

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MYXOBACTERIAS A PARTIR DE  
MUESTRAS AMBIENTALES DE COSTA RICA**

**Informe de trabajo final de graduación  
para optar por el título de ingeniero en biotecnología  
Grado académico bachillerato**

**Rolando Daniel Moreira Soto**

**Cartago enero, 2009**

# **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MYXOBACTERIAS A PARTIR DE MUESTRAS AMBIENTALES DE COSTA RICA**

**Rolando Daniel Moreira Soto**

## **RESUMEN**

Las myxobacterias son un grupo de bacterias gram negativas, con características muy distintas con respecto a las demás bacterias. Estas producen una estructura multicelular llamada cuerpo fructífero, no producido por ningún otro tipo de bacterias, y la gran importancia de este grupo radica en que, producen gran cantidad de metabolitos secundarios, los cuales, en muchos casos son compuestos nuevos y con características promisorias, para la búsqueda de nuevos fármacos y antibióticos, incluso se habla de compuestos con posible actividad anti cáncer.

El aislamiento de estas bacterias se reporta como de gran complejidad, lo cual, ha limitado la investigación de este grupo. El objetivo del presente estudio fue evaluar metodologías para aislamiento e identificación general de myxobacterias a partir de muestras ambientales de Costa Rica.

Se probó 4 métodos de aislamiento, y se tuvo que utilizar una concentración de antibiótico mayor a la reportada, debido a la rápida contaminación. Como resultado de esta investigación, se lograron aislar 19 cepas puras de myxobacterias y 1 cepa de *Herpetosiphon*, en 3 meses aproximadamente, lo cual es un tiempo corto según lo que se ha reportado, y además de esto se identificaron las mismas molecularmente con ayuda de las bases de datos. Los métodos del medio WCX con *E. coli*, y del suelo con estiércol de conejo dieron los mejores resultados. Con el método de papel de celulosa se da el crecimiento de myxobacterias difíciles de purificar, por lo que fue el menos efectivo junto con el método de cámara húmeda (posiblemente por incubarse a temperatura ambiente). Todos los aislamientos obtenidos pertenecen al suborden Cystobacterineae, lo que se explica porque estas crecen más rápido que los otros subórdenes y se purifican más fácilmente. Los aislamientos se encontraban en 3 géneros, y esta poca diversidad obtenida evidencia la dificultad que conlleva la fase de purificación, siendo esta más fácil en los géneros *Myxococcus* y *Coralloccoccus*, que fueron la mayoría obtenida en este estudio.

La morfología observada en los cuerpos fructíferos, y en los biofilms producidos en la placa, difiere entre cepas de la misma especie, lo que evidencia que la clasificación basada en características morfológicas es muy difícil, y en ciertos casos se producen cambios en el cultivo, y esto lleva a errores en la clasificación.

Al analizar las secuencias del ADNr 16S, se observa que este grupo tiene gran semejanza en cuanto a esta región, y no se permite una separación clara de las especies por medio del porcentaje de identidad, ya que las especies de algunos géneros no se

logran separar inclusive al 99%. Para la correcta separación genética de las especies de este grupo de bacterias, se deberán hacer análisis tomando en cuenta otros genes.

**Palabras clave:** Myxobacterias, aislamiento, purificación, cuerpo fructífero, ADNr 16S

- Informe de trabajo final de graduación, Escuela de Biología, Instituto tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2009.

## ABSTRACT

The myxobacterias are a group of gram negative bacteria, with very distinctive characteristics in contrast with other bacteria. They produce a multicellular structure called fruiting bodies, not produced by any other bacteria, and the importance of this group is that they produce large amounts of secondary metabolites, which in many cases are new compounds with promising characteristics, for the search of new drugs and antibiotics. Some compounds even have potential anti-cancer activity.

The isolation of these bacteria is reported as highly complex, which has limited the investigation of this group. The aim of this study was to assess methodologies for isolation and general identification of myxobacterias from environmental samples from Costa Rica.

Four methods of isolation were tested, and it was necessary to use an antibiotic concentration higher than previously reported, due to the rapid contamination. As a result of this investigation, in approximately 3 months, 19 pure strains of myxobacterias were isolated and 1 strain of *Herpetosiphon*, which is a short time as reports say, and they were identified with molecular methods with the help of databases. The methods of WCX with *E. coli*, and soil with rabbit dung gave the best results. The method of cellulose paper promotes the growth of cellulose degrading myxobacterias, which are difficult to purify, and therefore it was the least effective method, along with moist chambers of decomposing wood and bark. All isolates belong to the suborder Cystobacterineae, and this is explained because they grow faster than the other suborders and purified more easily. The isolates belong to 3 genera, and this little diversity obtained confirms the difficulty of the purification step, and that it is easier in the genera *Myxococcus* and *Coralloccoccus*, which were the majority obtained in this study.

The morphology observed in the fruiting bodies, and in the biofilms produced on the plate, differs among strains of the same species, which shows that the classification based on morphological characteristics is very difficult and in some cases there are changes in culture conditions, and this leads to errors in classification.

By analyzing the sequences of 16S rDNA, it appears that this group has a great similarity in this region, and may not be a clear separation of species by means of the percentage of identity, and that species of some genera are not able to separate even at 99%. To clarify the genetic separation of the species of this group of bacteria, analysis of other genes should be done.

**Key words:** Myxobacteria, isolation, purification, fruiting body, rDNA 16S

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MYXOBACTERIAS A PARTIR DE  
MUESTRAS AMBIENTALES DE COSTA RICA**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del  
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial  
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

**Miembros del Tribunal**



**Dra. Virginia Montero,  
Profesora Asesora-ITCR**



**MSc. Catalina Murillo,  
Asesora INBio**



**MSc. Johnny Peraza,  
Lector**

## DEDICATORIA

A mis padres, mi hermano, toda mi familia y a mi novia por el apoyo que me dieron estas personas durante mis estudios.

Rolando

## **AGRADECIMIENTOS**

El autor desea dejar constancia de su profundo agradecimiento a las siguientes instituciones y personas por la colaboración en el presente trabajo:

A la Unidad de Bioprospección del INBio, al ICBG por su apoyo económico para la ejecución de la investigación, e intelectual para el desarrollo de este proyecto, a la Gerente de referida Unidad, MBA. Lorena Guevara y a la Coordinadora Científica del INBio, PhD. Giselle Tamayo, por apoyar la realización de esta investigación. A los funcionarios (as) de dicha Unidad y muy especialmente a M.Sc. Catalina Murillo, investigadora y guía durante el desarrollo del proyecto, al Dr. Keilor Rojas, investigador, por su gran aporte durante la fase final de la investigación, al Lic. Loengrin Umaña, de igual manera investigador, por su apoyo en las labores de laboratorio.

A la Escuela de Biología, a los profesores (as) y funcionarios (as) del ITCR, y muy especialmente a la Dra. Virginia Montero, profesora asesora, por sus aportes y sugerencias.

## INDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>5</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>6</b>
<b>INDICE GENERAL</b> .....	<b>7</b>
<b>INDICE DE CUADROS</b> .....	<b>8</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>INDICE DE ANEXOS</b> .....	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>13</b>
GENERALIDADES .....	13
ECOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN .....	15
AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y PRESERVACIÓN.....	17
IMPORTANCIA .....	22
TAXONOMÍA, IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS GENÉTICO .....	23
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
OBJETIVO GENERAL .....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
RECOLECCIÓN DE MUESTRAS .....	28
MÉTODOS DE AISLAMIENTO .....	29
MÉTODOS DE PURIFICACIÓN.....	32
PRESERVACIÓN .....	33
IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA .....	33
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR .....	33
EXTRACCIÓN DE ADN, PCR Y SECUENCIACIÓN.....	34
CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA Y ANÁLISIS .....	35
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>49</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>58</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>60</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>61</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>65</b>



## INDICE DE CUADROS

Núm.	Título	Pág.
<b>Cuadro 1.</b>	Especies de myxobacterias más típicas en diferentes sustratos según frecuencia de ocurrencia (Shimkets <i>et al.</i> , 2006).....	17
<b>Cuadro 2.</b>	Distribución de las myxobacterias aisladas según tipo de muestra origen y método de aislamiento utilizado.....	38
<b>Cuadro 3.</b>	Géneros de myxobacterias aislados por los diferentes métodos de aislamiento. ....	40
<b>Cuadro 4.</b>	Taxonomía completa de las myxobacterias obtenidas de los distintos métodos de aislamiento.....	41
<b>Cuadro 5.</b>	Número de OTUs en los aislamientos utilizando porcentajes distintos de similitud.....	44

## INDICE DE FIGURAS

Núm.	Título	Pág.
<b>Fig. 1.</b>	Cuerpos fructíferos de myxobacterias. En la parte superior, en orden: <i>Stigmatella aurantiaca</i> , <i>Chondromyces apiculatus</i> , <i>Myxococcus stipitatus</i> y <i>Cystobacter fuscus</i> . En la parte inferior, en orden: <i>Corallocooccus exiguus</i> , <i>Angiococcus disciformis</i> , <i>Archangium serpens</i> , y <i>Melittangium lichenicola</i> (Dawid, 2000).....	14
<b>Fig. 3.</b>	Ejemplos de los métodos de aislamiento utilizados. (a) Cámara húmeda, (b) WCX con <i>E. coli</i> , (c) Suelo con excremento (d) ST21CX con papel de celulosa.....	32
<b>Fig. 4.</b>	Cuerpos fructíferos de algunas myxobacterias que no se lograron purificar en cultivo. (a) Cuerpo fructífero en papel de celulosa, (b) Cuerpos fructíferos en estiércol de conejo, (c) y (d) Cuerpos fructíferos en material vegetal en descomposición.....	39
<b>Fig. 5.</b>	Relaciones filogenéticas de las myxobacterias aisladas y determinadas con la región 16S con el método NJ-TN y un bootstrap de 1000 repeticiones. (Programa MEGA) .....	42
<b>Fig. 6.</b>	Cuerpos fructíferos de los cuales se realizaron los aislamientos. (a) INBio2880A ( <i>Corallocooccus exiguus</i> ). (b) INBio2885A ( <i>Corallocooccus exiguus</i> ). (c) INBio3009C ( <i>Corallocooccus exiguus</i> ). (d) INBio3009D ( <i>Corallocooccus exiguus</i> ). (e) INBio3009G ( <i>Corallocooccus coralloides</i> ). (f) INBio3009I ( <i>Corallocooccus coralloides</i> ). (g) INBio3009B ( <i>Corallocooccus coralloides</i> ). (h) INBio3009H ( <i>Corallocooccus</i> sp.). (i) INBio2885B ( <i>Myxococcus</i> sp.). (j) INBio2886B ( <i>Myxococcus</i> sp.). (k) INBio2886A ( <i>Myxococcus</i> sp.). (l) INBio3009A ( <i>Myxococcus stipitatus</i> ). (m) INBio3009F ( <i>Myxococcus stipitatus</i> ). (n) INBio3009E ( <i>Myxococcus stipitatus</i> ). (o) INBio3009J y INBio3009K ( <i>Myxococcus stipitatus</i> ). (p) INBio3009L ( <i>Myxococcus stipitatus</i> ). (q) INBio2880B ( <i>Cystobacter</i> sp.). (r) INBio3004A ( <i>Cystobacter ferrugineus</i> ).....	47
<b>Fig. 7.</b>	Estructura de la cual se aisló <i>Herpetosiphon</i> sp. y morfología de la colonia (aislamiento 3007A).....	48

## INDICE DE ANEXOS

Núm.	Título	Pág.
<b>Anexo 1.</b>	Recetas de los medios de cultivo utilizados (para 1 litro).....	65
<b>Anexo 2.</b>	Colonias de los aislamientos en placas CY. (a) INBio2880A ( <i>Corallocooccus exiguus</i> ). (b) INBio2885A ( <i>Corallocooccus exiguus</i> ). (c) INBio3009C ( <i>Corallocooccus exiguus</i> ). (d) INBio3009D ( <i>Corallocooccus exiguus</i> ). (e) INBio3009G ( <i>Corallocooccus coralloides</i> ). (f) INBio3009I ( <i>Corallocooccus coralloides</i> ). (g) INBio3009B ( <i>Corallocooccus coralloides</i> ). (h) INBio3009H ( <i>Corallocooccus</i> sp.). (i) INBio2885B ( <i>Myxococcus</i> sp.). (j) INBio2886B ( <i>Myxococcus</i> sp.). (k) INBio2886A ( <i>Myxococcus</i> sp.). (l) INBio3009A ( <i>Myxococcus stipitatus</i> ). (m) INBio3009F ( <i>Myxococcus stipitatus</i> ). (n) INBio3009E ( <i>Myxococcus stipitatus</i> ). (o) INBio3009K ( <i>Myxococcus stipitatus</i> ). (p) INBio3009J ( <i>Myxococcus stipitatus</i> ). (q) INBio3009L ( <i>Myxococcus stipitatus</i> ). (r) INBio2880B ( <i>Cystobacter</i> sp.). (s) INBio3004A ( <i>Cystobacter ferrugineus</i> ).....	70
<b>Anexo 3.</b>	Características de los sitios de colecta de las muestras.....	71
<b>Anexo 4.</b>	Resultados obtenidos al comparar las secuencias de los aislamientos con la base de datos del genbank.....	72

## INTRODUCCIÓN

En la Unidad de Bioprospección del Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), actualmente se desarrolla un proyecto de investigación que se denomina: “Descubrimiento de agentes terapéuticos potenciales a partir de productos naturales de la biodiversidad costarricense”, y uno de los objetivos que contempla el proyecto en mención es, establecer colecciones de microorganismos poco estudiados o explorados de biotopos únicos en Costa Rica, que se consideran como una fuente potencial interesante de productos naturales bioactivos.

Las myxobacterias son un grupo de bacterias pertenecientes a las deltaproteobacterias (Shimkets *et al.*, 2006). Se sabe que poseen un ciclo de vida complejo, y son capaces de vivir en gran cantidad de lugares, se pueden encontrar en el suelo, en excremento animal, y en material vegetal en descomposición o corteza (Reichenbach, 1999; Dawid, 2000; Jiang *et al.*, 2007).

El descubrimiento de que muchas cepas de myxobacterias producen metabolitos secundarios, la mayoría de los cuales son compuestos nuevos, ha provocado un mayor interés en la bioquímica, fisiología y taxonomía de las myxobacterias. (Reichenbach & Höfle, 1993; Reichenbach, 2001; Shimkets *et al.*, 2006). No obstante, la investigación de sus metabolitos se ha visto limitada porque estas bacterias son difíciles de aislar y manejar en laboratorio (Gaspari *et al.*, 2005).

En el país, no se han realizado estudios con este grupo de bacterias, por lo tanto, lo que se pretende con el presente trabajo es evaluar metodologías reportadas en la literatura sobre aislamiento e identificación de myxobacterias, que han sido probados con muestras ambientales de otras partes del mundo, y adaptarlas en esta investigación para aislar myxobacterias de muestras ambientales de Costa Rica.

Por tratarse de un grupo nuevo en el país, es importante la identificación de las cepas aisladas, esto por métodos morfológicos y moleculares, además de la

adecuada preservación de las bacterias obtenidas, para ser utilizadas en estudios posteriores.

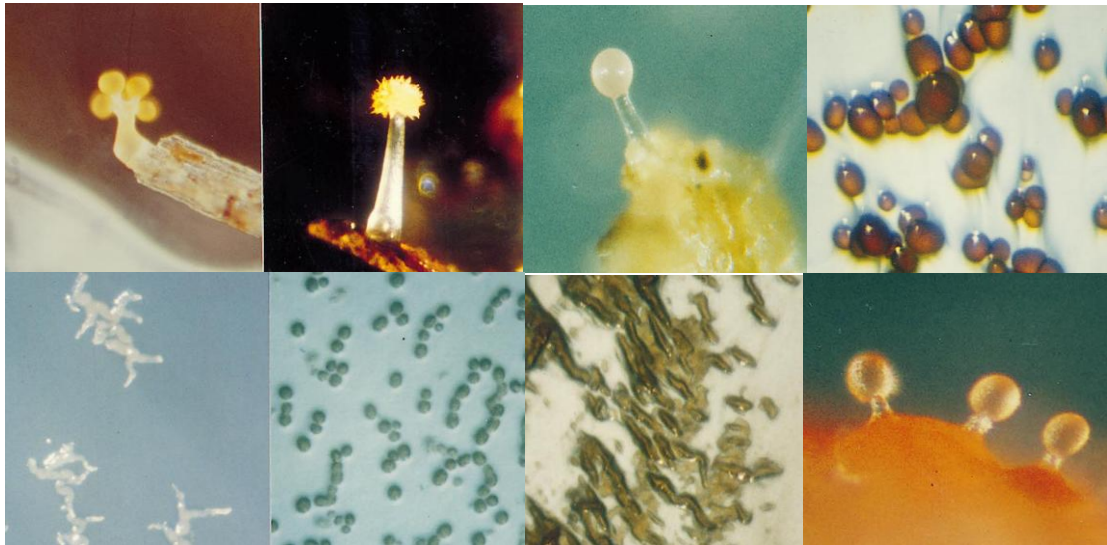
## REVISIÓN DE LITERATURA

### Generalidades

Las myxobacterias son un grupo de bacterias pertenecientes al orden *myxococcales*, de las *deltaproteobacterias* (Shimkets *et al.*, 2006; Miyashita *et al.*, 2008). Estas poseen características muy distintas de los demás procariontes, su ciclo de vida complejo culmina con la formación de cuerpos fructíferos con células de resistencia o myxosporas. Además son encontradas en gran variedad de ambientes (Reichenbach, 1999; Dawid, 2000; Jiang *et al.*, 2007).

Las myxobacterias son gram-negativas, unicelulares, con células vegetativas en forma de bacilos, los cuales son relativamente grandes (0.6–1.2mm de ancho y 3–15mm de largo) (Reichenbach, 1999; Dawid, 2000). Una de las características que las diferencian de otros grupos de bacterias es su movilidad por deslizamiento, desarrollan una colonia o biofilm delgado y translúcido que migra hacia sustancias atrayentes, por medio de señales intercelulares que conducen el movimiento (Dworkin 1996; Gaspari *et al.*, 2005). Además de esto, estas bacterias al encontrarse en condiciones estresantes forman una estructura multicelular llamada cuerpo fructífero, conteniendo  $10^4$ - $10^6$  células individuales (Holt *et al.*, 1994). Estos tienen gran cantidad de formas, y pueden tener colores brillantes y llegar a medir entre 50 y 500  $\mu\text{m}$ , por lo que podrían verse a simple vista (Dawid, 2000). En la figura 1 se observan cuerpos fructíferos de algunos géneros distintos, se observa la variedad de formas y colores que presentan.

En estos cuerpos fructíferos (Fig. 1), las células vegetativas se convierten en myxosporas, las cuales son resistentes a la desecación y le permiten sobrevivir en ambientes desfavorables, como periodos de frío y calor, sequedad, pH ácido o condiciones anóxicas (Dawid, 2000; Shimkets *et al.*, 2006).



**Fig. 1.** Cuerpos fructíferos de myxobacterias. En la parte superior, en orden: *Stigmatella aurantiaca*, *Chondromyces apiculatus*, *Myxococcus stipitatus* y *Cystobacter fuscus*. En la parte inferior, en orden: *Corallocooccus exiguus*, *Angiococcus disciformis*, *Archangium serpens*, y *Melittangium lichenicola* (Dawid, 2000)

Otra característica de este grupo es su actividad depredadora, lisan una variedad de microorganismos como son bacterias, levaduras y hongos (Itzuca *et al.*, 2006), las matan y digieren por medio de la producción de enzimas líticas extracelulares o antibióticos (Sudo & Dworkin 1972; Rosenberg & Dworkin 1996; Gaspari *et al.*, 2005).

Las myxobacterias excretan enzimas hidrolasas, como proteasas y glucanasas, entre otras. Con esto se dice que posiblemente obtengan fácilmente nutrientes descomponiendo las células microbianas o macromoléculas producidas por otros microorganismos en el ambiente. Debido a su actividad depredadora, se apunta que algunos de los metabolitos secundarios posiblemente estén involucrados en matar a sus presas, para después degradarlas con las enzimas liberadas (Itzuca *et al.*, 2006; Bode & Müller, 2006). Los antibióticos inhiben el crecimiento de los organismos presa, y esto los haría más susceptibles a la lisis, liberando su contenido celular, que puede ser degradado por las enzimas (Foster *et al.*, 1992).

Todas las myxobacterias se especializan en la degradación de biomacromoléculas, esto puede ser la explicación para la formación del cuerpo

fructífero. Una comunidad de células es más eficiente en la producción de altos niveles de enzimas extracelulares y es menos sensible a las pérdidas por difusión que una célula individual. De hecho, las myxobacterias son bien conocidas por sus sistemas de comunicación intercelular que ayudan a mantener las células juntas. Las señales intercelulares pueden ser de naturaleza mecánica por ejemplo por medio de pili, o químicos por ejemplo las feromonas (Reichenbach, 2001).

En el biofilm, la comunidad de células vive en una capa común de secreción, y es virtualmente estacionaria. Esto podría explicar por qué las myxobacterias producen tantos antibióticos. Al igual que los actinomicetes que son estacionarios, las myxobacterias no pueden simplemente moverse hacia otro lugar, y son forzadas a defender su nicho contra competidores (Reichenbach, 2001).

El grupo de myxobacterias posee los genomas más largos en comparación con otros grupos de bacterias (9500-10000 kpb) (Reichenbach & Dworkin, 1992; Dworkin & Kaiser, 1993; Dworkin, 1996; Reichenbach, 1999). Como ejemplo, se sabe que el tamaño del genoma de *Myxococcus xanthus* FB es de 9450 kpb (Chen *et al.*, 1990), que dobla el de *Escherichia coli* (4700 kbp) (Shimkets *et al.*, 2006). Su ADN además posee un alto contenido de G+C, de entre 66 y 72% (Reichenbach, 2001).

## **Ecología y distribución**

Las myxobacterias se encuentran prácticamente en cualquier lugar, de la Antártica a los trópicos, y desde el nivel del mar hasta elevadas altitudes, en todos los cinturones de vegetación de bosques tropicales a desiertos. Es posible que no vivan muy bien, en todos estos lugares, y que simplemente hayan sido transportadas a estos ambientes desfavorables y sobrevivido cierto tiempo allí, por lo menos 10 o 20 años según reportes, debido a que sus myxosporas resisten desecación y temperatura. Las floras más ricas en myxobacterias se han encontrado en lugares cálidos, semiáridos (Reichenbach, 1999).



Las myxobacterias viven preferencialmente en lugares que son ricos en materia orgánica y microorganismos (Reichenbach, 2001). El hábitat genuino de estas es el suelo, en el cual están presentes en gran número, varias especies diferentes pueden ser aisladas de una muestra pequeña, lo que sugiere que muchas especies son bastante comunes. Prefieren un suelo que tenga un pH de entre ligeramente ácido y alcalino (5 y 8), lo mas cercano a neutro es mejor, esto se refleja en la práctica de utilizar medios con un pH de 7 para el aislamiento (Reichenbach, 1999; Dawid, 2000). A pesar de esto, se han reportado en suelos ácidos (pH 3,7) y alcalinos (pH 8,0-9,3) (Dawid, 2000). Al preferir un pH neutral o alcalino, las cortezas ácidas, como las de pinos, parecen ser un hábitat no adecuado para el crecimiento de estas bacterias (Gaspari *et al.*, 2005).

Prácticamente, todas las myxobacterias conocidas son estrictamente aerobias, a excepción de *Anaeromyxobacter dehalogenans* (Sanford *et al.*, 2002; Shimkets *et al.*, 2006), y viven en las capas superficiales del suelo. Además del suelo, estas colonizan material vegetal en descomposición, incluyendo madera y corteza de árboles vivos y muertos, líquenes e insectos de igual manera en descomposición, además en excremento, especialmente de ciertos mamíferos herbívoros como conejos salvajes, liebres, ciervos, ovejas y cabras (Reichenbach, 1999).

Las myxobacterias no son un grupo dominante en la comunidad microbiana del suelo (Wu *et al.*, 2005). Existe poca información con respecto a la densidad de las poblaciones de myxobacterias en suelos. En diferentes estudios, en un gramo de suelos distintos, se han contado entre 2000 y 76 000, 80 000 y hasta 450 000 células de myxobacterias (Dawid, 2000). De acuerdo con Dawid (2000), estudios en aislamiento de myxobacterias de 1398 muestras de suelo de 64 países o estados en todos los continentes, de 1 a 10 especies se pueden encontrar en una muestra. Otros estudios pasados refuerzan esto, como el de Reichenbach (1993), en el que indica que los ambientes más ricos en myxobacterias son cálidos y semiáridos, y con 0,5 o 1 gramo de este suelo se podrían encontrar de 5 a 10 especies. Sin embargo estos resultados provienen de técnicas clásicas de

aislamiento, las cuales, sufren de factores limitantes, explicados más adelante (Wu, 2005; Jiang, 2007).

Las especies encontradas en los distintos hábitats varían, esto se demuestra en la cuadro 1, en la cual Shimkets *et al.* (2006) toman en cuenta diversos estudios, y apuntan las especies más típicas de myxobacterias de acuerdo al sustrato, sea suelo, corteza y madera en descomposición, o excremento de herbívoros.

**Cuadro 1.** Especies de myxobacterias más típicas en diferentes sustratos según frecuencia de ocurrencia (Shimkets *et al.*, 2006).

Sustrato	Especies de myxobacterias más típicas
<b>Suelo</b>	<i>Nannocystis exedens</i> , <i>Sorangium cellulosum</i> , <i>Archangium serpens</i> , <i>Coralloccoccus coralloides</i> , <i>Polyangium spp.</i> , <i>Cystobacter spp.</i> , <i>Melittangium spp.</i> , <i>Myxococcus fulvus</i> , <i>Myxococcus virescens</i> , y <i>Myxococcus stipitatus</i> .
<b>Corteza y madera en descomposición</b>	<i>Stigmatella aurantiaca</i> , <i>Chondromyces apiculatus</i> , <i>Sorangium cellulosum</i> , <i>Coralloccoccus coralloides</i> , <i>Myxococcus fulvus</i> , <i>Chondromyces pediculatus</i> , y <i>Haploangium spp.</i>
<b>Excremento de herbívoros</b>	<i>Myxococcus fulvus</i> , <i>Coralloccoccus coralloides</i> , <i>Myxococcus virescens</i> , <i>Cystobacter fuscus</i> , <i>Cystobacter ferrugineus</i> , <i>Archangium serpens</i> , <i>Nannocystis exedens</i> , <i>Cystobacter violaceus</i> , <i>Polyangium spp.</i> , <i>Stigmatella erecta</i> , <i>Myxococcus xanthus</i> , <i>Melittangium spp.</i> , y <i>Cystobacter velatus</i> .

Las myxobacterias son generalmente consideradas como mesofílicas (Dawid, 2000), aunque en la naturaleza, los organismos ciertamente crecen a menores temperaturas y probablemente más lentamente. Muchas cepas son psicrófilicas que crecen, aunque muy lentamente, a temperaturas de entre 4 y 9 °C (Dawid *et al.*, 1988; Reichenbach, 1999; Shimkets *et al.*, 2006).

### **Aislamiento, purificación y preservación**

Las características únicas de estas bacterias son la base no sólo para su taxonomía, sino también para las técnicas de aislamiento (Wu, 2005).

Las estrategias de aislamiento de las myxobacterias usualmente involucran la incubación de muestras naturales en un medio selectivo, con agar, seguido del esparcimiento celular o la formación del cuerpo fructífero; ocasionalmente los cuerpos fructíferos pueden ser recolectados directamente de la naturaleza (Reichenbach & Dworkin, 1992; Dawid, 2000; Jiang *et al.*, 2007).

Las técnicas de aislamiento de myxobacterias se han modificado varias veces, pero todas contemplan la recolección y/o promoción del crecimiento de cuerpos fructíferos. Por esto, se podría decir que el aislamiento basado en morfología ha permitido el descubrimiento de la mayoría de tipos de myxobacterias productoras de cuerpo fructífero (Jiang *et al.*, 2007).

La capacidad bacteriolítica de las myxobacterias se ha utilizado ampliamente durante el enriquecimiento y el aislamiento a partir del suelo y de pelotas de estiércol de animales herbívoros (Dawid, 2000).

La mayoría de las especies de myxobacterias viven por degradación de proteínas e incluso células enteras de otros microorganismos, principalmente bacterias y levaduras, y requieren péptidos y aminoácidos como nutrientes. Existe un grupo de myxobacterias, los miembros del género *Sorangium*, que son degradadores de celulosa. Estas tienen que ser enriquecidas en papel de filtro colocado sobre un agar de sales minerales con  $\text{KNO}_3$  como la única fuente de nitrógeno. Los degradadores de celulosa necesitan más tiempo para su desarrollo. Parches de descomposición de celulosa se puede esperar después de 12-14 días a 30°C (Reichenbach, 2001).

Para el aislamiento de myxobacterias, la técnica que ha sido generalmente más efectiva, es el uso de bacterias como alimento en el medio; en estas condiciones, myxobacterias con cuerpos fructíferos pequeños y discretos, así como, cepas que no forman cuerpos fructíferos del todo, bajo las condiciones de cultivo, son aisladas de manera fiable. Corteza y madera en pudrición incubados en cámara húmeda, en algunos casos, son excelentes fuentes para un aislamiento rápido y confiable de especies de *Stigmatella aurantiaca* y *Chondromyces* (Shimkets *et al.*, 2006). Sin embargo, el estiércol de conejo es una

fuente clásica para el aislamiento de myxobacterias. Cuando se incuban en cámara húmeda a temperatura ambiente o a 30 °C durante un par de días, casi siempre aparecen cuerpos fructíferos en la superficie de algunos estiércoles y esto puede ser utilizado para el aislamiento (Reichenbach & Dworkin, 1992). Como organismos aeróbicos, no es probable que las myxobacterias vivan dentro de los animales. Se sugiere que estas pueden pasar a través de la vía digestiva de los animales (Reichenbach, 1999).

En el proceso de aislamiento, en biofilms o colonias grandes, las células vivas son a menudo sólo encontradas en una banda estrecha a lo largo del borde. Por lo tanto, el inóculo debe ser siempre tomado del borde, por lo menos, mientras no existan cuerpos fructíferos en la zona interior. Muchas myxobacterias del suborden Sorangineae tienden a penetrar profundamente en el agar, en cuyo caso, una tira de agar tiene que ser cortada y usada como inóculo (Shimkets *et al.*, 2006).

Las técnicas de aislamiento clásicas poseen varios factores limitantes: el basarse en la producción de cuerpos fructíferos, la morfogénesis de estos no es un carácter confiable y en muchas condiciones se degeneran o pierden; además de esto, la baja tasa de crecimiento de las myxobacterias hace que sea fácil su contaminación por otras bacterias y hongos de crecimiento más rápido. Por lo tanto, con estas técnicas de aislamiento, fácilmente se pierden cepas de myxobacterias (Wu *et al.*, 2005).

Contaminaciones con organismos eucariotas como amebas de suelo o nematodos, que se mueven activamente y esparcen contaminaciones bacterianas, son muy comunes, incluso a temperaturas elevadas de 42 °C y complican seriamente el aislamiento de myxobacterias. La congelación de las placas de aislamiento durante varios días, para matar los nematodos y la eliminación de amebas de exposición de las placas de enriquecimiento a vapores de amoníaco (Reichenbach & Dworkin, 1992), no son métodos satisfactorios. El uso de levamisole (antihelmíntico y amebicida, para inhibir amebas y nematodos) desde el inicio del proceso de aislamiento, es un nuevo método que ahorra tiempo

para el aislamiento de todo tipo de myxobacterias, sobre todo a partir de muestras de suelo fresco (Gerth & Müller, 2005).

Como es bien conocido, las myxobacterias son problemáticas de manejar en laboratorio, y su purificación no es sencilla (Reichenbach & Höfle, 1993). Como lo menciona Guo (2008) en su estudio, los biofilms o cuerpos fructíferos se podrían descubrir después de 2 a 20 días de inocular el medio, pero el proceso de purificación se vuelve tedioso, y las myxobacterias se contaminan fácilmente con *Mucor*, *Rhizopus*, y *Aspergillus*. Una manera de eliminar contaminantes, es aprovechar que los cuerpos fructíferos no germinan en un medio rico en nutrientes, y se pueden tratar con altas concentraciones de antibióticos como cicloheximida, terramicina y kanamicina. En este medio los cuerpos fructíferos de myxobacterias no germinan y las myxosporas permanecen viables, mientras que los contaminantes si germinan y crecen, por lo que entran en contacto con los antibióticos y mueren. Posterior a esto se deben lavar los cuerpos fructíferos en agua estéril para eliminar los antibióticos y se ponen a crecer en medio nuevo. Se debe tener cuidado porque en algunas colonias que puedan parecer puras después del tratamiento, podrían encontrarse otras colonias contaminantes.

En cultivo, el rango de pH de las myxobacterias es normalmente de 6,8 a 7,8. Las degradadoras de celulosa pueden continuar creciendo a un pH más bajo pero, con un límite de entre 6,0 y 6,4 (Reichenbach, 1999; Dawid, 2000). La tolerancia de estas bacterias a la sal parece ser bastante baja (Reichenbach, 1999).

En laboratorio, el rango de temperatura adecuado para cultivarlas es de 28-34 °C, con tiempos de generación de entre 4 y 14 horas. Varias cepas continúan creciendo a 38–40 °C (Gerth *et al.*, 1994; Reichenbach, 1999), pero los cultivos se vuelven muy inestables a estas altas temperaturas y rápidamente se descomponen y se lisan al final del ciclo de crecimiento. Las células vegetativas mueren a temperaturas más arriba de 45 °C, pero las myxosporas suspendidas en agua toleran 58-60 °C, lo cual puede utilizarse para purificar cepas durante el aislamiento (Reichenbach & Dworkin, 1992).

Todas las myxobacterias, incluidas las degradadoras de celulosa, parece que crecen bien en agar levadura (VY/2). La vitamina B12 se incluye como cianocobalamina en este medio estándar. Normalmente, en agar VY/2, la movilidad por deslizamiento es estimulada considerablemente, y las colonias tienden a ser muy grandes. Los cuerpos fructíferos se forman a menudo, incluso después de varios traslados en agar VY/2, aunque tarde o temprano, la mayoría de las cepas cesan la producción de estos en dicho medio, así como, en la mayoría de los otros medios de cultivo. Los cultivos en agar VY/2 suelen ser bastante estables, y la mayoría de las cepas, no tienen por qué ser transferidas con más frecuencia que cada 2-3 semanas (30 °C). La razón es que, probablemente, el agar VY/2 es relativamente sencillo, los nutrientes son solubilizados sólo de forma gradual, y el pH no cambia mucho. El medio, por lo tanto, es también muy adecuado para cultivos stock (Shimkets *et al.*, 2006).

Otro medio muy útil es el agar CY. En este medio, el crecimiento a menudo es más vigoroso, pero las colonias se dispersan menos y pueden convertirse en algo viscoso y, a menudo, las células mueren antes (después de 1-2 semanas), a causa de la abundante producción de amoníaco. La elección de la peptona para medios de este tipo es crítica (Shimkets *et al.*, 2006).

La preservación, como se menciona, con cuerpos fructíferos es la manera más segura, por la resistencia de las myxosporas, pero los cuerpos fructíferos muchas veces se degeneran o pierden, y además las cepas van perdiendo esta característica al darse las pasadas en medio de cultivo. Por esto se dice que un método muy conveniente para preservar cepas, inclusive las que no produzcan cuerpo fructífero, es con ultra baja temperatura, haciendo un rayado de la bacteria y colocándolo en criotubos que contengan 1ml de medio CAS (Reichenbach & Dworkin, 1992; Shimkets *et al.*, 2006). A este medio se le adiciona 10% de glicerol para proteger las células en el congelamiento.

## Importancia

Los procariotas continúan siendo de gran importancia, para conducirnos en la búsqueda de productos naturales bioactivos con valor medicinal (Krug *et al.*, 2008). Cerca del 80% de todos los metabolitos secundarios activos, son sintetizados por procariotas, y 20% por eucariotas.

Relativamente pocos microorganismos son buenos productores de metabolitos secundarios. Entre las bacterias, éste es el caso principalmente de los *Actinomycetales* (alrededor de 8000 compuestos), el género *Bacillus* (1400 compuestos), y las *Pseudomonas* (400 compuestos). Por lo tanto, se han hecho esfuerzos durante muchos años para descubrir nuevos grupos de productores. Esto ha sido logrado, aunque en muy pocos casos. De hecho, sólo dos nuevos grupos de bacterias se han añadido a los productores ya conocidos desde hace 50 años: las cianobacterias y las myxobacterias. En ambos casos, muchos compuestos totalmente nuevos se han encontrado, algunos de ellos con propiedades y posibilidades de aplicación muy interesantes, y se puede esperar, aún más compuestos de ellos (Reichenbach, 2001).

Las myxobacterias producen gran cantidad de estas moléculas bioactivas con actividad antifúngica, antibiótica, y antitumoral. El potencial biosintético de estas bacterias es muy prometedor: un 50-100% de todas las myxobacterias producen compuestos con actividad biológica (Dawid, 2000).

Gracias a trabajos pioneros de los equipos de investigación de Höfle y Reichenbach del "German Research Center for Biotechnology", las myxobacterias se han vuelto conocidas por ser grandes productoras de metabolitos secundarios interesantes y biológicamente activos. Más de 7500 myxobacterias diferentes se han aislado y gran cantidad de cepas se han analizado químicamente. A partir de esto, más de 100 estructuras nuevas y más de 500 derivados se han descrito. El modo de acción de los productos de myxobacterias es muchas veces inusual, y esto despierta gran interés por la explotación de esta diversidad química (Bode, 2006).

Entre los géneros de myxobacterias productores de metabolitos secundarios, el género *Sorangium* es el más sobresaliente, pues además produce un candidato promisorio como droga anticáncer, con un potencial económico elevado, el epotilon (Lee *et al.*, 2001).

El estudio de estas bacterias tiene gran importancia biotecnológica debido a los compuestos que producen y debido a las características que estas poseen, por lo que podrían tener aplicaciones no conocidas hasta el momento. No obstante, estos microorganismos no se han explotado farmacéuticamente aunque sean una fuente atractiva de nuevos compuestos debido a que su aislamiento consume mucho tiempo y su purificación y mantenimiento es difícil (Gaspari *et al.*, 2005).

### **Taxonomía, identificación y análisis genético**

Las myxobacterias son clasificadas actualmente en tres subórdenes (Sorangineae, Nannocystineae, Cystobacterineae), seis familias, 17 géneros y aproximadamente 50 especies (Reichenbach, 2004; Shimkets *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007).

La identificación y taxonomía de las myxobacterias se basa principalmente en características morfológicas, como la forma y estructura de las células vegetativas, myxosporas, colonias, y cuerpos fructíferos (Holt *et al.*, 1994). (Fig. 2)

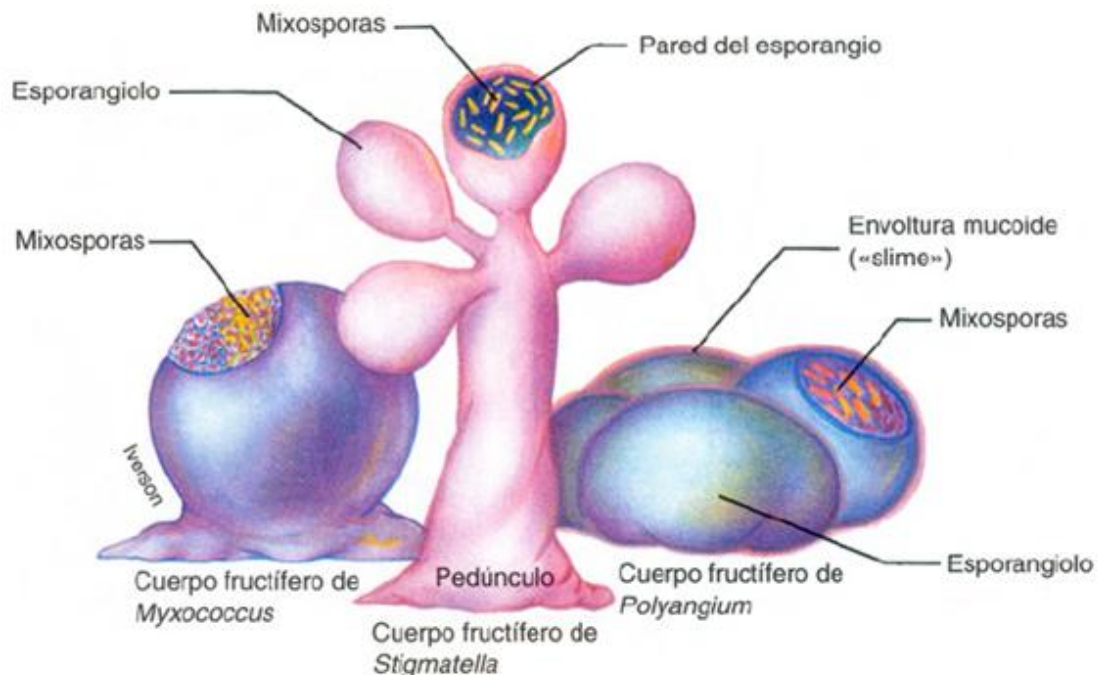
Estas tienen dos características que nos permiten distinguirlas de otras bacterias: su movilidad por desplazamiento y sus cuerpos fructíferos. Las células de estas bacterias se mueven sobre la superficie, y las colonias se esparcen por la placa de cultivo, algunas veces cubriéndola completamente en 6-8 días. Estos biofilms son delgados y translúcidos, lo que los hace a veces difíciles de ver. Aunque la movilidad por desplazamiento se da en muchas otras bacterias, la estructura de los biofilms que forman las myxobacterias es distinguible de los que forman otras bacterias. Con respecto a los cuerpos fructíferos, son únicos y característicos de este grupo (Holt *et al.*, 1994; Reichenbach, 2001). Además, las



myxobacterias presentan coloración usualmente amarilla, naranja, o roja, debida a carotenoides (Holt *et al.*, 1994).

Las células de las myxobacterias se presentan en dos formas básicas: (a) como bacilos delgados, flexibles, con extremos mas o menos puntiagudos (suborden Cystobacterineae), o (b) como bacilos relativamente sólidos, cilíndricos, con extremos redondeados (suborden Sorangineae y Nannocystineae) (Holt *et al.*, 1994; Reichenbach, 2001).

Cuando es posible, la clasificación sistemática de los aislamientos se realiza mediante el análisis de la morfología del cuerpo fructífero y su estructura. La forma y el tamaño, el color y la disposición de las esporangiolas y cuerpos fructíferos son usados como rasgos para la determinación de especies (Fig. 2) (Dawid, 2000). En varios casos, sin embargo, se ha reportado que estos pueden ser atípicos, parecer modificados o degenerados, y no pueden utilizarse para la identificación de las especies en ese caso, lo que puede crear serios problemas para la microbiología determinativa. En este sentido, el análisis del ADNr 16S se utiliza como un medio confiable para determinación de especies y mapeo filogenético (Gerth & Müller, 2005).



**Fig. 2.** Ilustración de la estructura típica de los cuerpos fructíferos de myxobacterias de los géneros *Myxococcus*, *Stigmatella* y *Polyangium* (Shimkets *et al.*, 2006).

En años pasados, estudios del ARNr 16S demostraron que el grupo como tal es filogenéticamente coherente pero puede ser subdividido en dos o tres subordenes, y pertenece a proteobacteria, ramificación delta (Holt *et al.*, 1994).

En la actualidad el uso del ADN para análisis ha llevado a la creación de gran cantidad de programas y herramientas estadísticas y bioinformáticas para análisis de secuencias, alineamientos, análisis filogenético, entre otras funciones. El gen del ARNr 16S es muy utilizado en análisis de bacterias. Este gen tiene aproximadamente 1550 pb de longitud y esta compuesto tanto de regiones variables como conservadas. El gen es suficientemente largo, con suficientes polimorfismos interespecíficos, para proveer datos distintivos y estadísticamente válidos (Clarridge, 2004).

La secuencia del gen ARNr 16S se ha determinado para un gran número de cepas. El Genbank, la base de datos más grande de secuencias de nucleótidos, tiene más de 20 millones de secuencias, de las cuales más de 90.000 corresponden al gen 16S. Esto permite comparar secuencias de cepas desconocidas, contra una gran cantidad de secuencias depositadas. (Clarridge, 2004). Entre las bases de datos más conocidas para este fin se encuentran: GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Ribosomal Database Project (RDP-II) (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>), Ribosomal Database Project European Molecular Biology Laboratory (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>), Smart Gene IDNS (<http://www.smartgene.ch/>), y Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDOM) (<http://www.ridom.com/>).

Entre las herramientas y software que se utilizan para comparar secuencias están: PAUP (Waterman, 1995), BLAST (Altschul, 1990), y Phylip (Phylogeny Inference Package, University of Washington) (Felsenstein, J. 1989).

El alineamiento múltiple de las secuencias se realiza con programas como CLUSTAL X (versión 1.81) (Thompson *et al.*, 1997), o ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Métodos comúnmente utilizados para generar dendrogramas son: el método NJ (neighbor-joining), el UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic averages), y el WPGMA (weighted pair group method with arithmetic

averages) (Waterman, 1995). Para esto se utilizan programas como MEGA (version 3.1; Kumar *et al.*, 2004).

Varias herramientas bioinformáticas se utilizan en la actualidad para evaluar comunidades microbianas. (Martin, 2002; Hughes *et al.*, 2001). Como por ejemplo las librerías basadas en PCR, de secuencias de la región 16S, pueden ser asignadas a jerarquías taxonómicas de acuerdo a bases de datos especializadas o pueden ser agrupadas en unidades taxonómicas operacionales (operational taxonomic units; OTUs) basadas en distancias genéticas (Xu, 2006; Schloss & Handelsman, 2005; Wang *et al.*, 2007). Estas herramientas permiten la caracterización de otros estimadores como miembros (especies en una comunidad), estructura (combinación de miembros y abundancia) entre otros.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar metodologías para el aislamiento e identificación general de myxobacterias a partir de muestras ambientales en Costa Rica.

### **Objetivos específicos**

- Valorar metodologías para el aislamiento de cepas puras a partir de muestras ambientales.
- Identificar las cepas aisladas de myxobacterias por métodos morfológicos y moleculares.
- Establecer una colección de cepas de myxobacterias para estudios posteriores.
- Preservar las cepas de myxobacterias obtenidas.
- Analizar la secuencia 16S de los aislamientos obtenidos a fin de ubicar o determinar la diversidad y la similitud entre ellos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Para las etapas de aislamiento, purificación y preservación, se siguió la metodología recomendada por Shimkets *et al.* (2006), pero se realizaron ciertas modificaciones para optimizar estos procedimientos. Las recetas de todos los medios utilizados se encuentran en anexos.

Todas las etapas de esta investigación se realizaron entre julio y diciembre del 2008, en la unidad de Bioprospección del Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), en Santo Domingo de Heredia.

### **Recolección de muestras**

Los sitios de muestreo fueron seleccionados de acuerdo a las condiciones reportadas como más aptas para el desarrollo de este grupo de bacterias. Se dice que estos ambientes son lugares preferiblemente cálidos, ricos en materia orgánica y microorganismos, y con un pH cercano a neutro. (Reichenbach, 2001). (Ver detalles de las muestras en los anexos).

Se realizaron 2 giras de recolección de muestras, bajo el permiso de recolección R-CM-INbio-30-2007-OT, a cargo de gestión de muestras de la Unidad de Bioprospección del INBio; en la primera realizada el 23 de julio del 2008, se recolectaron 10 muestras en total, del Parque Nacional Braulio Carrillo (sector Quebrada Gonzales) y en la Estación de Bosque Lluvioso del INBio, ambas en Pococí de Limón; en la segunda gira realizada entre el 1 y 2 de setiembre del 2008, se recolectaron 6 muestras, del Parque Nacional Volcán Arenal, en la Fortuna de San Carlos de Alajuela.

De las 16 muestras analizadas (8 muestras de suelo y 8 de material vegetal en descomposición), 5 muestras fueron tomadas del parque Nacional Braulio Carrillo (3 de suelo y 2 de material vegetal en descomposición), 5 de la Estación de Bosque Lluvioso del INBio (2 de suelo y 3 de material vegetal en descomposición) y 6 muestras se tomaron del Parque Nacional Volcán Arenal (3 de suelo y 3 de materia vegetal en descomposición). La temperatura de las

muestras, al momento de recolección, tuvo un rango de entre 22,2 y 29,3 °C, con un pH de entre 6,2 y 6,9.

Las muestras de suelo se tomaron de los centímetros superficiales (aproximadamente 3 o 5 cm), en áreas de suelo cercano a una planta. Se tomaron unos 200 o 300 gramos aproximadamente. Para las muestras de material vegetal en descomposición, se tomó corteza o madera en descomposición, de especies de árboles que tienen bajo contenido de resinas y compuestos taninos, porque se reporta que no son buenas fuentes para aislamiento de myxobacterias (Shimkets *et al.*, 2006).

Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno, debidamente rotuladas con su código de colecta, y se mantuvieron a temperatura ambiente para ser transportadas al laboratorio. Una vez allí, todas las muestras fueron secadas en bandejas sobre papel toalla, en un cuarto a temperatura ambiente (entre 18,2 y 26,1 °C), durante una semana aproximadamente, y luego se almacenaron en bolsas de papel.

Se realizaron también 2 giras para recolectar el excremento necesario para el método de aislamiento de suelo con estiércol. Como se reporta, las myxobacterias se encuentran en excremento de herbívoros silvestres, por lo cual en la primera gira realizada el 31 de julio del 2008, se recolectó estiércol de Danta. Se realizó una segunda gira el 3 de setiembre del 2008, en la cual se recolectó estiércol de conejo, reportado como el más efectivo para el aislamiento de myxobacterias (Shimkets *et al.*, 2006). Los excrementos fueron llevados en bolsas ziploc de polietileno, y se mantuvieron a temperatura ambiente al transportarse al laboratorio. Allí, los excrementos fueron autoclavados 30 minutos y puestos a secar en la estufa a 45°C, para ser utilizados en condiciones estériles.

### **Métodos de aislamiento**

Se utilizaron tres metodologías de aislamiento para muestras de suelo, y una para madera y corteza. De cada metodología se montaron tres repeticiones por muestra.

En las metodologías de aislamiento de suelo, en el caso de WCX con *E. coli*, y ST21CX con papel de celulosa, no se encontraron reportes sobre el uso de antibiótico para tratar el suelo, sino sólo antibiótico en el medio, por lo que se probó de esta manera. Posteriormente, se probó tratar el suelo con una concentración de 0,08 mg/ml, reportada para la metodología de aislamiento directo a partir de material vegetal en descomposición (Gaspari *et al.*, 2005; Shimkets *et al.*, 2006), luego se probó con 0,1 mg/ml, reportados para tratar el suelo en la metodología de suelo con excremento (Gaspari *et al.*, 2005), y por último se probó con 0,25 mg/ml de cicloheximida. En la metodología de suelo con excremento de conejo, se reportaba una concentración de cicloheximida de 0,1 mg/ml para tratar el suelo, la cual se probó primeramente, y luego se probó con 0,25 mg/ml.

Cuatro métodos de aislamiento se utilizaron:

1. Muestras de corteza y madera:

- a. Aislamiento directo en cámara húmeda: Se tomaron las muestras de madera o corteza en descomposición, y se sumergieron en agua destilada con cicloheximida (0,08 mg/ml) por unas 3 horas aproximadamente. Posteriormente, se eliminó el agua con cicloheximida por decantación, y se pusieron las muestras en envases plásticos con papel toalla humedecido con agua estéril. Estas cámaras húmedas se incubaron en un cuarto a temperatura ambiente (entre 18,2 y 26,1 °C) y se observaron al estereoscopio en busca de cuerpos fructíferos. (Fig. 3. a.)

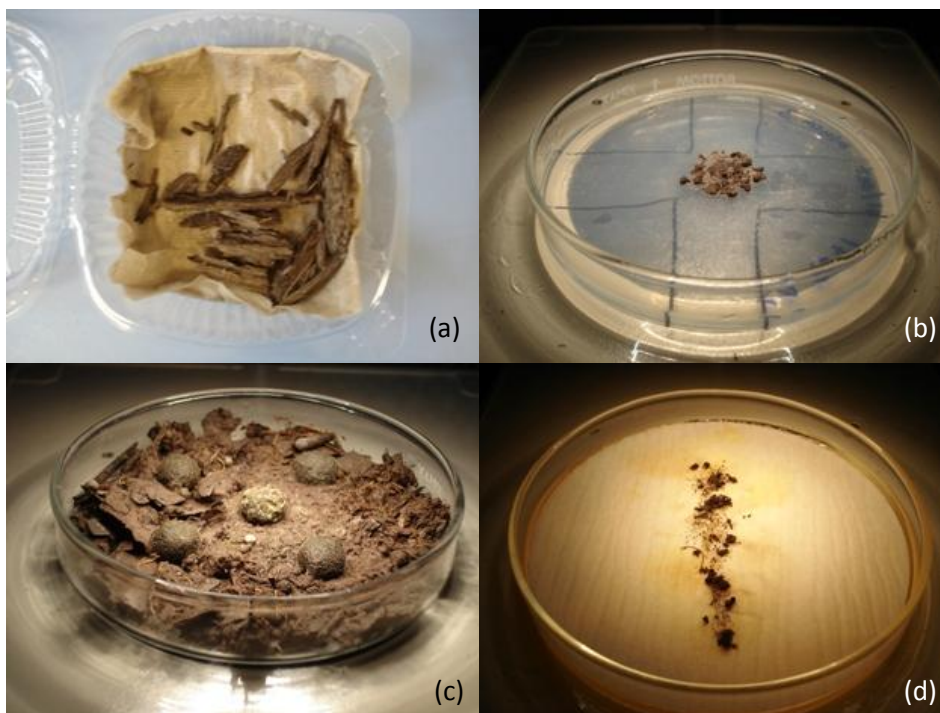
2. Muestras de suelo:

- a. Aislamiento en WCX con *E. coli*: Se tomó un cultivo de *E. coli* (cepa ATCC 25922, preservada en la cepoteca del INBio) crecido en caldo, este se centrifugó y se eliminó el medio líquido dejando solo el pellet de bacterias, el cual se resuspendió en agua estéril. Posteriormente, se inoculó la suspensión de *E. coli* en el medio WCX, en forma de cruz (100 µl/placa). Las muestras de suelo se

trataron antes de inocularse, con cicloheximida (0,25 mg/ml) durante unas 3 horas aproximadamente. En la placa, el centro de la cruz de *E. coli* se inoculó con una muestra de suelo del tamaño de un guisante. Se incubaron las placas a 28 °C, con una humedad entre 45 y 62% aproximadamente, y se observaron al estereoscopio ubicado en la cámara de flujo laminar, en busca de biofilms o cuerpos fructíferos. (Fig. 3. b.)

- b. Aislamiento de suelo con excremento: Las muestras de suelo se trataron antes de inocularse, con cicloheximida (0,25 mg/ml) durante unas 3 horas aproximadamente. La cicloheximida se eliminó por decantación y se llenaron las placas de petri con el suelo humedecido. En cada placa se colocaron cinco excrementos de conejo autoclavados y secados, estos se enterraron parcialmente en la muestra de suelo. Estas placas se incubaron a 28 °C, con una humedad entre 45 y 62% aproximadamente, y se examinaron para determinar la presencia de cuerpos fructíferos, utilizando un estereoscopio ubicado en la cámara de flujo laminar. (Fig. 3. c.)
- c. Aislamiento en ST21CX con papel de celulosa: Se llenaron placas con medio ST21CX (25 mg/l de cicloheximida), y sobre el agar se colocan papeles de celulosa. Las muestras de suelo se trataron antes de inocularse, con cicloheximida (0,25 mg/ml) durante unas 3 horas aproximadamente. El papel filtro se inoculó en el centro con una muestra de suelo del tamaño de un guisante, formando una línea. Estas placas se incubaron a 28 °C (con una humedad entre 45 y 62% aproximadamente) y se examinaron en busca de cuerpos fructíferos con el estereoscopio. (Fig. 3. d.)





**Fig. 3.** Ejemplos de los métodos de aislamiento utilizados. (a) Cámara húmeda, (b) WCX con *E. coli*, (c) Suelo con excremento (d) ST21CX con papel de celulosa.

En todos los métodos, se buscaba la producción de cuerpos fructíferos. A partir de la fecha de siembra, se estuvieron revisando las muestras por un período de 30-45 días. Al revisar las muestras de los distintos métodos de aislamiento, se extrajeron los cuerpos fructíferos que se consideraban distintos, por diferencias morfológicas, por su forma y color, y por diferencias en el sitio de muestreo. Cuando se observaron lo que se pensaba eran cuerpos fructíferos, se tomaron con una aguja estéril, y se pasaron a placas de medio CY.

### **Métodos de purificación**

Se utilizó la purificación directa, pasando los cuerpos fructíferos, o las orillas de los biofilms a nuevas placas con medio CY. Se les hizo una prueba de pureza, utilizando el medio líquido CEH, en el cual las myxobacterias puras crecen en agregados, o no crecen, viéndose el caldo sin turbiedad, lo cual indica que no hay contaminación; en caso de estar contaminado el caldo se presenta turbio (Zhang *et al.*, 2003). Al comprobarse la pureza, se pasaron a nuevas placas de medio CY,

del cual se realizó posteriormente la descripción de la cepa y se tomó material para preservar, y medio VY/2, que se mantenía como de stock. En caso contrario, se volvía a tomar de la orilla del biofilm para pasar a una nueva placa CY, y entonces se repetía la prueba de pureza.

A las myxobacterias que estaban muy contaminadas, se les realizó una segunda purificación, estas se pasaron a WCX con *E. coli* o a medio agar agua con cristal violeta, y luego se pasaron de la orilla de la colonia a CY.

### **Preservación**

Se tomaron las myxobacterias puras de una placa de medio CY, que tuviera entre 10 y 15 días de crecimiento, realizando un raspado del biofilm, que se transfirió a crioviales que contenían 1 ml de medio CAS con 10% glicerol, que se colocaron directamente a -80 °C. Estas cepas se pueden almacenar por 8-10 años.

### **Identificación morfológica**

Esta se realizó para comprobar que los aislamientos fueran myxobacterias. Se determinó que estas bacterias formen un biofilm translucido característico de este grupo, que presenten un crecimiento en conglomerados al ponerse a crecer en caldo, y que sus células fueran los característicos bacilos gram negativos de entre 3 y 12  $\mu\text{m}$  (Reichenbach, 2001). Además se observó la forma de las células vegetativas y los cuerpos fructíferos de los cuales se aisló, y con esto identificar el suborden al cual pertenecen las cepas.

### **Identificación molecular**

A las 20 cepas identificadas como myxobacterias según sus características, se les llevó a cabo una identificación molecular.

## **Extracción de ADN, PCR y secuenciación**

Primeramente, las 20 cepas se pusieron a crecer en medio CY, a 28°C por 8-10 días, poniendo 2 placas por cepa. Se llevó a cabo una extracción de ADN con el kit “GenElute™ Bacterial genomic DNA Kit” (Sigma-Aldrich Co., MO, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se hizo una separación de las proteínas utilizando cloroformo, antes de adherir el ADN a la columna. La extracción se confirmó con una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Posteriormente, a los extractos de ADN genómico, se les realizó una amplificación de la región 16S por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), esto utilizando los imprimadores 27F y 1492R, como se describió anteriormente (Mazza *et al.*, 2003; Itzuca *et al.*, 2006; Monciardini *et al.*, 2008). La mezcla de reacción fue la siguiente: 5x green GoTaq® Flexi buffer de Promega (10µl), MgCl<sub>2</sub> (2,5µl; 3 mmol/l), DMSO (2,5µl; 5%), dNTP`s (1µl), imprimadores (1,5µl c/u; 0,1 µmol/l), ADN (2µl), ADN polimerasa GoTaq® Flexi de Promega (0,3µl) y agua (28,7µl). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador “GeneAmp PCR system 9700” (Applied Biosystems, CA, USA) con un primer paso a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 51°C por 1 minuto y 72°C por 1:15 minuto, y una extensión adicional por 5 minutos a 72°C. La amplificación se confirmó con una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Los productos de PCR se limpiaron utilizando el kit “GenElute™ PCR Clean-Up Kit” (Sigma-Aldrich Co., MO, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se enviaron a secuenciar estos a “Dana-Farber, Cancer Research Center”, en la Universidad de Harvard, en Boston, Massachusetts, utilizando los imprimadores con los que se amplificó (27F, 1492R), más los imprimadores 785F y 802R (Meerak *et al.*, 2008). Estas secuencias se analizaron y editaron con los programas DNAbaser y Bioedit (Hall, 1999).

Se utilizaron como control en clasificación filogenética y en el análisis dos cepas de myxobacterias enviadas del DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures), las cuales correspondían a *Myxococcus xanthus* (DSM 6796) y *Sorangium cellulosum* (DSM 14627). Por esto también se les hizo extracción de ADN, amplificación y secuenciación del 16S.

### **Clasificación filogenética y análisis**

Las 22 secuencias obtenidas (20 cepas aisladas y 2 cepas del DSMZ) se compararon con la base de datos del GenBank, utilizando la herramienta BLAST (Altschul *et al.*, 1990) y con la del Ribosomal Database Project II, utilizando la herramienta de clasificación (<http://rdp.cme.msu.edu>). Esto asignó las secuencias de ADNr 16S a una jerarquía taxonómica basada en un clasificador “naïve Bayesian” de ARNr con un intervalo de confianza del 95% (Wang *et al.*, 2007).

Las secuencias se alinearon con el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) y se optimizaron manualmente. El alineamiento se procesó con el programa DNADIST de PHYLIP (<http://evolution.genetics.washington.edu>) para generar una matriz de distancia, la cual se utilizó como archivo de entrada para DOTUR (<http://www.plantpath.wisc.edu>). Este programa agrupó las secuencias en unidades taxonómicas operacionales (OTUs) de acuerdo a diferentes porcentajes de similitud de secuencias (Schloss & Handelsman, 2005). En este estudio se comparó el estándar de 97%, con el 98% y 99%, para distinguir entre especies diferentes de bacterias, donde se dice que 2 secuencias con una similitud mayor a 97%, 98% o 99%, se asignan al mismo OTU (de acuerdo al porcentaje) y por consiguiente son la misma especie (Stackebrandt & Goebel, 1994). Una vez que DOTUR asignó las secuencias a OTUs, fue posible calcular el número de OTUs observado en las cepas aisladas.

Además, con la alineación realizada con el programa ClustalW, se construyó un árbol filogenético usando el método “neighbour-joining, Tamura-Nei” del programa MEGA. (Version 3.1; Kumar *et al.*, 2004). La solidez de las ramificaciones

individuales se estimó con un bootstrap de 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985). La secuencia de la región 16S de la cepa del DSMZ, *Sorangium cellulosum* (DSM 14627), se utilizó como outgroup para ramificar el árbol.

Por último se realizó una comparación de las especies obtenidas del análisis molecular, analizando los cuerpos fructíferos y las colonias en placa CY, de cepas de la misma especie, para observar la relación de las especies con su morfología.

## RESULTADOS

Con respecto al método de suelo con estiércol, al probar con estiércol de danta no se obtuvo resultados, por lo que se probó con estiércol de conejo, el cual permitió el crecimiento de las myxobacterias.

En cuanto a los métodos de WCX con *E. coli*, y ST21CX con papel de celulosa, no se encontraron reportes sobre el uso de antibiótico para tratar el suelo, sino solo antibiótico en el medio, pero al probarse de esta manera, se contaminaban las placas muy rápido con hongos, y no daban tiempo a las myxobacterias de salir, por lo que hubo que tratar el suelo con el antibiótico cicloheximida previo a la siembra. Se probaron las concentraciones 0,08 mg/ml, 0,1 mg/ml las cuales no fueron suficiente, pero al probar con 0,25 mg/ml, esta permitió la obtención de myxobacterias.

En el caso de la metodología de suelo con estiércol, se reportaba una concentración de antibiótico de 0,1 mg/ml, la cual no fue efectiva, y al probar con 0,25 mg/ml, esta permitió la obtención de myxobacterias.

Se obtuvo 19 cepas puras de bacterias que cumplieron las características morfológicas de myxobacterias, a partir de 8 muestras de suelo y 8 muestras de materia vegetal en descomposición. Estas presentaron: crecimiento expansivo, un biofilm translucido, y en caldo CEH crecieron como agregados. Al realizar una tinción de gram a las cepas, todas ellas fueron gram negativas, y sus bacilos eran de entre 2 y 15  $\mu\text{m}$ . Además, las 19 cepas presentaron sus bacilos en forma alargada, siendo las células flexibles y puntiagudas, lo que es característico de las myxobacterias del suborden Cystobacterineae.

De estas 19 cepas aisladas, solo 2 fueron obtenidas de las muestras de material vegetal en descomposición, y las restantes 17 se obtuvo de muestras de suelo (89,5%), por lo que se determinó que es más efectivo utilizar muestras de suelo para el aislamiento de bacterias de este grupo.

De las 17 cepas obtenidas de muestras de suelo, de los 3 métodos utilizados, el más productivo fue la utilización del medio WCX con *E. coli* (11 cepas), seguido por el suelo con excrementos de conejo (4 cepas), y el método de ST21CX con papel de celulosa obtuvo la menor cantidad, junto con las cámaras húmedas con material vegetal en descomposición (Cuadro 2). Todas las cepas obtenidas fueron purificadas de manera directa, y en algunas casos, pasándolas pocas veces tomando de la orilla del biofilm; las cepas muy contaminadas se probó purificarlas utilizando el medio WCX con *E. coli* o el medio WCX con cristal de violeta, pero estas no se lograron purificar.

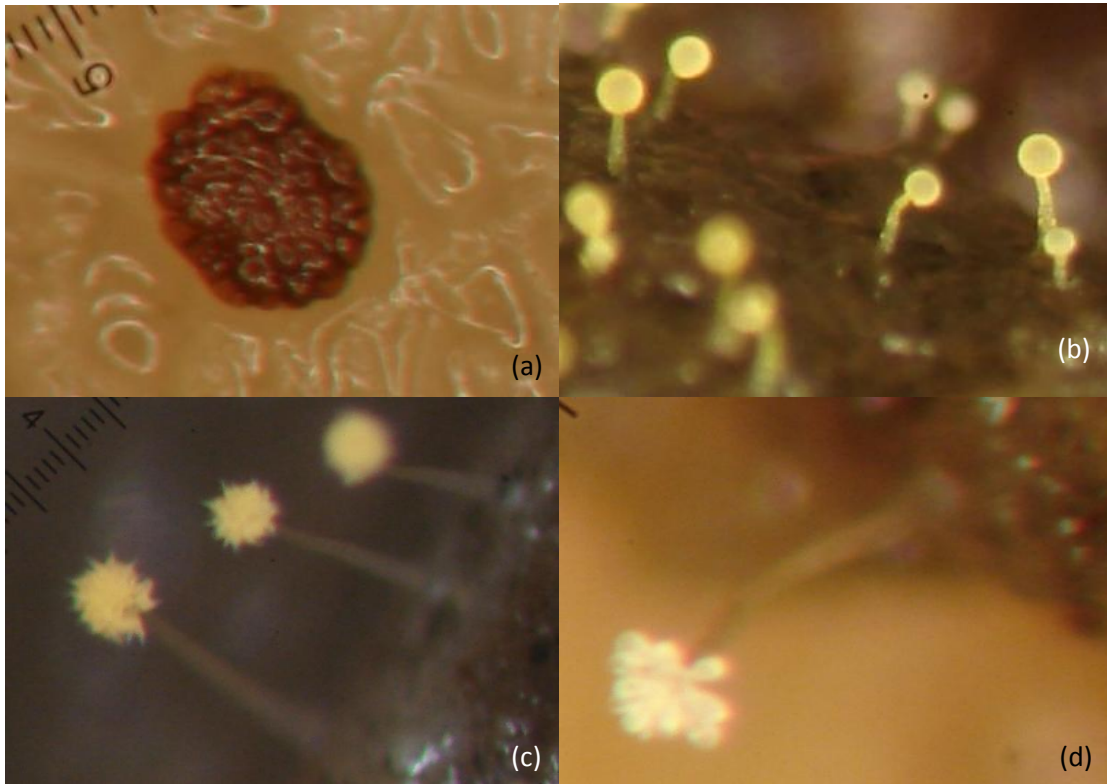
En la figura 4 se observan algunos cuerpos fructíferos de myxobacterias que no se lograron purificar. La imagen (a), se asemeja a los cuerpos fructíferos del género *Polyangium* o *Sorangium*, la imagen (b) se asemeja a los cuerpos fructíferos del género *Myxococcus*, y las imágenes (c) y (d) se asemejan a cuerpos fructíferos del género *Chondromyces*.

**Cuadro 2.** Distribución de las myxobacterias aisladas según tipo de muestra origen y método de aislamiento utilizado.

Tipo de muestras	Método de aislamiento	Número de cepas puras	Porcentaje
Suelo	Suelo con estiércol de conejo	4	21,1%
	WCX con <i>E. coli</i>	11	57,9%
	ST21CX con Papel de celulosa	2	10,5%
Madera o corteza	Cámara húmeda	2	10,5%

A estas 19 cepas, se les realizó una extracción de ADN, pero con el kit se tuvieron problemas con las columnas de extracción, por lo que se agregó un paso antes de adherir el ADN a la columna, en el cual se separaron las proteínas utilizando cloroformo. Para la amplificación por PCR del ADNr 16S, primeramente se probó una mezcla de reacción sin utilizar DMSO, con lo cual solo amplificó un 20% de las muestras, por lo cual se adicionó este, logrando amplificar todas las muestras.

El ADN amplificado se envió a secuenciar, y las secuencias se compararon contra la base de datos del genbank y el RDP II, el resultado de esto asignó todos los aislamientos al suborden Cystobacterineae, lo que coincidió con la morfología celular, esto confirma que pertenecen a este suborden.



**Fig. 4.** Cuerpos fructíferos de algunas myxobacterias que no se lograron purificar en cultivo. (a) Cuerpo fructífero en papel de celulosa, (b) Cuerpos fructíferos en estiércol de conejo, (c) y (d) Cuerpos fructíferos en material vegetal en descomposición.

Del los 19 aislamientos, el género mayoritario fue el *Myxococcus*, seguido del *Coralloccoccus*, y por último el género *Cystobacter*. Además, la mayoría de *Myxococcus* obtenidos, se aislaron por el método de *E. coli* en el medio, y posteriormente por los métodos de suelo con estiércol y de cámara húmeda con material vegetal en descomposición; ninguno se obtuvo con el método de ST21CX con papel de celulosa (Cuadro 3).



Con respecto al género *Coralloccoccus*, la mayoría fueron obtenidos con el método de WCX con *E. coli*, seguido de los métodos de suelo con estiércol y de ST21CX con papel de celulosa; ninguno se obtuvo con el método de cámara húmeda con material vegetal en descomposición (Cuadro 3).

En cuanto al género *Cystobacter*, los aislamientos fueron obtenidos por los métodos de suelo con estiércol y de ST21CX con papel de celulosa en igual número. Esto evidencia que aunque la mayor cantidad de aislamientos se obtuvo del medio WCX con *E. coli*, la mayor variabilidad se obtuvo del método de suelo con estiércol de conejo, obteniéndose 3 géneros distintos de myxobacterias (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Géneros de myxobacterias aislados por los diferentes métodos de aislamiento.

Género	Suelo con estiércol de conejo	WCX con <i>E. coli</i>	ST21CX con papel de celulosa	Cámara húmeda	Total
<i>Myxococcus</i>	2	5		2	9
<i>Coralloccoccus</i>	1	6	1		8
<i>Cystobacter</i>	1		1		2

De acuerdo a la clasificación taxonómica, según las bases de datos utilizadas, de los 8 *Coralloccoccus* obtenidos, 4 de ellos se clasifican como *Coralloccoccus exiguus*, 3 como *Coralloccoccus coralloides*, y 1 no se pudo clasificar en cuanto a especie. Con respecto a los 9 *Myxococcus* aislados, se clasificaron 6 de ellos como *Myxococcus stipitatus*, y los restantes 3 no se pudieron clasificar a nivel de especie. Por último, al analizar los 2 *Cystobacter* obtenidos, 1 se clasificó como *Cystobacter ferrugineus*, y el otro no se pudo clasificar a nivel de especie (Cuadro 4).

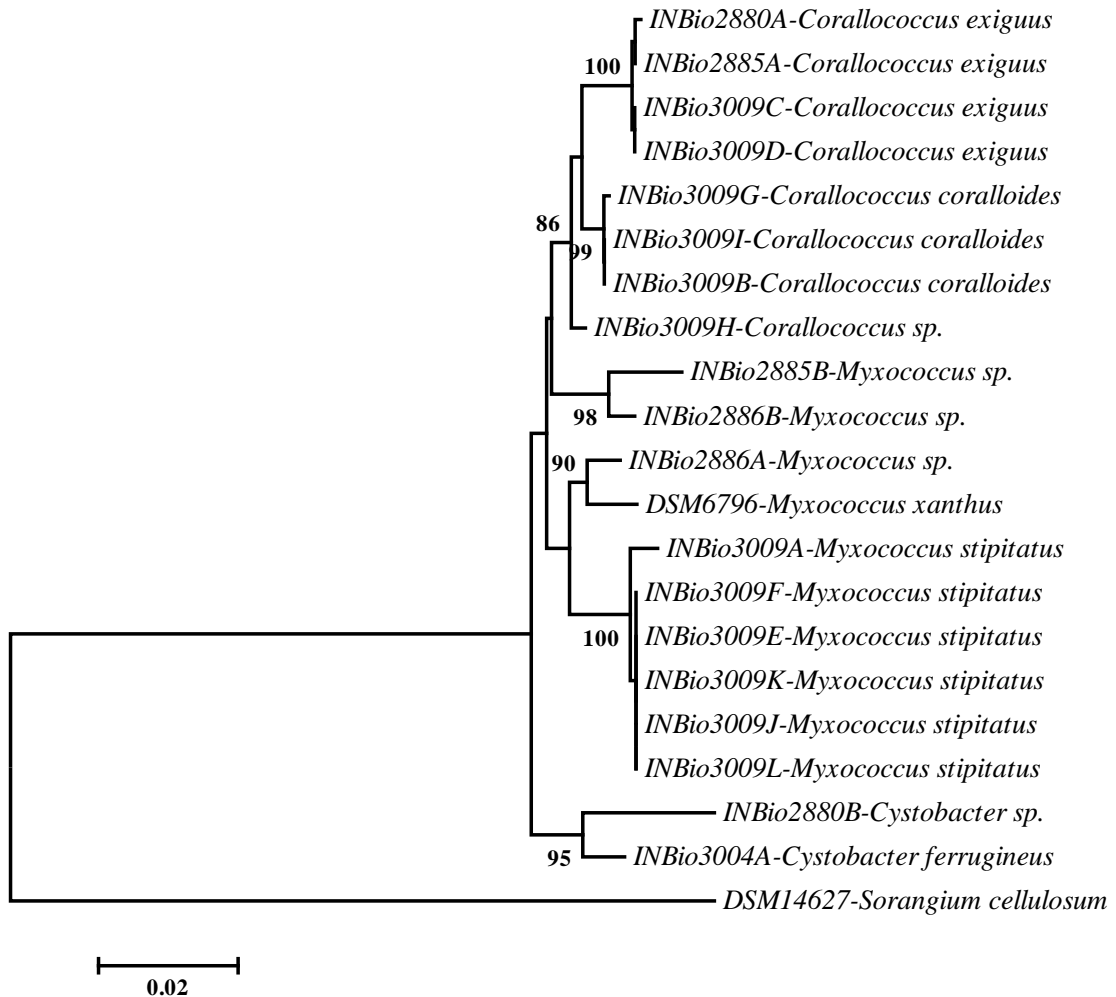
**Cuadro 4.** Taxonomía completa de las myxobacterias obtenidas de los distintos métodos de aislamiento.

Suborden	Familia	Género	Especie	Código de aislamiento	Total	Método de aislamiento	
Cystobacterineae	Myxococcaceae	<i>Coralloccoccus</i>	<i>exiguus</i>	3009C	4	WCX con <i>E. coli</i>	
				3009D		"	
				2880A		"	
				2885A		"	
		<i>coralloides</i>	3009B	3	"		
			3009G		"		
			3009I		ST21CX con papel de celulosa		
		<i>Myxococcus</i>	<i>stipitatus</i>	sp.	3009H	1	Suelo con estiércol de conejo
				3009A	6	WCX con <i>E. coli</i>	
				3009E		"	
				3009J		"	
				3009K		"	
				3009F		"	
				3009L		Suelo con estiércol de conejo	
				sp.	2885B	3	"
				2886A	Cámara húmeda		
2886B	"						
Cystobacteraceae	<i>Cystobacter</i>	<i>ferrugineus</i>	3004A	1	Suelo con estiércol de conejo		
			sp.	2880B	1	ST21CX con papel de celulosa	

Al ejecutar un alineamiento y realizar un árbol filogenético, incluyendo las secuencias de las 2 cepas del DSMZ, en este se observa una clara separación de todos los aislamientos con respecto a la cepa DSM 14627 (*Sorangium cellulosum*), ya que esta pertenece al suborden Sorangineae, mientras que los aislamientos pertenecen al suborden Cystobacterineae. Además de esto, se observa la ramificación de los aislamientos diferenciando géneros y especies, lo que confirma los resultados obtenidos de las bases de datos. Algunas de estas ramificaciones son soportadas por un bootstrap de más de 80%, lo que refuerza su validez. (Fig. 5).

Se observa que los 4 *Coralloccoccus exiguus* se agruparon juntos, separándose de los 3 *Coralloccoccus coralloides* con un bootstrap de 59%. Se observa también que se agruparon los 6 *Myxococcus stipitatus*, dato soportado con un bootstrap de 78%. También se determina que uno de los aislamientos de *Myxococcus* que no se pudo clasificar, se agrupó con la cepa del DSMZ, clasificada como *Myxococcus xanthus*. Se debe apuntar también que se observa en el árbol claramente, como

se separan los aislamientos del género *Cystobacter* de los otros 2 géneros (Fig. 5).



**Fig. 5.** Relaciones filogenéticas de las myxobacterias aisladas y determinadas con la región 16S con el método NJ-TN y un bootstrap de 1000 repeticiones. (Programa MEGA)

Al observar el análisis de distancia genética entre los aislamientos (incluyendo las 2 cepas del DSMZ), se advierte que los aislamientos son muy cercanos genéticamente. Al analizar los aislamientos agrupados por OTUs, en un 97% de similitud, se separa el DSM 14627(*Sorangium cellulosum*) de todos los aislamientos, y entre estos, separa los del género *Cystobacter* de los demás, estando en un solo grupo los géneros *Myxococcus* y *Corallocooccus*. Con esto se

observa la cercanía genética que tienen las bacterias de este grupo, no lográndose separar por géneros al 97%, que es un porcentaje mas bien utilizado como estándar para separar especies (Cuadro 5).

Al analizar los aislamientos agrupados en OTUs, con un 98% de similitud, se observa que separa los aislamientos del género *Coralloccoccus* de los demás, pero no separa las especies de este género, lo que evidencia que las especies de este género tienen una cercanía genética mayor a 98%. Se observa también, que los aislamientos 2885B y 2886B, clasificados como *Myxococcus*, se separan de los demás *Myxococcus*, lo que sugiere que estas son especies distintas a los demás, que en su mayoría son *Myxococcus stipitatus*. Además, la cepa DSM 6796, clasificada como *Myxococcus xanthus*, no se separa al 98% de los aislamientos clasificados como *Myxococcus stipitatus*, lo que sugiere gran cercanía genética entre estas 2 especies. En este porcentaje tampoco se separan las 2 cepas pertenecientes al género *Cystobacter*, por lo que se dice que estas especies tienen una cercanía genética mayor al 98% (Cuadro 5).

Al analizar los aislamientos agrupados en el mismo OTU al 99%, se observa que en el caso de los pertenecientes al género *Coralloccoccus*, no se separaron tampoco sus especies con este porcentaje, por lo que se puede decir que las especies de este género tienen una cercanía genética mayor al 99%. Con respecto al género *Myxococcus*, con este porcentaje se agrupan por separado los aislamientos que corresponden a *Myxococcus stipitatus*. El aislamiento 2886A, en este porcentaje se agrupa con la cepa control DSM 6796, que corresponde a *Myxococcus xanthus*, por lo que ese aislamiento es una especie muy relacionada, o la misma especie que la cepa del DSMZ. Con respecto a los aislamientos 2885B y 2886B, estos se agruparon por separado, lo que hace pensar que sean especies cercanas, o aun la misma especie del género *Myxococcus*. Al observar los 2 aislamientos correspondientes al género *Cystobacter*, se puede ver que estos se separaron con este porcentaje, lo que determina que estas especies tienen una cercanía genética de entre 98 y 99% (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Número de OTUs en los aislamientos utilizando porcentajes distintos de similitud

Porcentaje de similitud	Numero de OTUs	Código de cepas agrupadas por OTUs
97%	3	-2886A,DSM6796,3009A,3009F,3009K,3009J,3009L,3009E,2880A,2885A,3009C,3009D,3009G,3009I,3009B,3009H,2885B,2886B -2880B,3004A -DSM14627
98%	5	-2886A,DSM6796,3009A,3009F,3009K,3009J,3009L,3009E -2880A,2885A,3009C,3009D,3009G,3009I,3009B,3009H -2885B,2886B -2880B,3004A -DSM14627
99%	7	-2886A,DSM6796 -2880A,2885A,3009C,3009D,3009G,3009I,3009B,3009H -3009A,3009F,3009K,3009J,3009L,3009E -2885B,2886B -2880B -3004A -DSM14627

Comparando la morfología de los cuerpos fructíferos de los cuales se realizaron los aislamientos, se observa que esta es muy variable, y las myxobacterias de la misma especie de acuerdo al análisis molecular del 16S, no necesariamente tienen cuerpos fructíferos iguales. En el caso de los aislamientos clasificados como *Coralloccoccus exiguus*, se observa que los cuerpos fructíferos de estos, varían mucho en cuanto a su tamaño y su color, aunque todos fueron aislados del mismo medio (WCX con *E. coli*), midiendo entre 10 y 30  $\mu\text{m}$  2 de ellos (INBio2880A y INBio2885A), y entre 100 y 200 los otros 2 (INBio3009C y INBio3009D), y se observa que la coloración del aislamiento 3009D, es de un naranja fuerte, diferente de los otros 3 aislamientos de esta especie (Fig. 6 (a), (b), (c) y (d)).

Con respecto a los aislamientos clasificados como *Coralloccoccus coralloides*, la morfología de los cuerpos fructíferos de estos es bastante similar. Estos 3 aislamientos (INBio3009G, INBio3009I, INBio3009B) tienen un tamaño similar,

que esta entre 70 y 150  $\mu\text{m}$  aproximadamente. El color y la forma de estos cuerpos fructíferos es bastante similar (Fig. 6 (e), (f) y (g)).

En cuanto al aislamiento INBio3009H, clasificado como *Corallococcus* sp., presenta un cuerpo fructífero con una forma muy similar a los cuerpos fructíferos de los aislamientos clasificados como *Corallococcus coralloides*, pero con una coloración ligeramente más amarillenta. El tamaño de los cuerpos fructíferos de este aislamiento está entre 40 y 100  $\mu\text{m}$  aproximadamente (Fig. 6 (h)).

Cuando se observan los cuerpos fructíferos de los aislamientos INBio2885B, INBio2886B e INBio2886A, clasificados como *Myxococcus* sp., estos varían mucho en cuanto a su morfología. Los 2 primeros, son más cercanos genéticamente, pero morfológicamente difieren más, en cambio el INBio2886B y el INBio2886A aunque son más distantes genéticamente son morfológicamente similares. El aislamiento INBio2885B, tiene un pie largo a la base del cuerpo fructífero, presenta una coloración distinta a los otros 2 aislamientos, y su tamaño es de 200 o 250  $\mu\text{m}$  aproximadamente. Los otros 2 aislamientos, presentan una morfología similar, tienen un tamaño de unos 100  $\mu\text{m}$  aproximadamente, y su coloración si difiere (Fig. 6 (i), (j) y (k)).

Al analizar los cuerpos fructíferos de los aislamientos clasificados como *Myxococcus stipitatus*, estos presentan una morfología muy similar, a excepción de 2 de ellos. Su coloración es de un naranja fuerte, y tienen un pie largo a la base del cuerpo fructífero, además su tamaño es de entre 100 y 200  $\mu\text{m}$ . En contraste, los cuerpos fructíferos de los cuales se aislaron las myxobacterias INBio3009J e INBio3009K, presentan una coloración amarillenta, distinta a los demás, y presentan un pie más corto a la base del cuerpo fructífero. Su tamaño es similar, de un poco más de 100  $\mu\text{m}$  (Fig. 6 (l), (m), (n), (o) y (p)).

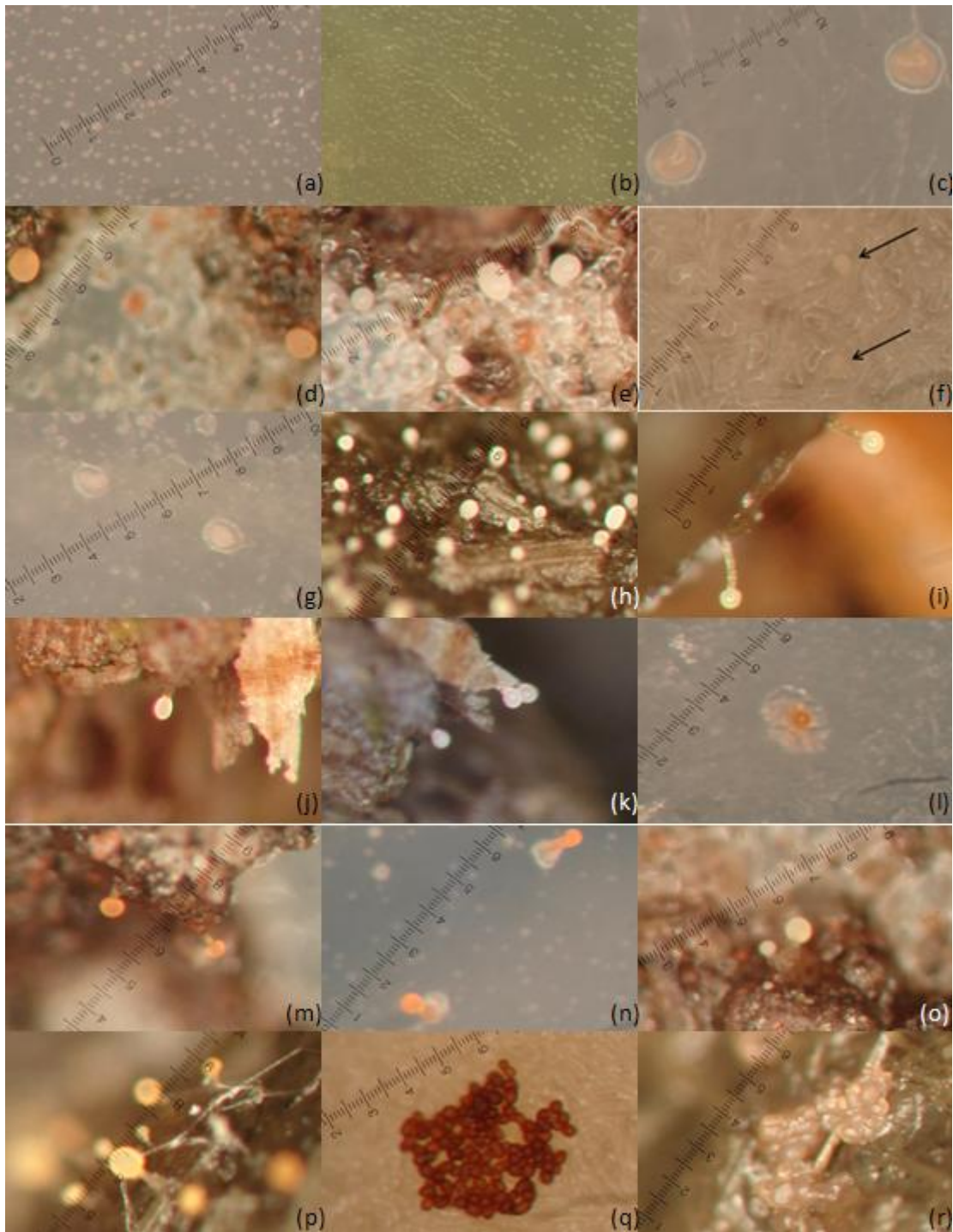
Por último, al observar los cuerpos fructíferos de los 2 aislamientos del género *Cystobacter*, se observa que estos difieren en su morfología. La cepa INBio3004A, identificada como *Cystobacter ferrugineus* presenta cuerpos fructíferos con una morfología irregular, que difiere de los cuerpos fructíferos de la cepa INBio2880B, además ambos difieren en cuanto a su coloración. El tamaño

de los cuerpos fructíferos de ambos es similar, midiendo entre 40 y 50  $\mu\text{m}$ , y además ambos tienen sus cuerpos fructíferos en grupos (Fig. 6 (q) y (r)).

Cuando se compara la morfología de las colonias en la placa de medio CY, se observa que en su mayoría tienen una morfología similar, y que esta es constante con la especie, ya que los miembros de la misma especie tienen una colonia similar, la excepción a esto es la cepa INBio3009D. Entre los aislamientos de los géneros *Myxococcus* y *Coralloccoccus*, no difieren mucho en su morfología, solo presentan cambios en la coloración, pero en general son muy similares. La cepa INBio3009D, también difiere en su cuerpo fructífero con los demás aislamientos de la especie *Coralloccoccus exiguus*, y presenta una morfología en la colonia, similar a los aislamientos clasificados como *Myxococcus stipitatus*, que difiere de los demás aislamientos de su especie. Todos los aislamientos clasificados como *Myxococcus stipitatus*, presentaron cuerpos fructíferos en la placa, y todos los demás aislamientos no los produjeron, a excepción del INBio3009D.

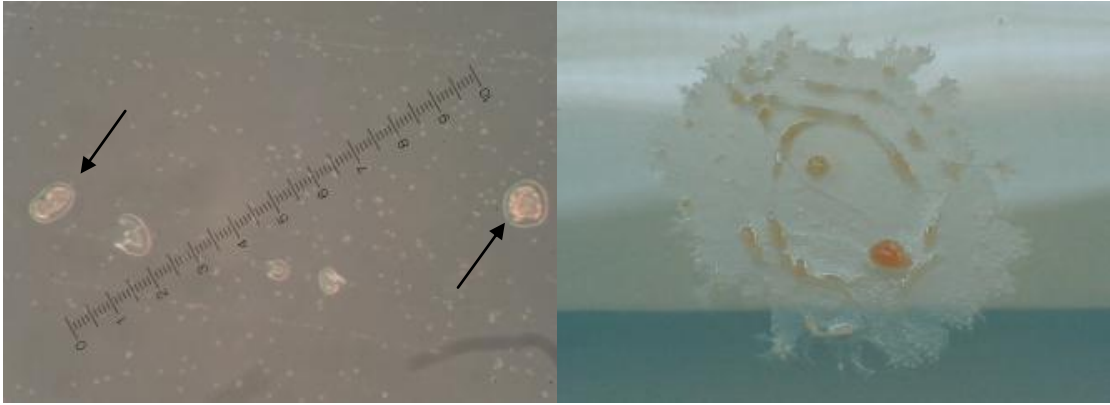
Los 2 aislamientos pertenecientes al género *Cystobacter*, tienen una morfología en la colonia bastante distinta a los demás aislamientos, en cuanto a su textura, y además presentan un crecimiento irregular, y todos los demás aislamientos crecen con una forma circular bastante uniforme.

Uno de los aislamientos, el 3007A, según características morfológicas pareció ser myxobacteria. Este se aisló de una estructura que parecía ser un cuerpo fructífero (con un tamaño de unos 100  $\mu\text{m}$  aproximadamente), presentaba un crecimiento expansivo formando un biofilm translucido, y en caldo CEH creció formando agregados. Al realizarle una tinción de gram, esta dio gram negativo, y sus bacilos eran de entre 2 y 3  $\mu\text{m}$ , presentando una morfología similar a las células de myxobacterias de los subórdenes Sorangineae y Nannocystineae, con bacilos sólidos y cilíndricos. Este fue aislado con el medio WCX con *E. coli*. Al enviarse a secuenciar la región 16S y compararse con las bases de datos del genbank y RDP II, se obtuvo que esta era perteneciente a la clase Chloroflexi, orden Herpetosiphonales, familia Herpetosiphonaceae, género *Herpetosiphon*, que es un grupo muy alejado de las myxobacterias (Fig. 7).



**Fig. 6.** Cuerpos fructíferos de los cuales se realizaron los aislamientos. (a) INBio2880A (*Corallocooccus exiguus*). (b) INBio2885A (*Corallocooccus exiguus*). (c) INBio3009C (*Corallocooccus exiguus*). (d) INBio3009D (*Corallocooccus exiguus*). (e) INBio3009G (*Corallocooccus coralloides*). (f) INBio3009I (*Corallocooccus coralloides*). (g) INBio3009B (*Corallocooccus coralloides*). (h) INBio3009H (*Corallocooccus* sp.). (i) INBio2885B (*Myxococcus* sp.). (j) INBio2886B (*Myxococcus* sp.). (k) INBio2886A (*Myxococcus* sp.). (l) INBio3009A (*Myxococcus stipitatus*). (m) INBio3009F (*Myxococcus stipitatus*). (n) INBio3009E (*Myxococcus stipitatus*). (o) INBio3009J y INBio3009K (*Myxococcus stipitatus*). (p) INBio3009L (*Myxococcus stipitatus*). (q) INBio2880B (*Cystobacter* sp.). (r) INBio3004A (*Cystobacter ferrugineus*).





**Fig. 7.** Estructura de la cual se aisló *Herpetosiphon* sp. y morfología de la colonia (aislamiento 3007A).

## DISCUSIÓN

Al comparar los resultados obtenidos por los distintos métodos de aislamiento, se observa que 89,5% de los aislamientos se obtuvo con las muestras de suelo, y tan solo un 10,5% con muestras de material vegetal en descomposición. Comparando las metodologías individualmente, se observa que los resultados difieren a los obtenidos en otro estudio, realizado por Gaspari *et al.* (2005), en el cual se dice que la mayor cantidad de aislamientos se obtuvo utilizando el estiércol de conejo, seguido por el método utilizando *E. coli*, y por último, las degradadoras de celulosa. También este estudio dice que el método de cámara húmeda con material vegetal en descomposición fue altamente efectivo, aislando una cantidad mayor de myxobacterias que el método que utiliza *E. coli*. Se debe aclarar que en el estudio de Gaspari *et al.* (2005), se utilizaron 48 muestras de suelo y 45 de material vegetal en descomposición para el aislamiento, en cambio en el presente estudio se utilizaron 8 muestras de suelo y 8 de material vegetal en descomposición, por lo que los resultados de esta investigación son más preliminares y esto podría explicar la variación vista en cuanto a la efectividad de cada metodología de aislamiento.

Otra posible causa para explicar esto, es que esta se deba a la diversidad de myxobacterias, ya que esta varía dependiendo del lugar del mundo, y el ambiente, como lo apunta Wolfgang (2000), el cual estudió la diversidad de estas bacterias en muestras de diversos lugares del mundo. Al haber variación en las especies según el lugar, se podría decir que las especies encontradas en este estudio en Israel van a diferir con las especies encontradas en Costa Rica, y además como lo menciona Shimkets *et al.* (2006), las especies aisladas más fácilmente varían según el método utilizado, con lo que se podría decir que las especies encontradas en las muestras tomadas en este estudio, eran más fáciles de aislar mediante el uso de *E. coli* en el medio.

Se debe apuntar también, que en el estudio realizado por Gaspari *et al.* (2005), obtuvo alta efectividad en el método que utiliza material vegetal en descomposición, en cámara húmeda, y en este caso no se obtuvo buenos

resultados, esto posiblemente, porque la temperatura utilizada en el estudio mencionado anteriormente fue de 32°C, y en el caso de la presente investigación, las cámaras húmedas fueron puestas a temperatura ambiente. Como lo menciona Shimkets *et al.* (2006), en este método de aislamiento, las cámaras húmedas se pueden incubar a temperatura ambiente, o a 30°C, pero ellos encontraron que a temperatura ambiente, el crecimiento de myxobacterias se vuelve más lento, y el crecimiento de moho y hongos, tiende a dispersarse más rápidamente. Por esto se dice que posiblemente por tener las cámaras húmedas a temperatura ambiente, el número de myxobacterias aisladas fue bajo.

En cuanto al método de aislamiento utilizando suelo con estiércol autoclavado, este fue el que obtuvo la segunda mayor cantidad de aislamientos, lo que no concuerda con el estudio realizado por Gaspari *et al.* (2005), que dice que este fue el método más efectivo para el aislamiento. Hay otros estudios que reportan el uso de estiércol, como el realizado por Zhang *et al.* (2003), que dice que este es muy efectivo, debido a que este estimula la formación de los cuerpos fructíferos, y se reporta que es efectivo para la mayoría de myxobacterias, pero especialmente para las bacteriolíticas.

Se dice que las células vegetativas migran hacia los excrementos de conejo, los colonizan, y después forman sus cuerpos fructíferos. Esto probablemente se deba a que, los ingredientes del estiércol de conejo estéril, son similares a los sustratos naturales de las myxobacterias. El uso de esta fuente de nutrientes estimula que formen sus cuerpos fructíferos, y con esto se facilita su identificación y aislamiento (Zhang *et al.*, 2003; Shimkets *et al.*, 2006). El número de aislamientos obtenidos con este método, fue menor en el caso de esta investigación al obtenido con *E. coli*, pero su efectividad fue bastante alta. En este caso se debe aclarar que el número de repeticiones por muestra en el método de suelo con estiércol de conejo, no fue 3 en el caso de todas las muestras de suelo, como si lo fue en el método que utiliza *E. coli*, por lo que al haber menos placas para aislamiento en un método que en el otro, esto pudo haber provocado una variación en la efectividad de los métodos.

Se debe resaltar también, que según Shimkets *et al.* (2006), el estiércol es altamente efectivo para el aislamiento de estas bacterias, pero se menciona que la técnica generalmente más efectiva es el uso de *E. coli*, que permite aislar myxobacterias con cuerpos fructíferos muy pequeños, o inmersos en el agar, o inclusive algunas cepas que no los produzcan en cultivo.

Con respecto al método que utiliza papel de celulosa, al comparar con el estudio realizado por Gaspari *et al.* (2005), este menciona que fue el método con el que obtuvo menor efectividad, y en la presente investigación, también fue el método por el cual se obtuvo la cantidad de aislamientos mas baja (junto con las cámaras húmedas de material vegetal en descomposición). Esto podría deberse como lo menciona Gaspari *et al.* (2005), a que las especies degradadoras de celulosa, fueran escasas en el suelo utilizado para el aislamiento. Además de esto, se sabe que la purificación en el caso de este método, es más compleja, debido a que se forman parches de degradación de celulosa, los cuales contienen gran cantidad de cuerpos fructíferos, pero además de esto, contienen una mezcla compleja de otras bacterias, de protozoarios, y nematodos, lo que hace que la purificación de estas myxobacterias sea muy complejo.

También se menciona, que las myxobacterias degradadoras de celulosa tardan un mayor tiempo en crecer y poder ser reconocidas en el medio de cultivo, y esto provoca que probablemente, otras bacterias y hongos de crecimiento más rápido, limiten la aparición de estas myxobacterias (Shimkets *et al.*, 2006).

Cuando se analizan los géneros aislados en este estudio, determinados de acuerdo al análisis molecular del 16S, se tiene que la mayoría pertenecían al género *Myxococcus* y al género *Coralloccoccus*, y en menor cantidad al género *Cystobacter*. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Gaspari *et al.* (2005), el cual menciona que la mayor parte de sus aislamientos pertenecían al género *Myxococcus*. Seguido de este, se menciona el género *Coralloccoccus*, que es un género muy cercano al *Myxococcus*, y posteriormente el género *Archangium*. Se menciona también que obtuvo muy pocos *Stigmatella* puros, y con respecto a los subórdenes Sorangineae y Nannocystineae, sólo se obtuvo un *Chondromyces* puro. Los resultados obtenidos en el presente estudio

probablemente se deban a que, como lo mencionan Reichenbach (1983) y Shimkets *et al.* (2006), con los miembros de los géneros *Myxococcus* y *Corallococcus*, la purificación no es un problema serio, pero con otros géneros, como *Cystobacter*, *Stigmatella*, *Archangium*, *Melittangium*, o las degradadoras de celulosa *Sorangium*, la purificación es un proceso extremadamente tedioso y dificultoso por la cantidad de tiempo que conlleva. Esto se explica debido a que estos organismos, o producen una capa de baba endurecida, en la cual los contaminantes quedan atrapados y protegidos, o crecen tan lentamente que los contaminantes tienen amplio tiempo para multiplicarse y dispersarse por la colonia de myxobacterias. Se sabe que los cuerpos fructíferos del género *Nannocystis* se encuentran profundos dentro del agar, y esto hace que sean difíciles de aislar. La purificación tomando cuerpos fructíferos directamente, funciona muy bien con cepas de *Myxococcus*.

Cabe mencionar también, que se reporta que las especies del suborden Cystobacterineae se observan primero en los cultivos, mientras que las de Sorangineae se observan después, esta es otra posible razón por la que los aislamientos de la presente investigación, pertenecieran al suborden Cystobacterineae (Gaspari *et al.*, 2005).

Comparando los cuatro métodos de aislamiento, en cuanto a la variedad aislada con cada uno, se observa que el método que utiliza estiércol de conejo fue el que permitió mayor variabilidad. Con el método que utiliza *E. coli*, y el método que utiliza el medio ST21CX con papel de celulosa, se obtuvo 2 géneros distintos, y con el método de cámara húmeda utilizando material vegetal en descomposición, se obtuvo la menor variabilidad (1 género). Con respecto a esto, no se reporta cual método permite aislar mayor variabilidad, sino que se menciona que con el método que utiliza *E. coli*, utilizando 3 placas para una muestra, es suficiente para permitir aislar la mayoría de los tipos de myxobacterias presentes en la muestra, a excepción de las degradadoras de celulosa. Se menciona también por Shimkets *et al.* (2006), que con el método que utiliza estiércol, se aíslan gran variedad de myxobacterias, y que inclusive se podrían llegar a observar degradadoras de celulosa. Con respecto al método de papel de celulosa, si se menciona que con

este no se aísla tanta diversidad, pero este método es el mejor para aislar las myxobacterias degradadoras de celulosa. El método de cámaras húmedas, permite aislar diferentes myxobacterias a las aisladas con los otros métodos, debido a que el sustrato para aislar es material vegetal en descomposición, y este promueve la aparición de myxobacterias de especies diferentes a las que aparecen en el suelo, aunque se menciona que en este aparecen gran cantidad de *Myxococcus* y *Corallocooccus*, las cuales aparecen en el suelo también mayormente (Shimkets *et al.*, 2006). Para obtener la mayor diversidad de myxobacterias, no existe un método que permite aislar todos los tipos, sino que se deben llevar a cabo preferiblemente, varios métodos que permitan obtener con cada uno una variedad distinta de myxobacterias, y con esto obtener una gran diversidad.

El método de aislamiento que utiliza *E. coli* en medio WCX, no suprime el crecimiento de otros tipos de bacterias que se muevan por deslizamiento, como las tipo *Cytophaga*, *flexibacter*, *Taxeobacter*, o *Herpetosiphon*, las cuales pueden aislarse con este método (Shimkets *et al.*, 2006). En el presente estudio se evidencia esto mencionado anteriormente, ya que uno de los aislamientos que pareció ser una myxobacteria, al realizar el análisis de su secuencia 16S, se determinó que esta era una bacteria del género *Herpetosiphon*, y esta se obtuvo con el método que utiliza *E. coli*. Este tipo de bacteria, al crecer en medio que permita su crecimiento, forma un biofilm, el cual en ciertas ocasiones puede producir conglomerados grandes, como lo mencionan Lee & Reichenbach (2006), los cuales son bastante impresionantes, y se han reportado en aislamientos de estudios anteriores. El diámetro de estas estructuras varia, rondando entre 200  $\mu\text{m}$  y 2000  $\mu\text{m}$ , y como se ha notado repetidamente, estos se parecen de gran manera, a los cuerpos fructíferos de las myxobacterias, sobre todo porque a menudo son de color rojo brillante o naranja, y además su tamaño normalmente esta en el rango del tamaño de los cuerpos fructíferos. Por esto, posiblemente se podría dar confusión al pensar que esta sea una myxobacteria, a la hora de realizar el aislamiento, lo que se evidencia con los resultados del presente estudio, esto lo afirman Lee & Reichenbach (2006), ya que se menciona que

Reichenbach a obtenido gran cantidad de aislamientos del género *Herpetosiphon*, en investigaciones de aislamiento de myxobacterias.

La poca diversidad de géneros obtenida en el presente estudio, obteniéndose myxobacterias de 3 géneros de los 17 reportados (Reichenbach, 2004; Shimkets *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007), pone en evidencia lo que menciona Gaspari *et al.* (2005), que este grupo de bacterias tiene un crecimiento lento, por lo que son enmascaradas por bacterias y hongos de crecimiento más rápido, y la recuperación en cultivos puros a partir de los aislamientos es el paso de menor rendimiento. Además el estudio de Gaspari *et al.* (2005), se obtuvo solamente 5 géneros, estos resultados son similares a los obtenidos en la presente investigación, lo que confirma que la purificación es crítica, ya que no sólo reduce el rendimiento de aislamiento, sino que limita la diversidad de los aislamientos obtenidos.

Se debe rescatar también, que el proceso para aislamiento de estas bacterias consume mucho tiempo, como lo ha reportado Zhang *et al.* (2003), que mencionan que en un período de unos 12 meses se logran aislar normalmente solo unas pocas cepas puras. Como lo apuntan Shimkets *et al.* (2006), obtener una cepa pura toma usualmente de 3 a 6 semanas. Por esto se debe resaltar que en este estudio se lograron aislar 19 cepas puras de myxobacterias en un período de unos 3 meses, lo que representa un tiempo corto en comparación con lo que se reporta.

Con respecto a la producción de metabolitos secundarios en los 3 géneros aislados en el presente estudio, se ha reportado por Krug *et al.* (2008) que especies de *Myxococcus* como *M. xanthus* producen gran cantidad de compuestos como el antibiótico myxovirescin, y Reichenbach (2001) ha reportado en *M. virescens*, que esta produce 20 tipos diferentes de myxovirescin. También se ha reportado por Reichenbach (2001) que *M. stipitatus* produce compuestos que interaccionan con el citoesqueleto de células eucariotas, como el rhizopodin.

En cuanto al género *Cystobacter*, Gerth & Müller (2005) han reportado la producción de stigmatellin, un inhibidor de la cadena respiratoria. Además, Foster

*et al.* (1992) han reportado que un 29% de las myxobacterias de suelo, incluyendo *Corallocooccus*, *Cystobacter* y *Myxococcus*, tienen actividad antifúngica. Por esto mencionado anteriormente, se dice que las myxobacterias aisladas en esta investigación deben estudiarse para determinar la producción de metabolitos secundarios, ya que tienen una posibilidad promisoriosa.

Como lo mencionan Miyashita *et al.* (2008), La identificación basada solamente en la morfología es muy difícil, por lo cual se complementó este estudio con una identificación por medio del análisis del gen 16S.

Al observar el árbol filogenético realizado con el alineamiento de las secuencias de los aislamientos, y comparar este árbol con el análisis de distancia genética entre los aislamientos (incluyendo las 2 cepas del DSMZ), se puede observar que las distancias genéticas entre los miembros de este grupo son mínimas. Como lo mencionan Stackebrandt y Goebel (1994), el estándar de semejanza genética utilizado para separar entre especies es de 97%, pero como se observa en el caso de este estudio, este porcentaje no permite la separación de especies de este grupo, y ni siquiera permite la separación de géneros. Se observa que una semejanza del 98%, tampoco sirve para separación de especies, pero este porcentaje podría ser utilizado para separación de géneros, aunque en este estudio se observa que con este porcentaje separó algunas especies del mismo género, por lo que podría decirse que un porcentaje de entre 97 y 98% permite la separación de géneros de myxobacterias. Se observa además que con un 99% de semejanza, se logran separar especies en algunos géneros, pero en otros esto no se logra. Al observar los resultados obtenidos por Spröer *et al.* (1999), se observa que con respecto al género *Myxococcus*, las ramificaciones obtenidas se dieron con un valor de identidad de cerca de 98,2%, pero estas ramificaciones no dividían claramente las especies del género, por lo que se puede decir que las diferencias tan sutiles en las secuencias del ADNr 16S, no permiten una separación confiable de las especies. Los resultados de la presente investigación también concuerdan con los obtenidos por Spröer *et al.* (1999), con respecto al género *Corallocooccus*, debido a que se observa que este se separó de miembros del género *Myxococcus*, con un valor de identidad de entre 97 y 98% del ADNr



16S. Con respecto al género *Cystobacter*, se dice que 2 de las especies de este género, *Cystobacter ferrugineus* y *Cystobacter fuscus*, se interrelacionan filogenéticamente con un porcentaje de identidad sobre 99,4%. En la presente investigación, los 2 aislamientos clasificados como *Cystobacter*, se separaron con un porcentaje de entre 98 y 99%, por lo que se podía decir que la que no se logro determinar su especie, probablemente no sea *Cystobacter fuscus*, ya que no tiene una identidad tan alta con *Cystobacter ferrugineus*.

Cabe mencionar que, como lo apunta Spröer *et al.* (1999), que este grupo de bacterias tienen una identidad alta del ADNr 16S, y en ciertos casos se deben usar inclusive porcentajes mayores a 98% para separar tan solo géneros, como es el caso de los géneros *Melittangium* y *Cystobacter*, los cuales son géneros muy relacionados, y se separaron al 98,2%. Para separar especies no se tiene mucha claridad, y en algunos casos las especies de un mismo género pueden tener una identidad superior a 99,4%, lo que no permite separar especies de manera confiable. Probablemente para tener mayor claridad se deban llevar a cabo estudios filogenéticos tomando en cuenta otros genes, además del 16S.

Cuando se observan los cuerpos fructíferos de los cuales se obtuvo los aislamientos, y se comparan con su taxonomía según las bases de datos, se observa que en muchos casos, los cuerpos fructíferos de cepas de la misma especie son muy diferentes. Esto como lo explican Miyashita *et al.* (2008), se debe a que la forma y estructura de los cuerpos fructíferos ocasionalmente varia dependiendo de las condiciones del cultivo, y como lo mencionan Gerth y Müller (2005), en algunos casos pueden ser atípicos, parecer modificados o degenerados, y no pueden utilizarse para la identificación de las especies en ese caso. Como lo señalan Spröer *et al.* (1999), los cuerpos fructíferos ocasionalmente cambian de forma durante el cultivo, y se ha observado por ejemplo que miembros de géneros como *Stigmatella*, *Cystobacter* y *Melittangium*, pueden producir cuerpos fructíferos tipo *Archangium*. Estos cambios producidos llevan en ciertos casos a una clasificación errónea, inclusive para especialistas con experiencia.

Para diferenciar entre especies, normalmente se utilizan criterios morfológicos como la forma y tamaño de las myxoesporas, la forma y color de los cuerpos fructíferos, y la producción de pigmentos (Reichenbach & Dworkin, 1992; Miyashita *et al.*, 2008). Pero la discriminación de cada especie es muy difícil porque estas características se solapan en algunas especies de varios géneros de myxobacterias. Además de esto, las diferencias observadas en las colonias crecidas en medio, que pertenecían a la misma especie, probablemente se deban a que, como lo menciona Spröer *et al.* (1999), la mayoría de las myxobacterias pierden fácilmente, en condiciones de laboratorio, características taxonómicas importantes, como la pigmentación y la producción de cuerpos fructíferos. Esto causa problemas en la clasificación, que se vuelve muy difícil.

## CONCLUSIONES

- Es posible aislar cepas puras de myxobacteria a partir de muestras ambientales en Costa Rica
- Se tuvieron que utilizar concentraciones de cicloheximida mayores a las reportadas en los distintos métodos de aislamiento para retardar el crecimiento de los contaminantes para permitir la aparición de myxobacterias en las muestras analizadas.
- El estiércol de Danta autoclavado no representa un buen sustrato para el aislamiento de myxobacterias de suelo.
- Los métodos mas efectivos para el aislamiento de myxobacterias en muestras de Costa Rica son el suelo con estiércol de conejo autoclavado y el medio WCX con *E. coli*.
- Todas las myxobacterias aisladas pertenecen al suborden Cystobacterineae. Estas crecen más rápidamente que las de los otros subórdenes y se aíslan y purifican más fácilmente.
- La purificación es un paso crucial y muy difícil con algunos tipos de myxobacterias lo que limita la diversidad de los aislamientos.
- La identificación por medios morfológicos es muy difícil y en ciertos casos puede llevar a errores de clasificación por cambios sufridos por las cepas en cultivo.
- Las myxobacterias son muy similares genéticamente en cuanto al ADNr 16S, por lo que diferenciar especies por medio de análisis de distancia de este gen no es confiable; debe complementarse con identificación morfológica e investigar de otros genes que puedan ayudar a diferenciar especies.
- Los cuerpos fructíferos y la morfología de la colonia en cepas de la misma especie (identificadas por las bases de datos) difieren, lo que lleva a repetición de especies aisladas.
- El método que utiliza WCX con *E. coli* permite aislar algunas otras bacterias que se mueven por deslizamiento y se podrían confundir con myxobacterias.

- Se debe incluir DMSO (dimetil sulfoxido) para amplificar por medio de PCR una región del ADN de las myxobacterias, porque estas bacterias tienen alto contenido de G y C en su ADN.

## RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio de las cepas aisladas tanto de los metabolitos secundarios como en bioensayos.
- Probar el método de cámara húmeda con material vegetal en descomposición incubando a 28-30°C.
- Realizar más pruebas de purificación en myxobacterias difíciles de purificar, como las degradadoras de celulosa.
- Combinar los métodos de cámara húmeda, de suelo con papel de celulosa, y alguno de los otros 2 utilizados en muestras de suelo ya que se obtienen diferentes géneros con cada uno de estos y así lograr la mayor diversidad posible.
- Realizar estudios de filogenia para este grupo con otros genes.

## BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., & Lipman, D. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215:729–731.
- Bode, H., & Müller, R. 2006. Analysis of myxobacterial secondary metabolism goes molecular. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33: 577–588.
- Clarridge, J. 2004. Impact of 16S rRNA Gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microb. Rev.* 17: 840–862
- Dawid, W., 2000. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 403–427.
- Dworkin, M. 1996. Recent advances in the social and developmental biology of myxobacteria. *Microb. Rev.* 60: 70–102.
- Dworkin, M., & Kaiser, D., eds. 1993. *Myxobacteria II*. Washington DC: American Society for Microbiology Press.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* 39: 783–791.
- Felsenstein, J. 1989. PHYLIP—phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics.* 5:164–166.
- Foster, H., Yasouri, F., & Daoud, N. 1992. Antibiotic activity of soil myxobacteria and its ecological implications. *FEMS Microbiol. Ecol.* 101: 27-32
- Gaspari, F., Paitan, Y., Mainini, M., Losi, D., Ron, E.Z. & Marinelli, F. 2005. Myxobacteria isolated in Israel as potential source of new anti-infectives. *Journal of Applied Microb.* 98: 429–439.
- Gerth, K. & Müller, R. 2005. Moderately thermophilic Myxobacteria: novel potential for the production of natural products isolation and characterization. *Environ. Microb.* 7: 874–880
- Gerth, K., Bedorf, N., Irschik, H., Höfle, G., & Reichenbach, H. 1994. The soraphens: a family of novel antifungal compounds from *Sorangium cellulosum* (myxobacteria). I. Soraphen A1a: fermentation, isolation, biological properties. *J Antibiot* 47: 23–31

- Guo, W., Cui, F., & Tao, W. 2008. Bioassay-based screening of myxobacteria producing antitumor secondary metabolites. *African Journal of Biotechnol.* 7: 842-847.
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J. & Williams, S. 1994. The fruiting, gliding bacteria: the myxobacteria. *Bergey`s manual of determinative bacteriology.* 9<sup>th</sup> ed. Williams & Wilkins. Balyimore, MD. 515-525.
- Hughes, B., Hellmann, J., Ricketts, T., & Bohannan, J. 2001. Counting the uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Applied and Environ. Microb.* 67, 4399-4406.
- Iizuka, T., Tokura, M., Jojima, Y., Hiraishi, A., Yamanaka, S., & Fudou, R. 2006. Enrichment and phylogenetic analysis of moderately thermophilic myxobacteria from hot springs in Japan. *Microbes Environ.* 21: 189-199.
- Jiang, D., Wu, Z., Zhao, J. & Li, Y. 2007. Fruiting and non-fruiting myxobacteria: A phylogenetic perspective of cultured and uncultured members of this group. *Molec. Phylogenetics and Evolution* 44: 545–552.
- Krug, D., Zurek, G., Revermann, O., Vos, M., Velicer, G. & Müller, R. 2008. Discovering the Hidden Secondary Metabolome of *Myxococcus xanthus*: a Study of Intraspecific Diversity. *Applied and Environ. Microb.* 74: 3058-3068.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings Bioinformat.* 5: 150–163.
- Lee, F., Borzilleri, R., Fairchild, C., Kim, S., Long, B., Reventos-Suarez, C., Vite, G., Rose W., & Kramer, R. 2001. BMS- 247550: a novel epothilone analog with a mode of action similar to paclitaxel but possessing superior antitumor efficacy. *Clin Cancer Res* 7: 1429–1437.
- Lee, N., & Reichenbach, H. 2006. The Genus *Herpetosiphon*. *Prokaryotes* 7:854–877.
- Martin, A. 2002. Phylogenetic Approaches for Describing and Comparing the Diversity of Microbial Communities. *Applied and Environ. Microb.* 68: 3673–3682.

- Meerak, J., Yukphan, P., Miyashita, M., Sato, H., Nakagawa, Y., & Tahara, Y. 2008. Phylogeny of  $\gamma$ -polyglutamic acid-producing *Bacillus* strains isolated from a fermented locust bean product manufactured in West Africa. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 54: 159–166.
- Miyashita, M., Sakane, T., Suzuki, K., & Nakagawa, Y. 2008. 16S rRNA gene and 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences analysis of the genus *Myxococcus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 282: 241–245.
- Reichenbach, H. 1983. A simple method for the purification of myxobacteria. *J. Microbiol. Meth.* 1:77–79.
- Reichenbach, H. 1993. *Myxobacteria II*. Washington, DC, USA: American Society for Microbiology.
- Reichenbach, H., 1999. The ecology of the myxobacteria. *Environ. Microbiol.* 1: 15–21.
- Reichenbach, H. 2001. Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* 27:149–156.
- Reichenbach, H. & Dworkin, M., 1992. The myxobacteria. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H. (Eds.), *The Prokaryotes*, second ed. Springer-Verlag, New York, pp. 3416–3487.
- Reichenbach, H., & Höfle, G. 1993. Biologically active secondary metabolites from myxobacteria. *Biotech. Adv.* 11:219–277.
- Sanford, R. A., Cole, J.R., & Tiedje, J.M. 2002. Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halo-respiring facultative anaerobic myxobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:893–890.
- Schloss, P., & Handelsman, J. 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environ. Microbiol.* 71:1501-1506.
- Shimkets, L., Dworkin, M. & Reichenbach, H. 2006. The Myxobacteria. *Prokaryotes* 7:31–115



- Spröer, C., Reichenbach, H., & Stackebrandt, E. 1999. The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:1255–1262.
- Stackebrandt, E., & Goebel, B. 1994. Taxonomic note: a place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846–849.
- Thompson, J., Higgins, D., & Gibson, T. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. 1997. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25: 4876–4882.
- Wang, Q., Garrity, G., Tiedje, J., & Cole, J. 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environ. Microb.* 73:5261-5217.
- Waterman, M. 1995. Introduction to computational biology, p. 201–202. Chapman & Hall, New York, N.Y.
- Wu, Z., Jiang, D., Li, P. & Li, Y. 2005. Exploring the diversity of myxobacteria in a soil niche by myxobacteria-specific primers and probes. *Environ. Microb.* 7: 1602-1610.
- Xu, J. 2006. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Molec. Ecology.* 15: 1713-1731.
- Zhang, L., Wang, H., Fang, X., Stackebrandt, E., & Ding, Y. 2003. Improved methods of isolation and purification of myxobacteria and development of fruiting body formation of two strains. *J. Microbiol. Meth.* 54: 21–27.

## ANEXOS

**Anexo 1. Recetas de los medios de cultivo utilizados (para 1 litro).** Las recetas se tomaron de Shimkets *et al.* (2006) y de Zhang *et al.* (2003), algunas tienen modificaciones.

### WCX agar

CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1g	
Agar	15g	
*Cicloheximida	25mg	*Hacer en solución y esterilizar por filtración
pH	7.2	

### ST21CX agar

Autoclavar las soluciones por separado y combinar después de enfriar a 50°C

Solución A:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Extracto de levadura	20 mg
Agar	14 g
Agua destilada	600 ml

Solución B:

KNO <sub>3</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1 g
MnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0.1 g
Agua destilada	300 ml

Solución C:

FeCl <sub>3</sub>	0.2 g
Agua destilada	100 ml

*Cicloheximida	25mg	*Hacer en solución y esterilizar por filtración
pH (ajustar con KOH)	7.2	

### VY/2 agar.

Levadura para hornear	5.00 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1.36 g
*Vitamina B12	0.50 mg
Agar	15.00 g
pH (ajustar con KOH)	7.2

\*Hacer en solución y esterilizar por filtración

**CY agar.**

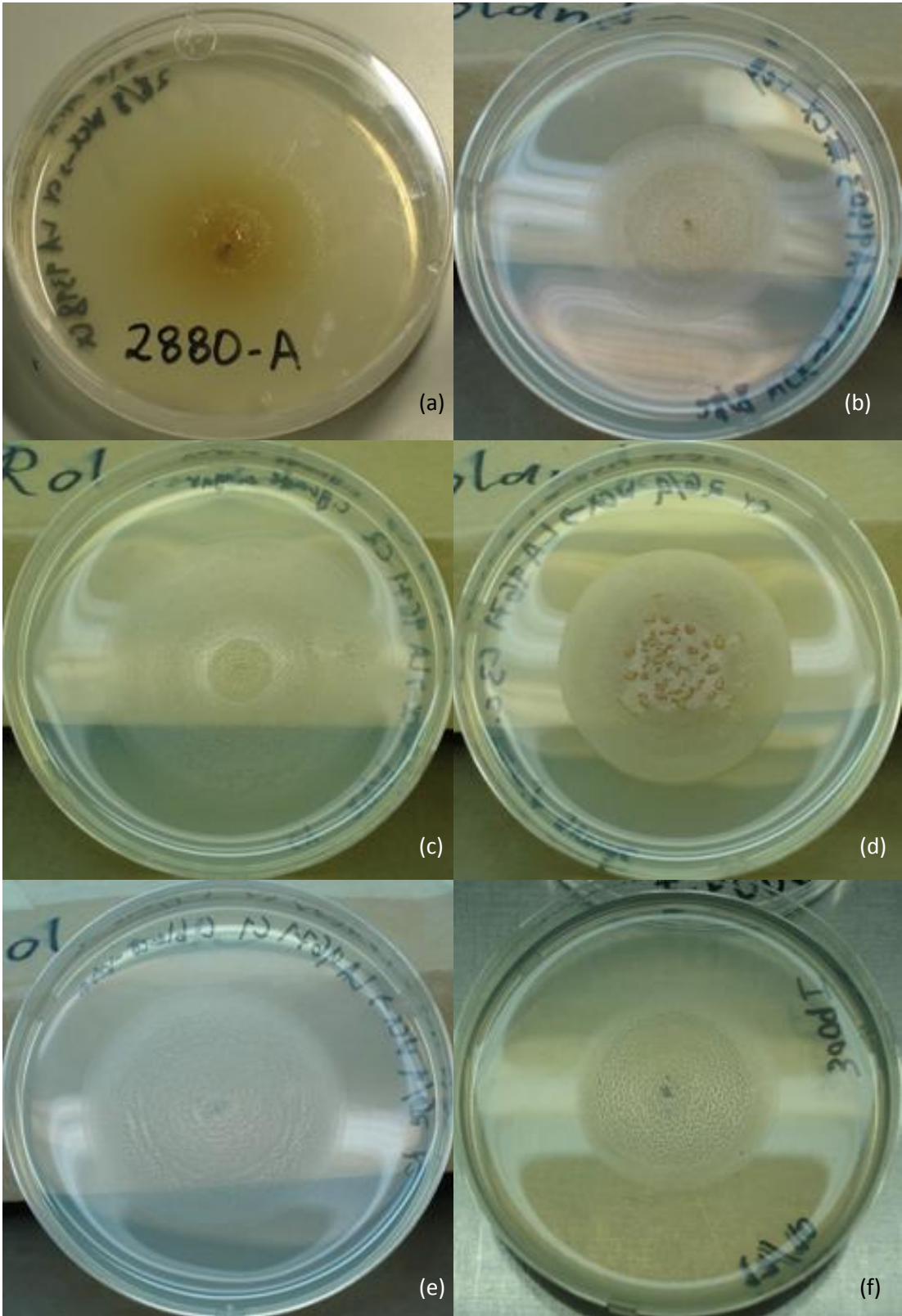
Casitone		3.00 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O		1.36 g
Extracto de levadura		1.00 g
Agar		15.00 g
pH	7.2	

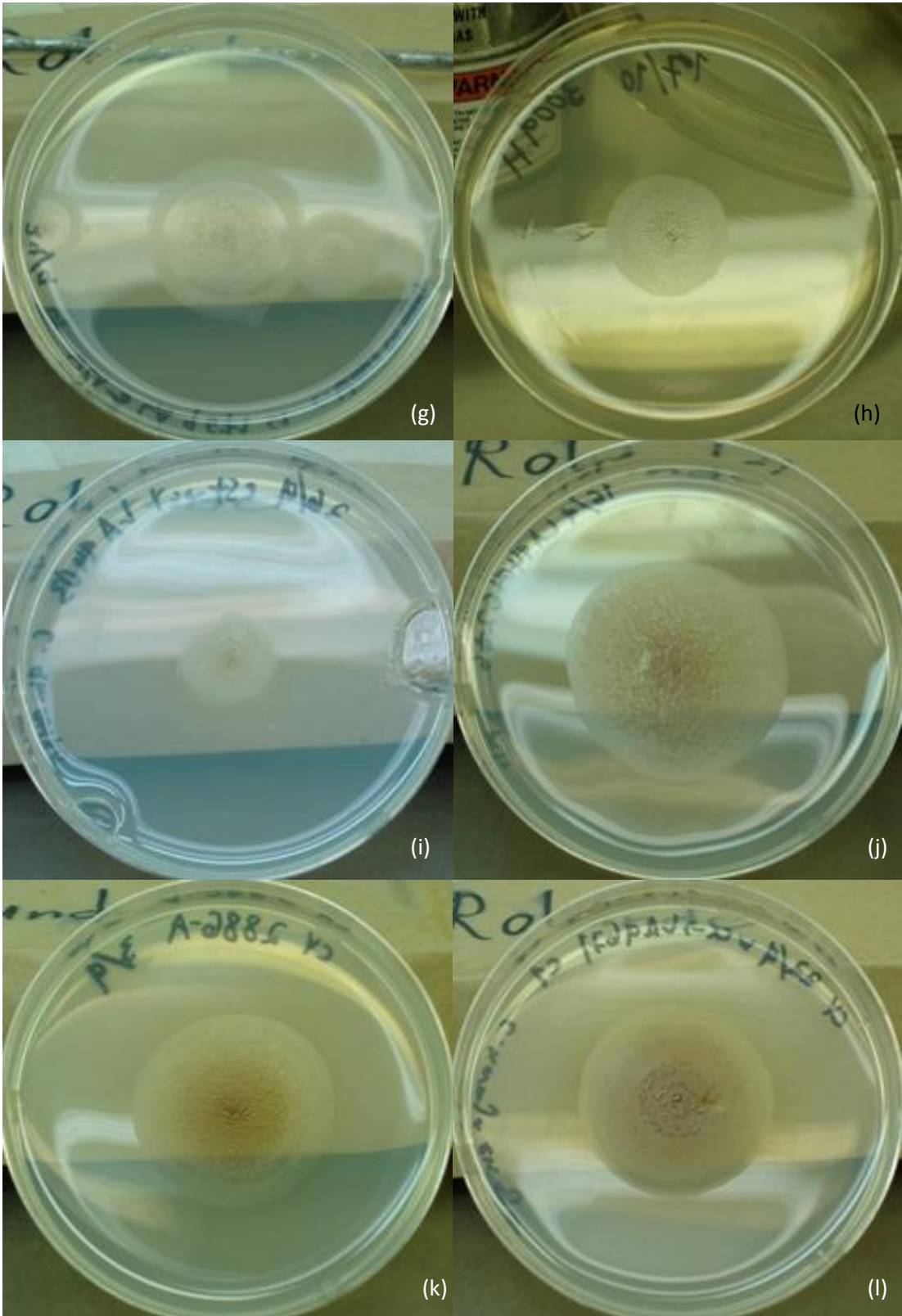
**CAS**

Casitone		10g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		1g
pH	6.8	

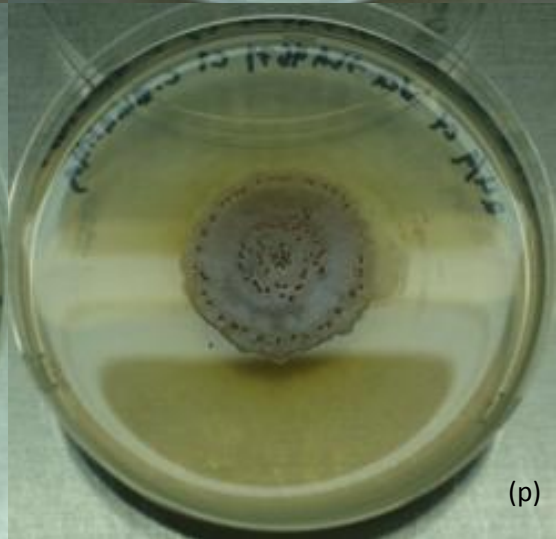
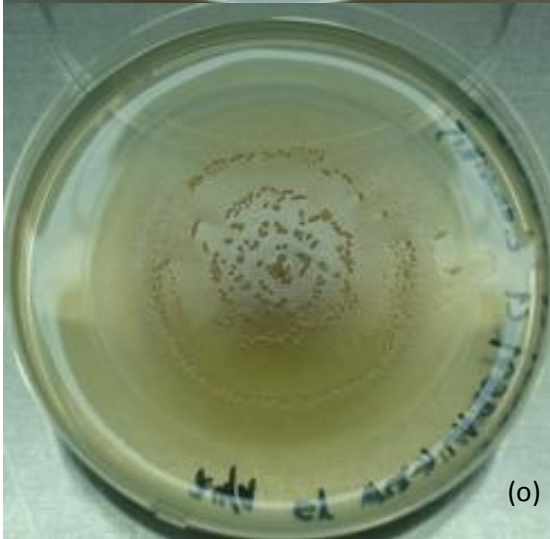
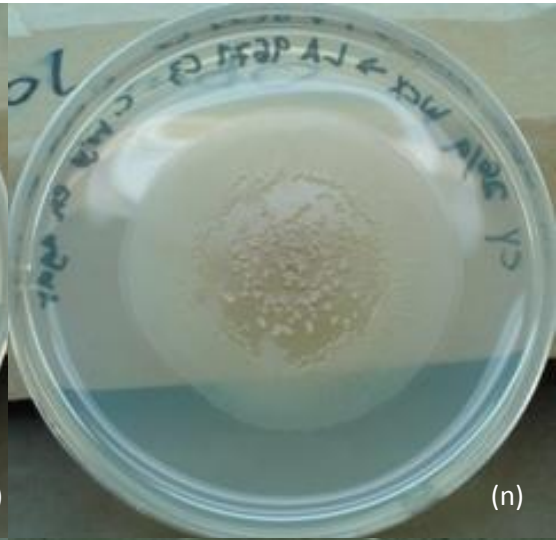
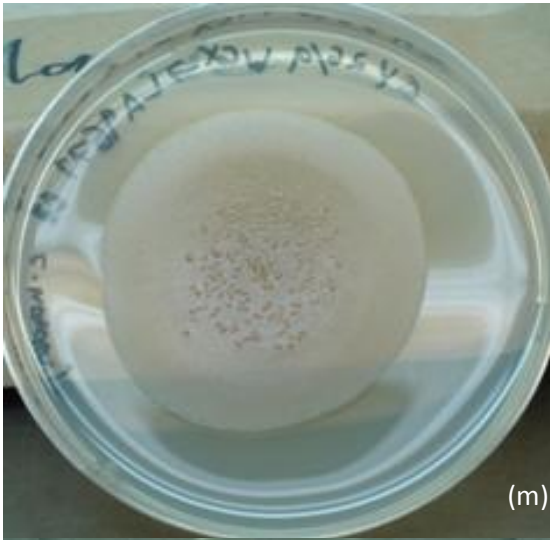
**CEH**

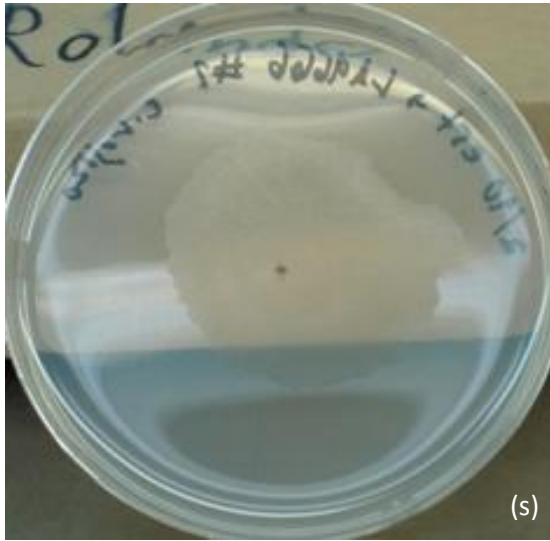
Casein enzymatic hydrolysate		10g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		1g
pH	6.8	











**Anexo 2.** Colonias de los aislamientos en placas CY. (a) INBio2880A (*Corallocooccus exiguus*). (b) INBio2885A (*Corallocooccus exiguus*). (c) INBio3009C (*Corallocooccus exiguus*). (d) INBio3009D (*Corallocooccus exiguus*). (e) INBio3009G (*Corallocooccus coralloides*). (f) INBio3009I (*Corallocooccus coralloides*). (g) INBio3009B (*Corallocooccus coralloides*). (h) INBio3009H (*Corallocooccus* sp.). (i) INBio2885B (*Myxococcus* sp.). (j) INBio2886B (*Myxococcus* sp.). (k) INBio2886A (*Myxococcus* sp.). (l) INBio3009A (*Myxococcus stipitatus*). (m) INBio3009F (*Myxococcus stipitatus*). (n) INBio3009E (*Myxococcus stipitatus*). (o) INBio3009K (*Myxococcus stipitatus*). (p) INBio3009J (*Myxococcus stipitatus*). (q) INBio3009L (*Myxococcus stipitatus*). (r) INBio2880B (*Cystobacter* sp.). (s) INBio3004A (*Cystobacter ferrugineus*).

**Anexo 3.** Características de los sitios de colecta de las muestras.

Código de muestras	Código de aislamiento	Fecha Colecta	Longitud/latitud	Área protegida	Descripción del sitio	Temperatura	Tipo muestra	pH	Comentario
LA-9398	2880	08-Jul-08	-83:56:24.20/ 10:09:47.60	Parque Nacional Braulio Carillo	Sendero el Ceibo, Sector Quebrada González	22,2	Suelo	6.6	Suelo café oscuro, arcilloso, húmedo con hojarasca sobre él. Asociado con raíces de Ceiba pentandra y Cycklantaceas, con poca exposición a la luz.
LA-9399	2881	08-Jul-08	-83:56:24.20/ 10:09:47.60	Parque Nacional Braulio Carillo	Sendero el Ceibo, Sector Quebrada González	22,2	Materia Orgánica		Tronco en avanzado estado de descomposición. No tenía presencia de insectos y sus larvas así como macro hongos.
LA-9400	2882	08-Jul-08	-83:56:24.20/ 10:09:47.60	Parque Nacional Braulio Carillo	Sendero el Ceibo, Sector Quebrada González	26	Materia Orgánica		Corteza de tronco poco descompuesta de textura granulosa con algunos musgos y macro hongos. Expuesta al sol
LA-9401	2883	08-Jul-08	-83:56:24.20/ 10:09:47.60	Parque Nacional Braulio Carillo	Sendero el Ceibo, Sector Quebrada González	23,4	Suelo	6.4	Suelo al pie de árbol muerto (Iinga sp -cf) con mucha materia orgánica y leve olor a alcohol. Muchas ramas y bejucos muertos depositado sobre él, estaba en u claro que propiciaba la entrada de luz y una mayor temperatura.
LA-9402	2884	23-Jul-08	-83:56:24.20/ 10:09:40.30	Parque Nacional Braulio Carillo	Sendero las Palmas, sector Quebrada González	22,6	Suelo	6.9	Suelo al pie de árbol muerto, amarillento, con gravas, arcilloso. Contiene restos de madera y corteza del árbol desechados por insectos. Poca luz.
LA-9403	2885	23-Jul-08	-83:51:36.10/ 10:11:21.50	Finca INBio, Reserva de Bosque Lluvioso	Sendero junto a río Costa Rica	23,4	Suelo	6.7	Suelo arenoso, húmedo, café claro junto al río con poca luz y asociado araz de Inga sp.
LA-9404	2886	23-Jul-08	-83:51:36.10/ 10:11:21.50	Finca INBio, Reserva de Bosque Lluvioso	Sendero junto a río Costa Rica	23,4	Materia Orgánica	6.7	Tronco a medio descomponer, amarillento, húmedo. No hay signos de insectos o macro hongos
LA-9405	2887	23-Jul-08	-83:51:36.10/ 10:11:21.50	Finca INBio, Reserva de Bosque Lluvioso	Sendero junto a río Costa Rica	23,7	Materia Orgánica		Corteza viva de Vitex cooperi -cf (árbol senil), fibrosa, crema con algunos musgos creciendo sobre ella.
LA-9406	2888	23-Jul-08	-83:51:36.10/ 10:11:21.50	Finca INBio, Reserva de Bosque Lluvioso	Sendero junto a río Costa Rica	23,7	Suelo	6.2	Suelo al pie de Pentacletra macroloba, arcilloso, amarillo-crema. Colectado entre matriz de raice, con poca hojarasca sobre él.
LA-9407	2889	23-Jul-08	-83:51:36.10/ 10:11:21.50	Finca INBio, Reserva de Bosque Lluvioso	Sendero junto a río Costa Rica	26,3	Materia Orgánica		Tronco poco descompuesto, blanco. Parte esxterna (2.5 cm)si ataque de insectos o macro hongos) en el centro contenía termitas (Termitidea)
LA-9666	3004	01-Sep-08	-84:45:21.50/ 10:27:27.70	PN Volcán Arenal	Sendero Península. Bosque secundario.	29,3	Suelo	6,8	Arenas expuestas de la orilla de la Laguna de Arenal.
LA-9667	3005	01-Sep-08	-84:45:21.50/ 10:27:27.70	PN Volcán Arenal	Sendero Península. Bosque secundario.	29,2	Materia Orgánica		Corteza de Albizia sp en borde de sendero expuesto al sobre camino de Atta cephalotes.
LA-9668	3006	02-Sep-08	-84:44:03.00/ 10:27:31.20	Parque Nacional Arenal	Sendero a las Coladas, sitio de regeneración domonado por caña brava	22,6	Materia Orgánica		Rama caída de Ficus golmanii, en estado medio de descomposición.
A-9669	3007	02-Sep-08	-84:44:03.00/ 10:27:31.20	Parque Nacional Arenal	Sendero a las Coladas, sitio de regeneración domonado por caña brava	22,6	Suelo		Suelo bajo Ficus cotinifolia con hojas y ramitas en descomposición cerca de las raíces del árbol.
LA-9670	3008	02-Sep-08	-84:43:41.50/ 10:26:49.90	Parque Nacional Arenal	Sendero El Ceibo	22,9	Materia Orgánica		Madera de Cecropia sp en estado avanzado de descomposición, a la sombra
LA-9671	3009	02-Sep-08	-84:43:30.40/ 10:27:04.10	PN Volcán Arenal	Las Coladas. Zona abierta, rocosa con arbustos aislados	24,3	Suelo		Suelo arenoso con materia orgánica, al pie de Myrica sp.



**Anexo 4.** Resultados obtenidos al comparar las secuencias de los aislamientos con la base de datos del genbank.

Muestra	Accesión	Definición	Taxonomía	E value	Max identity
2880A	AJ233932	Coralloccoccus exiguus	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales;Cystobacterineae; Myxococcaceae; Coralloccoccus	0	99%
2880B	AJ233901	Cystobacter sp.	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales;Cystobacterineae; Cystobacteraceae; Cystobacter.	0	99%
2885A	AJ233932	Coralloccoccus exiguus	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales;Cystobacterineae; Myxococcaceae; Coralloccoccus	0	99%
2885B	AM489521	Myxococcus sp.	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales; Cystobacterineae; Myxococcaceae; Myxococcus.	0	97%
2886B	AM489521	Myxococcus sp.	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales; Cystobacterineae; Myxococcaceae; Myxococcus.	0	98%
3009A	AB218207	Myxococcus stipitatus	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales; Cystobacterineae; Myxococcaceae; Myxococcus.	0	99%
3009B	AJ233915	Myxococcus coralloides	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales; Cystobacterineae; Myxococcaceae; Myxococcus.	0	99%
3009C	AJ233932	Coralloccoccus exiguus	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales;Cystobacterineae; Myxococcaceae; Coralloccoccus	0	99%
3009D	AJ233932	Coralloccoccus exiguus	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales;Cystobacterineae; Myxococcaceae; Coralloccoccus	0	99%
3009E	AB218207	Myxococcus stipitatus	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales; Cystobacterineae; Myxococcaceae; Myxococcus.	0	99%
3009F	AB218207	Myxococcus stipitatus	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales; Cystobacterineae; Myxococcaceae; Myxococcus.	0	99%
3009G	AJ233915	Myxococcus coralloides	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales; Cystobacterineae; Myxococcaceae; Myxococcus.	0	99%
3009J	AF506738	Myxococcus stipitatus	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales; Cystobacterineae; Myxococcaceae; Myxococcus.	0	99%
3009K	AB218207	Myxococcus stipitatus	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales; Cystobacterineae; Myxococcaceae; Myxococcus.	0	99%
2886A	AJ233923.1	Myxococcus sp.	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales; Cystobacterineae; Myxococcaceae; Myxococcus.	0	99%
3004A	AJ233900.1	Cystobacter ferrugineus	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales;Cystobacterineae; Cystobacteraceae; Cystobacter.	0	99%
3009H	AY996846.1	Coralloccoccus sp.	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales; Cystobacterineae; Myxococcaceae; Myxococcus.	0	99%
3009I	AJ233915	Coralloccoccus coralloides	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales; Cystobacterineae; Myxococcaceae; Myxococcus.	0	99%
3009L	AB218207.1	Myxococcus stipitatus	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales; Cystobacterineae; Myxococcaceae; Myxococcus.	0	99%
3007A	CP000875.1	Herpetosiphon sp.	Bacteria; Chloroflexi; Herpetosiphonales; Herpetosiphonaceae; Herpetosiphon	0	98%