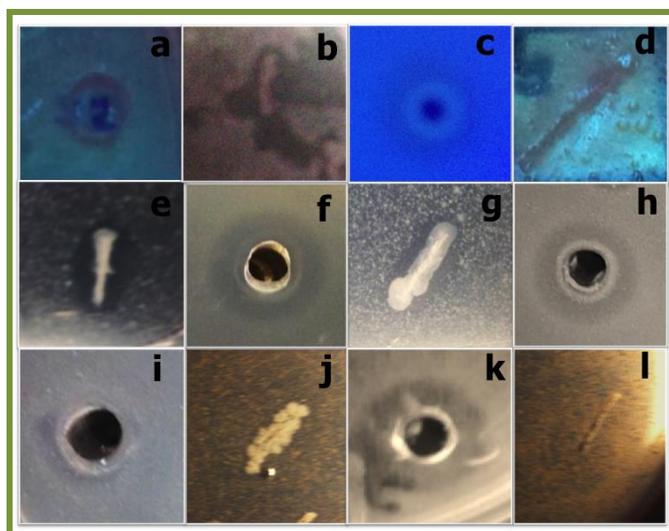


Figura 2. Aislados de muestras de suelo. Bacterias lipolíticas detectadas en: a y c) pozos en agar con Rodamina B expuestos a luz UV (420 nm); b y d) en agar tributirina con Rodamina B sembradas por rayado y expuesto a luz UV. Aislados con capacidad bacteriocinogénica determinada en: e y g) AP con *B. cereus* 183 por rayado; f y h) difusión en pozos con halos de inhibición de *B. cereus*. Aislados con capacidad quitinolítica detectada en: i y k) agar quitina por difusión en pozos; j y l) en agar quitina coloidal inoculado por rayado.

En los aislados se pueden encontrar un amplicones de tamaño correspondiente a la identificación molecular con el polinucleótido de RNA denominado RNAr (Fig. 3). Este consiste en ~1500 pb cuya codificación depende de la presencia del gen DNA ribosomal *rrs* o DNA ribosomal 16S (DNAr 16S). Lo anterior confirmó la naturaleza bacteriana de los aislados.

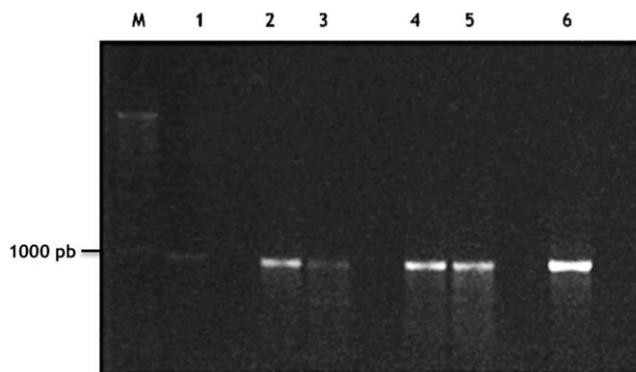


Figura 3. Amplificación por PCR de la región 16S del DNAr de algunos aislados de suelo del Parque Estatal Cañón de Fernández en Lerdo, México. Carril M, Marcador 1 Kb (Invitrogen); carriles 1 a 6 amplicones de diversas cepas identificadas preliminarmente, analizados en geles de agarosa al 1% teñido con GelRed<sup>®</sup> (Biotium).

## DISCUSIÓN

El Parque Estatal Cañón de Fernández es una área protegida que se distingue como un refugio de la flora y la fauna con 25 especies endémicas, 392 especies de vertebrados, con especies consideradas como muy raras, y especies en peligro de extinción, amenazadas o que requieren protección especial (Valencia-Castro, 2012).

Sin embargo poco se ha estudiado sobre el tipo de microorganismos encontrados en este hábitat, y las condiciones ambientales nos conducen a suponer la existencia de una microflora muy diversa que permite la bioprospección para buscar compuestos bioactivos, tal como se ha realizado en regiones a nivel mundial como volcanes en Nicaragua, o suelo en India (Gómez-Rodríguez and Huete-Pérez, 2008; Sirisha et al., 2010).

Actualmente no existen reportes de estudios que incluyan el aislamiento y/o identificación de bacterias del Cañón de Fernández, por lo que estamos iniciando un proyecto a largo plazo que seguramente proporcionará información original y muy valiosa a través de la bioprospección de suelo de la planicie de inundación.

## BIBLIOGRAFÍA

Barboza-Corona JE, Vázquez-Acosta H, Bideshi DK, Salcedo-Hernández R. 2007. Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. Archives of Microbiology 187 (2): 117–126.

Chen H, Wang L, Su CX, Gong GH, Wang P, Yu ZL. 2008. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *B subtilis*. Letters in Applied Microbiology 47:180–186.

De la Fuente-Salcido, NM, Casados-V LE, Barboza-Corona, JE. 2013. Bacteriocins of *Bacillus thuringiensis* can expand the potential of this bacterium to other areas rather than limit its use only as microbial insecticide. Canadian Journal of Microbiology 59:515-522.

De-Jong AJ, Cordewener J, Lo Schiavo F, Terzi M, Vandekerckhove J, Van-Kammen A, De-Vries S. 1992. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell* 4:425-433.

Davies J, Davies D. 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74(3): 417.

Fernández P. 2006. Antibacterial discovery and development—the failure of success? *Nature Biotechnology* 24: (12) 1497-1503. DOI: 10.1038/nbt1206-1497.

Granja R. 2012. Producción de lipasas mediante microorganismos aislados de ambientes naturales. Disponible en: <http://blogs.udla.edu.ec/fica/files/2012>

Gómez-Rodríguez JA, Herrera-Cuadra HP. 2008. Bioprospección de enzimas de restricción en bacterias de suelos y ambientes volcánicos de Nicaragua. *Encuentro* 81: 70-87.

JM. 2013. Filogenia bacteriana mediante el análisis del rRNA 16s. Disponible en: [www.arareko.net/biology/bacterial\\_phylogeny/index.pdf](http://www.arareko.net/biology/bacterial_phylogeny/index.pdf)

León-Galván MF, Carbajal N, Frickey T, Santos L. 2009. Microbial identification of the Nichupte-Bojorquez coastal lagoon in Cancun, México. *Aquatic Ecology* 43:197-205.

R. Ayuntamiento Lerdo Durango (2014): Disponible en: <http://www.lerdo.gob.mx/>

Ramesha BT, Jürg G, Ravikanth G, Priti V, Ganeshiah KN, Uma Shaanker R. 2011. Biodiversity and Chemodiversity: Future Perspectives in Bioprospecting. *Current Drug Targets* 12: 1-16.

Ruiz-Sánchez A, Cruz-Camarillo R, Salcedo-Hernández R, Barboza-Corona JE. 2005. Chitinases from *Serratia marcescens* Nima. *Biotechnology Letters* 27: 649–653.

Sarada SB, Sreekanth SK, Rintu B, Bhattacharyya BC. 1998. Production and optimization of microbial lipase. *Bioprocess Engineering* 19: 29-32.

Sirisha E, Rajasekar N, Lakshmi Narasu M. 2010. Isolation and Optimization of Lipase Producing Bacteria from Oil Contaminated Soils. *Advances in Biological Research* 4 (5): 249-252.